



HAL
open science

Étude de la conformation et de la dynamique conformationnelle de molécules biologiques en phase gazeuse

Mathilde Bouakil

► **To cite this version:**

Mathilde Bouakil. Étude de la conformation et de la dynamique conformationnelle de molécules biologiques en phase gazeuse. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1145 . tel-03167835

HAL Id: tel-03167835

<https://theses.hal.science/tel-03167835>

Submitted on 12 Mar 2021

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° NNT d'ordre : 2019LYSE1xxx

THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Opérée au sein de : L'Institut Lumière Matière

L'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale 52

Physique et Astrophysique

Spécialité de doctorat : Physique-Chimie

Discipline : Physique

Soutenue publiquement le 21/09/2020, par :

Mathilde BOUAKIL

**Étude de la conformation et de la dynamique
conformationnelle de molécules biologiques en phase
gazeuse**

Devant le jury composé de :

Rapporteurs: Héloïse DOSSMANN

Maître de Conférences, Sorbonne Université

Satchin SOORKIA

Maître de Conférences, Université Paris Sud

Examinatrices: Sarah CIANFERANI

Directrice de Recherche CNRS, Université de Strasbourg

Sylvie RICARD-BLUM

Professeure des Universités, Université Lyon 1

Directeurs: Philippe DUGOURD

Directeur de Recherche, Université Lyon 1

Luke MacALEESE

Chargé de Recherche CNRS, Université Lyon 1

Remerciements

Ces trois années de thèse ont été pour moi une fantastique aventure humaine, scientifique et professionnelle. J'en garde et garderai toujours un excellent souvenir. J'ai fait des rencontres incroyables, je me suis engagée sur des projets que je n'aurais jamais imaginé achever, j'ai acquis un peu plus de confiance en moi. C'est pour cela que j'aimerais remercier en premier toutes les personnes qui m'ont offert cette opportunité et qui m'ont encouragée à m'y engager.

Ensuite je souhaiterais remercier mon directeur de thèse, Philippe. Je ne serais jamais arrivée jusque là sans vous. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné ma chance. Merci pour les séances d'escalade dont je regrette qu'elles n'aient été plus nombreuses. J'aimerais aussi vous remercier pour votre soutien dans tous les projets que j'ai entrepris, scientifiques ou non, et pour votre bienveillance qui a fait que ces trois années resteront une excellente expérience. J'aimerais vous témoigner par ces quelques lignes ma plus profonde gratitude.

Je voudrais aussi te remercier tout spécialement Luke. Je te remercie pour toutes ces années (5 ans quand même!). Tu as toujours pris le temps de m'écouter, de répondre à mes questions, de m'expliquer, me réexpliquer et me rereexpliquer ce que je ne comprenais pas. Tu es une personne extraordinaire, surprenante, drôle et brillante! J'estime avoir eu beaucoup de chance de travailler avec toi. J'ai appris énormément de choses qui m'ont complètement sorti de ma zone de confort (on se rapelera tout particulièrement de la bouilloire qui aujourd'hui est de nouveau en état de marche!). Merci pour ta confiance, ta patience, ton soutien, tes conseils et pour m'avoir accompagné jusqu'au bout de ce projet. On a formé une très bonne équipe!

Dans ce long parcours je ne voudrais pas oublier l'immense contribution de Clothilde. Tu as été là avec moi depuis le tout début. Tu as toujours été là pour partager mes joies mais pas que... Tu as toujours eu les mots pour me remonter le moral et me redonner confiance en moi et en mes capacités. Tu es une magnifique personne avec un coeur gros comme le monde. Merci pour tout.

Frank merci d'avoir rythmé chaque jour de travail par tes "Ben alors t'es pas en manip?" et "Alors, combien de pages?" qui me rappelaient qu'il fallait que j'aille bosser! Ton aide pour tout ce qui concernait la chimie et la préparation des échantillons m'a précieusement aidé. Le bruit de cocottes dans le couloir va beaucoup me manquer!

J'aimerais remercier aussi toute l'équipe SpectroBio qui m'a accueilli comme dans une famille. Je suis extrêmement chanceuse d'avoir eu l'opportunité de travailler avec des personnes aussi brillantes. Un petit mot spécial aux doctorants de l'équipe. Marine merci pour le soutien (et les mouchoirs!) que tu m'as toujours apporté. Hussein, Aziz, bon courage à vous deux pour la suite! Aurélien, J-V, Gardez la pêche! Je ne vous oublie pas Marion et Fabien, merci pour toute l'aide et les conseils que vous m'avez donnés mais aussi pour les fou rires et tout ces bons moments qu'on a passés ensemble.

Je remercie également l'ILM, les chercheurs, les doctorants, toutes les équipes et l'administration sans qui rien ne marcherait. Merci à la Teamdoc que j'ai eu grand plaisir à animer. J'espère qu'elle continuera à animer la vie des doctorants du labo, c'est quand même un peu mon bébé aussi.

Merci à l'équipe Kastler du midi et du resto du mois: Vero ma maman du labo, toujours un chocolat dans son tiroir et des bras ouverts pour consoler et rassurer, Estelle le petit ange sur mon épaule qui en aura bientôt un petit dans ses bras, Xavier toujours partant pour un after work, on se retrouvera sur une Salsa je l'espère. Merci également pour tout le temps que tu as passé pour automatiser mes manips. J'ai gagné un temps infini grâce à toi! Sad chef de gang, toujours le mot pour rire et une bonne énigme à raconter. Ciro, tu m'as sorti quelques fois du pétrin de l'informatique! Christian, tu m'as sorti du pétrin des manips! Et Jean...Ah Jean le roucouleur!

Dany, j'aimerais aussi te remercier tout spécialement. Je suis arrivée à Lyon, un peu grâce à toi finalement. En plus du doctorat tu m'as embarqué dans le projet fou de courir un marathon, alors que je n'ai rien d'une athlète. Et voilà je termine cette thèse deux fois marathonnienne, on peut le dire, tu m'as transmis la fièvre du marathon (on notera que c'est préférable au COVID!). Grâce à ça nous avons partagé des moments forts et importants de joie et de fierté. Merci d'avoir cru en moi.

Pendant ce long parcours j'ai fait d'autres rencontres inestimables et l'une d'elle c'est toi, Justine. J'ai rencontré une amie, une complice, un tampon (pour calmer mes ardeurs). J'aimerais aussi mentionner le cercle intérieur qui a fait de chaque pause dej une fête ou une conférence débat sur les sujets les plus ardues (Hugues et Gael je n'ai pas toujours compris quel était le sujet de vos conversations, je l'avoue). Gaétan, mon ami, merci pour toutes ces soirées, tu ne m'as jamais laissé tombé! Clementine, enfin un public qui reconnaît mon immense talent humoristique.

Les marathoniens, Floriane, Alexis, Kevin, on a partagé quelque chose d'intense pendant ces mois de préparation et le jour j. Vous resterez toujours mes acolytes du Clan des vastes, mes amis.

Enfin je voudrais remercier tous mes amis Lyonnais, les coureurs, les randonneurs, les grimpeurs, votre soutien indéfectible m'a donné courage et confiance. Je remercie aussi ma famille que j'aime plus que tout, pour m'avoir accompagné jusqu'au bout. La fierté que vous me témoignez font de moi la plus heureuse des docteurs. Un merci spécial à ma Maman, qui a relu l'ensemble de mon manuscrit. Merci à mon frère et ma soeur qui sont toujours là pour moi. Merci aussi à mon Papa qui, même loin, m'a soutenu depuis le départ. Pour finir, Jordan, tu es la plus belle chose que j'ai trouvée pendant ces années de recherche, merci de m'accompagner dans mes projets, l'avenir nous appartient!

Je ne parle pas beaucoup de mon travail dans ces remerciements mais ce qui m'a nourri chaque jour au cours de ces trois années c'est la richesse humaine et intellectuelle des personnes qui m'ont

entourée, leur générosité, leur patience et leur gentillesse et à mes yeux c'est ce qui compte le plus finalement.

Merci à tous d'avoir fait de cette expérience unique un souvenir mémorable.

Table des matières

Introduction	1
Chapitre 1 Montage expérimental et instrumentation	7
Introduction	7
I Source ESI/nano-ESI	7
I.1 Source ESI	7
I.1.a Formation de gouttelettes chargées	8
I.1.b Désolvatation des gouttelettes	9
I.1.c Formation de molécules chargées	9
I.2 Source Nano-ESI	10
I.2.a Nano-ESI vs ESI	10
I.2.b Nano-ESI en pratique	11
II Spectrométrie de masse	12
II.1 Le piège à ions	12
II.2 Spectrométrie de masse en tandem : MS^n	13
II.3 La spectrométrie de masse native : étudier la structure native de protéines et de complexes protéiques	14
III Couplage pompe-sonde laser et MS	18
III.1 Montage expérimental	18
III.1.a Fonctionnement laser	18
III.1.b Montage optique	19
III.2 Synchronisation	22
III.2.a La spectrométrie de masse résolue en temps?	22
III.2.b Pompe-sonde laser et MS^2	23
IV Spectrométrie de mobilité ionique	28
IV.1 Mobilité ionique et section efficace : Définition	29
IV.2 Mobilité ionique et section efficace de collision : Méthode expérimentale	30
V Perspectives : Couplage laser et IMS	32
V.1 Montage optique	32
V.2 Principe d'utilisation	33
VI Conclusion	33

TABLE DES MATIÈRES

Chapitre 2 Photo-excitation de chromophores	35
I Introduction	35
I.1 Chromophore pour l'étude de conformation de peptides	35
I.2 Les voies de relaxation des xanthènes	37
II Mécanisme de dissociation multi-photons de systèmes chromophores-peptide	39
II.1 Introduction	40
II.2 Méthode	41
II.3 Rendement de fragmentation en fonction de l'énergie par pulse laser	42
II.4 Refroidissement des ions par collision	44
II.5 CID vs VisPD	46
II.6 Simulation du nombre de photons absorbés pour induire la photo-dissociation	51
II.7 Conclusion	53
III Réactivité de l'état triplet de la Rhodamine	56
III.1 Introduction	56
III.2 Méthode	57
III.3 Génération et caractérisation de l'état triplet	57
III.4 Évolution de la population de l'état triplet	60
III.5 Compétition entre réactivité et quenching	63
III.6 Réactivité de l'état triplet	63
III.7 Traitement de données	68
III.8 Conclusion	69
IV Perspectives : Expériences de réactivité sur ions photo-activés	70
Chapitre 3 Transfert de proton	73
I Introduction	73
I.1 Transfert de proton couplé au transfert d'électron	73
I.2 PCET : un mécanisme lié au changement conformationnel	74
I.2.a Expérience pompe-sonde	76
II Méthodologie	77
II.1 Mise en place	77
II.1.a Préparation d'échantillons	77
II.1.b Fragmentation	78
II.1.c Optimisation d'alignement laser	82
II.1.d Contrôle pompe-sonde "ON/OFF"	83
II.1.e Spectroscopie optique des peptides "modèle" et "contrôle"	84
II.2 Mise en œuvre	85
II.2.a Liste des délais	85
II.2.b Déroulement de l'expérience	86
II.2.c HPC vs LPC et instabilité du signal (chromatogramme)	87
III Mesure de dynamique de transfert de proton par pompe-sonde laser	88

TABLE DES MATIÈRES

III.1	Contrôle	88
III.2	Dynamique conformationnelle	89
	III.2.a Évolution de la fragmentation en fonction du délai pompe-sonde	91
III.3	Interprétation des résultats	92
	III.3.a Choix de la fonction modèle	92
III.4	Temps courts	93
III.5	Temps longs	93
IV	Conclusion	101
Chapitre 4 Dynamique conformationnelle de peptides intrinsèquement désordon-		
	nés	105
I	Introduction	105
II	Etude du complexe PUMA-Mcl-1	106
	II.1 Complexe PUMA-Mcl-1	106
	II.2 Caractérisation de PUMA	108
	II.2.a Caractérisation par spectrométrie de masse	109
	II.2.b Caractérisation structurale de PUMA par Dichroïsme Circulaire	112
	II.2.c Caractérisation structurale de PUMA par mobilité ionique	117
	II.3 Expression et caractérisation de Mcl-1	125
	II.3.a Expression de la protéine	125
	II.3.b Spectrométrie de masse de Mcl-1	127
	II.4 Conclusion	127
III	Caractérisation structurale de protéines transmembranaires : les syndécans	128
	III.1 Ectodomains de syndecans	129
	III.2 Hétérogénéité conformationnelle des ectodomains des syndécans	129
	III.2.a Section efficace de collision des syndécans	130
	III.2.b Le cas de ED-4	132
	III.3 Conclusion	133
Conclusion		135
Liste des publications		155

Introduction

Cette thèse concerne l'étude de la structure de protéines en phase gazeuse. Notre but est de comprendre la dynamique de protéines à la suite de leur interaction avec des photons, avec d'autres molécules ou après un transfert de charges. Ici, nous allons nous intéresser à la caractérisation structurale de molécules biologiques après un transfert de charges photo-induit et autres interactions.

Cette thèse s'inscrit dans la suite de plusieurs thèses dans l'équipe dont le sujet portait sur le couplage de la spectrométrie de masse et de la spectroscopie optique pour l'étude structurale conformationnelle et des propriétés optiques de peptides de petites protéines. Les actions du groupe visent à utiliser et étendre les limites de la spectroscopie optique sur des systèmes de grande taille dans des problématiques biologiques. Le spectromètre de mobilité ionique, construit au laboratoire, nous permet depuis quelques années d'étudier ces grands systèmes. Cet instrument nous permet de nous intéresser à des phénomènes dynamiques de transfert de charge induits par laser et de changements de conformation induites par la formation de complexes.

Une protéine, du grec *prôtos* "le premier", "le plus important", est une macromolécule constituée d'acides aminés assemblés par des liaisons peptidiques. Les protéines sont les molécules les plus abondantes dans la majeure partie des organismes.

Ces molécules sont impliquées dans un grand nombre de fonctions. Certaines d'entre elles permettent de maintenir la structure de cellules. D'autres sont capables de transporter de petites molécules. D'autres encore ont pour fonction d'informer et de signaler, *etc.*

La structure de ces macromolécules est, pour une part considérable, à l'origine de ces fonctions. La structure de ces molécules est leur organisation dans l'espace tridimensionnel. La structure primaire (2D), secondaire, tertiaire et occasionnellement quaternaire (3D) sont les différents stades de structuration des protéines globulaires.[1] Depuis une vingtaine d'année, le paradigme structure \leftrightarrow fonction a évolué *via* la découverte de protéines dont la fonction résidait dans l'absence de structure (protéines ou régions intrinsèquement désordonnées - IDP/IDR). Ces fonctions peuvent alors s'exprimer par un phénomène dynamique : non structuré \rightarrow structuré ou structuré \rightarrow non structuré.[2, 3] De manière générale et hors de ces cas particuliers, une protéine est une molécule dynamique qui évolue au cours du temps et/ou en fonction de son environnement.[4, 5]

Le changement de structure et la fonction de ces molécules peuvent être régis par divers mécanismes et déclenchés par des stimuli externes. Un de ces stimulus peut être la lumière qui, quelle que soit sa longueur d'onde, apparaît dans de nombreux phénomènes de la vie courante.

L'un de ces phénomènes est le phototropisme. C'est la capacité d'un organisme à s'orienter par rapport à la lumière.[6] Ce phénomène est notamment observé dans les végétaux. Il dicte l'orientation des feuilles, des fleurs et des racines afin d'optimiser notamment la photosynthèse. Les phototropines, impliquées dans le phototropisme, sont des photorécepteurs intervenant dans la croissance et le développement des plantes. Ce sont des protéines dont certaines régions (LOV) sont sensibles à la lumière bleue. Le domaine LOV lié à une flavine (FMN), un chromophore qui absorbe la lumière bleue autour de 450 nm, est composé d'une centaine d'acides aminés.[7, 8] Il est responsable du phototropisme et du mouvement des chloroplastes et de l'ouverture des stomates de l'*Arabidopsis*. [9] Après absorption de la lumière, la FMN subit un croisement inter-système qui l'emmène à l'état triplet donnant lieu à la formation d'une liaison covalente entre la FMN et une cystéine *via* des transferts de charge.[10, 11] Cet ensemble de mécanismes mène à des changements de conformation de la protéine, notamment le dépliement d'une hélice α . [12] Cet exemple illustre le processus de changement de conformation photo-induit. Il sera donc intéressant d'étudier les phénomènes d'absorption et de relaxation de chromophores comme ceux impliqués par exemple dans la première étape du phototropisme.

Pour continuer sur les phénomènes photo-induits, la photosynthèse est un exemple probant de mécanisme complexe de transferts de charge associés à la dynamique conformationnelle de protéines.[13] La photosynthèse, énergie lumineuse convertie en énergie électrochimique, peut avoir lieu dans de nombreux organismes notamment dans les plantes et les bactéries. Un transfert d'électron a lieu entre deux quinones (Q_A et Q_B) du centre réactif de la bactérie (ou la plante) qui se trouve être une protéine (bRC). Ce centre réactif contient un chromophore. C'est cette protéine qui sera capable de convertir l'énergie lumineuse en énergie électrochimique. De nombreuses études ont montré que la dynamique conformationnelle impose la vitesse de transfert d'électron entre Q_A et Q_B . [14–17] Ainsi, le transfert d'électron peut être contrôlé par la dynamique d'une protéine lorsque le changement de conformation est plus lent et est nécessaire pour le transfert d'électron puisse avoir lieu. Ce phénomène est appelé "conformational gating". [18] La photosynthèse est un exemple de dynamique de transfert de charge photo-induit et limité par la dynamique conformationnelle de protéines.

Ainsi, les changements de structure peuvent non seulement participer au fonctionnement des organismes. Ils peuvent aussi être à l'origine de graves maladies. L'une de ces maladies, à laquelle s'est intéressée l'équipe, est la maladie d'Alzheimer.[19] La protéine amyloïde- β sous forme d'oligomères solubles ou de fibrilles insolubles joue un rôle important dans l'expression de la maladie et est devenu un sujet central dans la recherche de traitements.[20, 21] Des études structurales ont

permis de caractériser les différentes formes du peptide et d'ouvrir des voies qui permettront, dans l'avenir, d'entraver la toxicité de l'amyloïde sous sa forme pathogène.[22] Les travaux de l'équipe sur l'amyloïde- β ont porté sur la mesure de la conformation de la protéine grâce à la mobilité ionique et au FRET(Förster Resonance Energy Transfer) d'action.[23, 24] D'autres groupes utilisant différentes techniques d'analyse structurale par spectrométrie de masse *e.g.* échange H/D, ont travaillé sur la caractérisation de la structure de l'Amyloïde- β . [25–27] Enfin, des études par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) et dichroïsme circulaire ont permis de montrer l'évolution de la toxicité en fonction de la structure de la protéine.[28] D'autres ont également montré que la structure de différents types de peptides amyloïdes, présentant des mécanismes de toxicité semblables dans l'organisme, était similaire.[29]

Dans chacun de ces exemples, le changement de conformation photo-induit, le transfert de charge limité par la dynamique conformationnelle et le changement de conformation pathogène de protéines font l'objet de nombreuses recherches. Ces différents mécanismes sont étudiés par cristallographie aux rayons X, par résonance magnétique nucléaire, par dichroïsme circulaire et plus récemment par cryo-microscopie électronique (cryo-EM). Parmi ces nombreuses techniques d'analyse, la spectrométrie de masse (MS) s'est révélée être un outil robuste pour l'étude de la structure de molécules biologiques.[30–32]

L'atout majeur de l'analyse de molécules biologiques par spectrométrie de masse est que cet instrument est utilisé comme filtre en masse. Grâce à lui, nous pouvons travailler sur des objets bien caractérisés grâce à la sélection en masse. On peut suivre l'évolution de ces systèmes et la stœchiométrie des édifices moléculaires. Dès lors, de multiples groupes de recherche ont adopté la spectrométrie de masse pour sonder la structure, la réactivité, la nature et la force des liaisons qui composent une protéine. L'analyse protéomique permet le séquençage de la molécule. Cette méthode utilise différentes voies de dissociation comme la dissociation induite par collision (CID), la dissociation par capture électronique (ECD) afin d'induire la rupture de liaisons peptidiques.[33–36] Le couplage d'un laser avec la spectrométrie de masse a montré de forts potentiels pour la dissociation spécifique de molécules biologiques (IRMPD, Infrared Multiple Photodissociation et UVPD, UV photodissociation).[37] D'autres techniques comme l'échange Hydrogène/Deutérium ($^2\text{H}/^1\text{H}$) ou le cross linking donnent accès à des informations sur la structure 3D globale de la molécule en phase liquide grâce à des modifications chimiques. L'échange H/D ne se fera qu'au niveau des hydrogènes au contact du solvant. De fait, les hydrogènes présents au centre d'une protéine globulaire ne seront pas échangés avec le deutérium. L'analyse par spectrométrie de masse permettra de détecter les zones où l'échange a eu lieu.[38] Le cross linking utilise des molécules "linker" qui se fixent de part et d'autre sur des sites spécifiques de la protéine.[39] La taille de ces linker étant connue, on peut alors évaluer la proximité de certaines portions de la molécule en identifiant les peptides reliés par un linker après dissociation. Par ailleurs, l'usage de la native-MS *via* l'utilisation de la source nESI (nano-Electrospray Ionisation) a ouvert la voie vers l'analyse de la structure des protéines et

complexes protéiques dans leur conformation "naturelle", telle qu'elle est adoptée dans la nature. Enfin, la spectrométrie de masse couplée à la spectrométrie de mobilité ionique est une technique de chromatographie en phase gazeuse qui utilise la capacité d'un ion à évoluer dans un tube rempli de gaz sous l'effet d'un champ électrique.[40–42] La mesure de la vitesse des ions dans le tube en fonction de leur taille, leur masse et leur charge donne accès à la forme globale de l'ion. En réalité, l'analyse conformationnelle ne se fait que de manière statique (CID, H/D exchange, cross-linking) ou moyenne (IMS). Le couplage laser/MS et laser/IMS-MS sont des outils qui nous donnent accès la dynamique conformationnelle des molécules.

Ces outils de couplage de la spectrométrie de masse avec la spectroscopie optique ou la spectrométrie de mobilité ionique présentés dans le chapitre 1 , ont donc été utilisés pour étudier la dynamique conformationnelle de molécules biologiques en phase gazeuse. C'est par l'étude de l'activation photo-induite de chromophores utilisés pour l'analyse de la structure de protéines qu'a commencé ce travail de thèse. Les mécanismes d'absorption de photons et de relaxation non-radiative de chromophores greffés sur des peptides ont été sondés dans le chapitre 2. Nous nous sommes ensuite intéressés aux mécanismes de transferts de charge photo-induits au sein de petits peptides afin de comprendre l'influence de la taille de ces systèmes, pour aller vers des objets de la taille de protéines, et de la composition en acides aminés sur la dynamique conformationnelle des peptides, chapitre 3. Ceci a nécessité le montage d'un dispositif pompe-sonde pour l'étude de la dynamique de transfert de charge. Enfin, nous avons étudié un processus de changement de conformation naturellement présent dans les organismes de mammifères en utilisant la spectrométrie de mobilité ionique comme sonde de conformation et de dynamique structurale, chapitre 4. Cette approche que nous avons développé a nécessité de combiner la spectrométrie de masse à des techniques de biologie moléculaire (expression, gel électrophorèse, dichroïsme circulaire, *etc.*). Cette combinaison a été possible grâce à deux collaborations sur le site de Lyon.

Chapitre 1

Montage expérimental et instrumentation

Introduction

Au cours de ma thèse, j'ai été amenée à mettre en place un dispositif de couplage entre des lasers et un spectromètre de masse afin d'étudier la dynamique conformationnelle de petits peptides. Grâce à ce spectromètre, il est possible de piéger les ions afin qu'ils puissent interagir par collision avec un gaz ou avec une source de lumière. J'ai pu également étudier des structures de peptides grâce à un spectromètre de mobilité ionique construit au laboratoire. Ce dernier permet de déterminer la forme globale d'une molécule en mesurant son temps de parcours dans l'appareil. C'est donc à la description de ces différents instruments que sera consacré ce chapitre.

Dans une première partie je parlerai de la source electrospray. Elle est la seule source qui ait été utilisée dans cette thèse afin d'ioniser et désolvater les molécules présentes en solution. C'est un atout dans l'analyse de molécules biologiques et complexes moléculaires car c'est une source d'ionisation douce qui permet de préserver l'intégralité des analytes et des complexes moléculaires. Le spectromètre de masse de type piège linéaire et le couplage avec un montage pompe-sonde laser seront ensuite présentés. Enfin le spectromètre de mobilité ionique sera décrit ainsi que son couplage avec une source de lumière.

I Source ESI/nano-ESI

I.1 Source ESI

La source d'ion est l'endroit où sont générés les ions en phase gazeuse, en amont du spectromètre de masse. La source utilisée avec nos appareils est la source d'ionisation par electrospray (ESI) figure I.1. Elle permet le passage de l'échantillon de la phase liquide à la phase gazeuse tout en chargeant les molécules positivement (ou négativement selon le mode d'utilisation du spectro-

mètre de masse). Un solvant volatil (méthanol, acétonitrile, *etc.*) facilite la désolvatation lors de l'ionisation.

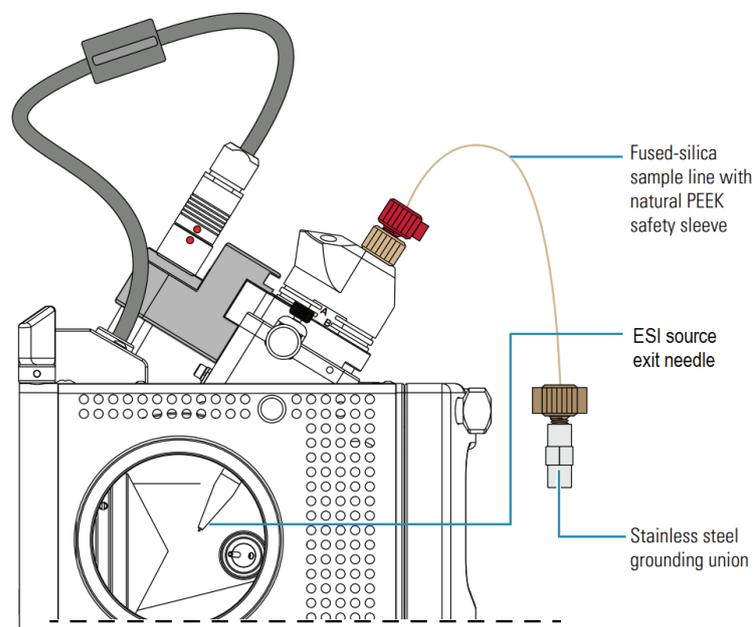


FIGURE I.1 – Schéma de la source ESI, Thermofisher (source: Thermofisher Ion max API source Hardware manual)

L'ionisation par electrospray date de la fin du XX^{ème} siècle et est depuis utilisée pour l'analyse d'échantillon d'intérêt biologique, comme les pesticides, antibiotiques, acides nucléiques, *etc.* Elle a fait l'objet d'un prix Nobel en 2002, dont le lauréat est J. Fenn, puisqu'elle permet de limiter la fragmentation des molécules dans la source, d'observer des molécules de masse et de charge importante ainsi que de créer des ions multichargés. Il s'agit donc d'une source d'ionisation "douce". Elle demande peu d'échantillon, en terme de concentration et de volume, comparée à d'autres sources d'ionisation préexistantes (comme l'ionisation électronique) et permet d'observer les ions pseudo-moléculaires.

I.1.a Formation de gouttelettes chargées

Dans cette thèse, l'échantillon est introduit par infusion directe dans la source, *via* un capillaire de silice métallisé, de diamètre interne de 100 μm avec un débit de 2 à 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Un potentiel de 5 kV est appliqué sur la pointe du capillaire. Le champ électrique qui règne alors va déformer le ménisque de la solution au niveau de la sortie et créer un cône de Taylor comme montré sur la figure I.2. Des gouttelettes chargées de quelques μm de diamètre vont se détacher de ce cône lorsque les forces de répulsion des charges qui s'accumulent dépassent les forces de tension de surface du fluide.[44]

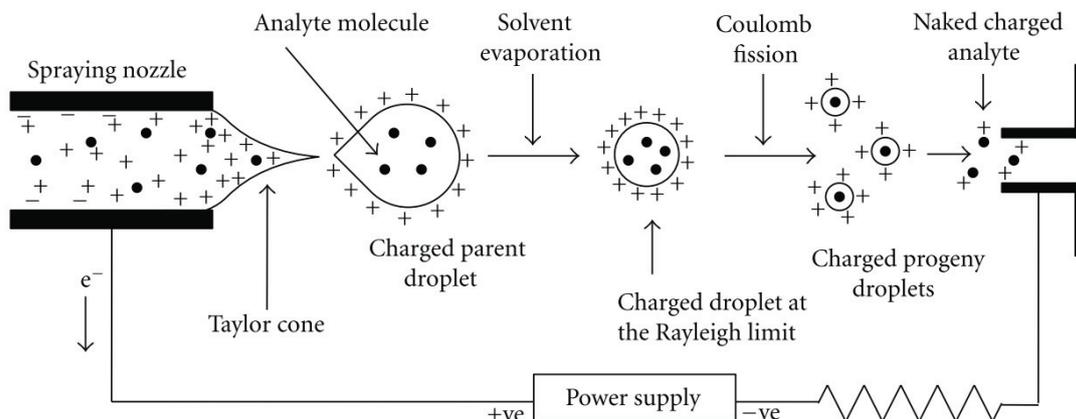


FIGURE I.2 – Schéma représentatif du processus de nébulisation electrospray [43]

I.1.b Désolvatation des gouttelettes

Un flux de gaz de nébulisation (ici, nous utilisons de l'azote (N_2)) et une température de 200 à 250°C, aide le solvant à partiellement s'évaporer tout en conservant les charges dans la gouttelette. Ces charges vont se répartir à la surface des gouttelettes. Ces dernières migrent vers l'entrée du spectromètre de masse sous l'effet du champ électrique mais aussi du gaz de nébulisation. La taille des gouttelettes va progressivement diminuer par évaporation du solvant à l'aide du gaz et du chauffage. Lorsque la répulsion électrostatique entre les charges de surface dépasse la tension superficielle de la gouttelette (limite de Rayleigh [45]), il en résulte la fission de la gouttelette en plusieurs plus petites. Cette réaction de fission aura lieu plusieurs fois au cours de son voyage jusqu'à l'entrée du spectromètre pour produire des gouttelettes de plus en plus petites et chargées jusqu'à atteindre des tailles de l'ordre du nm.

I.1.c Formation de molécules chargées

Le mécanisme qui décrit le processus de formation des ions de grande masse moléculaire est soumis à 2 modèles [46, 47] (un troisième concerne les espèces de faible masse moléculaire figure I.3(a)). La figure I.3(b, c) est un schéma représentatif de ces modèles:

- Le modèle de la charge résiduelle (CRM) est prévu pour les grosses espèces globulaires comme les protéines, figure I.3(b). Ce modèle prévoit que la fission de la gouttelette ait lieu jusqu'à ce qu'elle ne contienne plus qu'un seul analyte (sphère rouge sur la figure). L'évaporation complète du solvant (en bleu) conduit à l'accumulation des charges sur l'analyte. Dans ce modèle, l'état de charge de la molécule ne dépend pas de la composition en acides aminés (acides, basiques *etc.*) et la charge des acides aminés dont la dite molécule est constituée.
- Modèle d'éjection de la chaîne (CEM), concerne les chaînes de polymère non-polaire, *e.g.*, les protéines désordonnées. Le CEM prévoit que lorsque la protéine se situe dans une "nanogoutte"

de rayon inférieur à 10 nm, elle migre vers la surface. Dès lors qu'une extrémité de la chaîne est expulsée vers la phase gazeuse, le reste de la chaîne est progressivement éjecté de la goutte. Le nombre maximum de charges supportées par la molécule correspond au nombre maximum de charges tolérables par une gouttelette de solvant de même taille que la molécule.

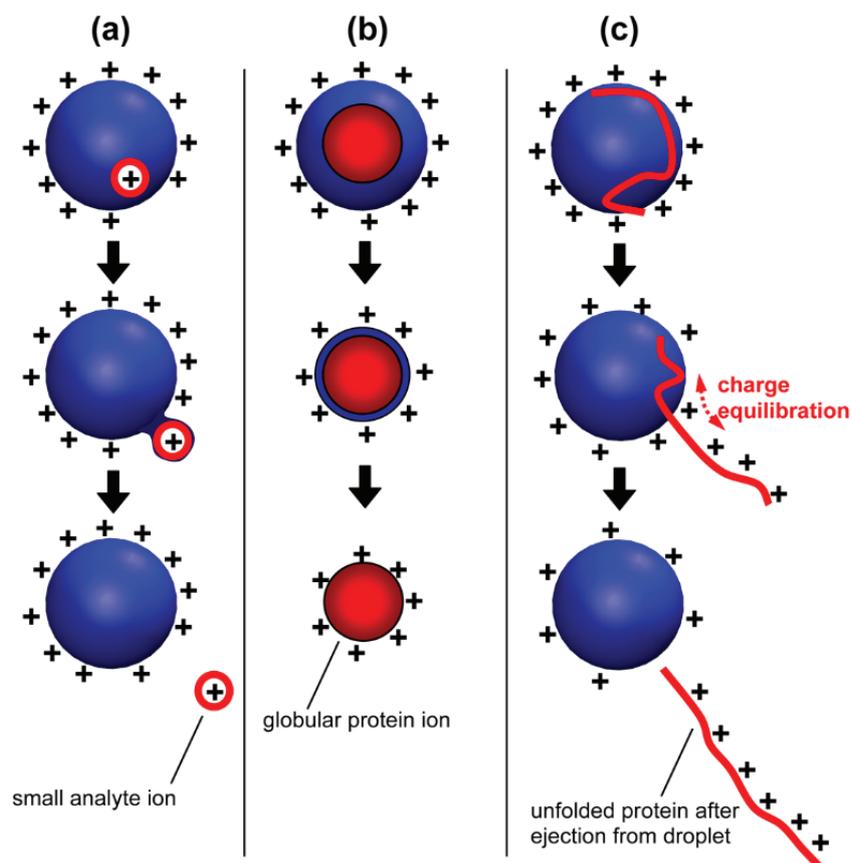


FIGURE I.3 – Schéma présentant les différents modèles de désolvation décrits par Konermann *et al.* (b) modèle CRM, (c) modèle CEM.[47], le modèle (a) ne s'applique qu'au petites molécules nous de commenterons donc pas ce modèle

I.2 Source Nano-ESI

La nano-ESI a été développée par Wilm et Mann.[48]

Cette nouvelle source s'est révélée être prometteuse dans le domaine de la spectrométrie de masse et dans l'analyse de molécules biologiques.

I.2.a Nano-ESI vs ESI

La pointe du capillaire en verre est inférieure à 1 μm . De ce fait, le cône de Taylor est beaucoup plus petit et les gouttelettes générées sont de diamètre réduit d'un ordre de grandeur. De plus, le

flux d'échantillon sortant du capillaire est de l'ordre du nL/min.[49] C'est pourquoi, cette source ne nécessite qu'une très faible quantité d'échantillon. Elle ne nécessite pas de gaz nébuliseur ni de pousse seringue pour assister la formation du spray. L'application d'une différence de potentiel entre la pointe de la source et le spectromètre de masse crée un champ électrique qui entraîne les gouttelettes à l'intérieur du spectromètre et la tension appliquée nécessaire à la formation du spray est de l'ordre de 800 V.[50] Elle permet aussi de réduire les effets nuisibles des sels en limitant la formation d'adduits ce qui permet de conserver les conformations natives des protéines et d'augmenter le S/N.[51–53] Elle tolère une concentration en sels dans le solvant allant jusqu'à 100 mM (contre 10 mM en ESI). Cette source est donc un excellent outil pour analyser des molécules et des complexes non-covalents dû au faible nombre de charges restant sur l'analyte (diminution des répulsions coulombiennes intramoléculaires) et au processus de désolvatation qui, comme l'ESI, ne rompt pas les liaisons non-covalentes.

I.2.b Nano-ESI en pratique

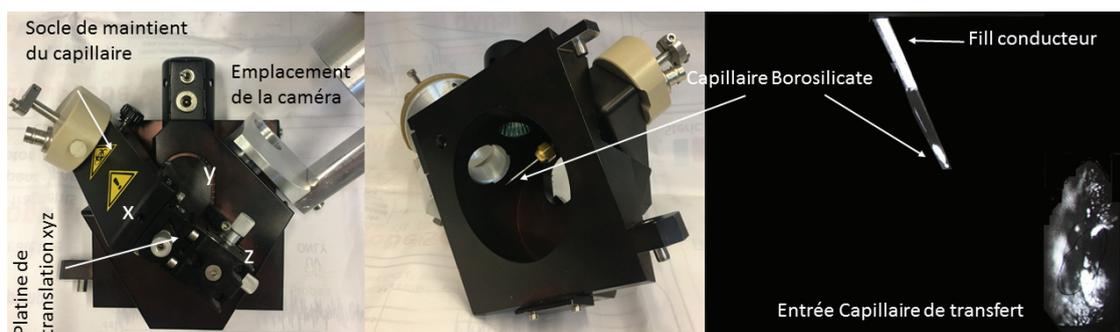


FIGURE I.4 – Photo de la source nano-ESI utilisé au laboratoire

La source nanoESI utilisée a été fabriquée au laboratoire pour une utilisation sur des appareils du constructeur Bruker. Les capillaires (indiqué sur la photo de droite, figure I.4), pointe de la source nano-ESI où a lieu la formation des gouttelettes, utilisés sont produits au laboratoire à partir de tubes de borosilicate de diamètre interne 1 mm, en utilisant une "pipette puller". La taille de l'ouverture du bout de la pointe produite après "étirage" est inférieure à 1 μm .

Un fin fil conducteur est alors introduit dans le capillaire rempli d'échantillon. Le fil est porté à la masse alors qu'une différence de potentiel de 600 à 1100 V est appliquée à l'entrée du spectromètre. Le capillaire est ensuite introduit dans un socle (indiqué figure I.4) qui sera maintenu devant l'entrée du spectromètre de masse. La température appliquée sur la source est d'environ 50°C à 80°C. Le socle dans lequel est maintenu le capillaire est fixé à un support de translation (présenté sur la photo de gauche figure I.4), permettant de positionner la pointe devant l'entrée du spectromètre dans les trois directions de l'espace. Un alignement optimal (distance et orientation de la pointe par rapport à l'entrée du spectromètre) est indispensable pour que le spray soit formé. De même, la différence de potentiel appliqué entre la source et le spectromètre est réglée pour chaque échantillon (dépend

de la composition) afin de former un spray dont le flux d'échantillon est le plus faible possible (pour que la consommation d'échantillon soit minimale et le spectre de masse soit optimal) et d'éviter les décharges qui peuvent endommager la pointe.

II Spectrométrie de masse

II.1 Le piège à ions

L'un des spectromètre de masse utilisé est un appareil commercial, conçu par Thermo Fischer Scientific. Il s'agit du modèle LTQ VELOS, un piège (ou trappe) linéaire quadripolaire représenté sur la figure suivante.

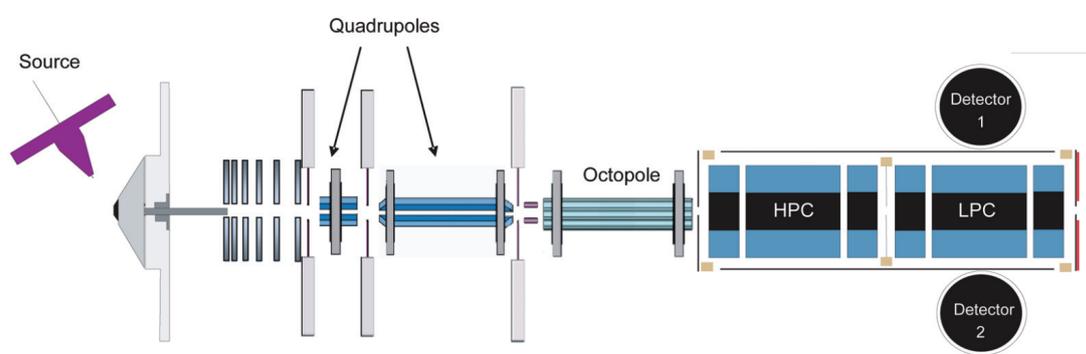


FIGURE II.5 – Schéma du spectromètre de masse LTQ VELOS avec la source ESI (violet), "HPC" la cellule haute pression, "LPC" la cellule basse pression, "detector 1-2" les détecteurs. (Source : Thermo scientific, *LTQ series manuel d'utilisation*)

La figure II.5 ci-dessus est un schéma du spectromètre de masse sur lequel sont annotées les différentes parties. Après que les molécules aient été ionisées dans la source (violet sur la figure II.5), elles sont guidées et focalisées au passage des optiques de guidage, deux quadripôles et un octopôle. Un système de pompage différentiel permet d'abaisser la pression, de la pression atmosphérique jusqu'à 10^{-5} Torr, au niveau des détecteurs.

À l'origine, le LTQ ne contient qu'un seul piège, dans lequel ont lieu les différents types d'interactions (*e.g.* collisions, laser, réactions chimiques *etc.*) et la détection. La présence du piège et des détecteurs au sein d'une même chambre impose un consensus entre un niveau de vide suffisant qui permette une bonne focalisation des ions, une bonne efficacité de fragmentation et une détection optimale des ions (bonne sensibilité). Ici, nous utilisons le modèle LTQ avec "pièges à double pression". Les deux pièges sont positionnés l'un à la suite de l'autre, "HPC" et "LPC" sur le schéma II.5. La pression en He dans ces deux pièges est différente. De fait, on pourra conserver une fragmentation et un piégeage des ions optimal en appliquant une "haute" pression en gaz tampon et une sensibilité de détection plus importante du fait d'une faible pression au niveau des détecteurs.[54]

L'injection du gaz tampon se fait dans la chambre au niveau du piège haute pression, par conséquent, la pression est plus haute dans ce piège (par rapport au LTQ avec un seul piège). Ainsi, les collisions avec le gaz étant plus fréquentes, les ions sont moins soumis à la diffusion, les pertes d'ions sont alors bien plus faibles, et lors d'une expérience CID, la probabilité qu'il y ait des collisions énergétiques efficaces formant des fragments est plus grande. En revanche, le pompage différentiel a lieu dans la chambre au niveau de la LPC et des détecteurs. La pression au sein de la chambre (et du piège) est alors plus faible que dans le HPC. La détection est donc plus sensible. L'orifice présent sur l'électrode située au fond du piège basse pression schématisé en rouge sur la figure II.5 a été élargie pour atteindre un diamètre de 5 mm afin de permettre le passage d'un faisceau laser (cette modification sera présentée plus en détail dans la partie III de ce chapitre). De fait, la pression dans les piège LPC et HPC est plus faible que dans l'instrument d'origine. La pression est donc inférieure à 3.5×10^{-4} Torr et 5×10^{-3} Torr, respectivement, dans les cellules LPC et HPC (ces valeurs de pression sont fournies par le constructeur).

Du fait de la présence de ces deux pièges dont l'utilisation est simultanée, il est possible de piéger des ions tout en procédant à la détection des ions du piégeage précédent. Par conséquent, la vitesse de balayage de cet instrument est multipliée par 2.

II.2 Spectrométrie de masse en tandem : MS^n

La présence de ces deux pièges offre donc des avantages en ce qui concerne la sensibilité et la vitesse de fonctionnement. Dans cette partie nous aborderons les principes d'utilisation de ce piège employés lors des différentes expériences.

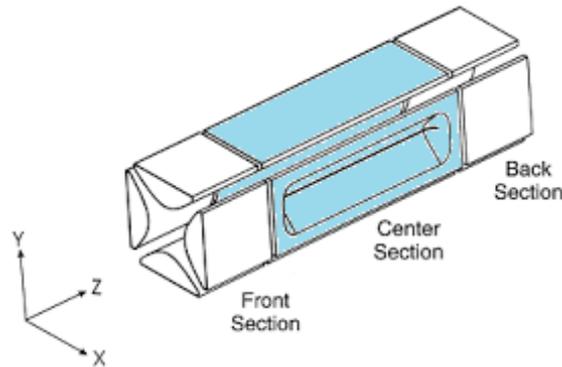


FIGURE II.6 – Schéma d'un piège linéaire quadripolaire

Les analyseurs linéaires quadripolaires sont des pièges radiofréquence, figure II.6. Ils ont pour fonction de sélectionner et piéger les ions. Ils permettent de séparer les ions en fonction de leur rapport m/z . Le couple de valeur U (une tension continue) et V (une tension alternative) permettant aux ions de rester au centre du piège ($x, y < \pm r_0$ la taille du piège, ils sont libres selon l'axe

z) définit une zone de stabilité. Si le couple de tensions U, V appliquées n'est pas dans la zone de stabilité de l'ion de rapport m/z donné, cet ion sera éjecté du piège car instable au sein de celui-ci ($x, y > \pm r_0$). La séparation des ions en fonction de leur rapport m/z est possible en balayant les valeurs de U tout en conservant le rapport U/V constant. On observera alors tous les ions dont la zone de stabilité ($x, y < r_0$) est coupée par la droite de fonctionnement (droite décrite par U/V constant), les autres seront éjectés. Ces zones de stabilité sont décrites par les équations de Mathieu.

La partie centrale représentée en bleu sur la figure II.6 est celle dans laquelle les ions sont confinés et où les tensions U et V sont appliquées. Les deux parties aux extrémités, en blanc sur cette même figure, sont des électrodes qui bloquent les ions selon l'axe z par l'application d'un potentiel statique. Ce piège permet d'utiliser le spectromètre de masse en tandem (MS/MS ou MS^n). Après sélection des ions précurseurs de rapport m/z , dans le quadripôle, ils peuvent être piégés au moins une dizaine de secondes (mesures résolues en temps dans la partie "état triplet de la Rhodamine" du chapitre 2). Dans le piège, les ions interagissent avec le gaz tampon. Lors du piégeage, il est alors possible de générer des collisions suffisamment énergétiques pour que les ions se fragmentent. En effet, lors des collisions, il s'opère un transfert d'énergie cinétique en énergie interne de l'ion. Cette augmentation d'énergie interne se traduit par un chauffage de l'ion. Lorsque le chauffage vibrationnel dépasse la barrière de dissociation, cela provoque des ruptures de liaisons de l'ion précurseur et produit des ions fragments.[55, 56] Le processus d'activation peut être également induit par l'absorption de photons grâce à l'introduction d'un faisceau laser dans le piège (cf. partie III). On peut choisir de sélectionner, piéger et exciter les ions dans un piège ou dans l'autre (HPC ou LPC). Les ions fragments générés peuvent également être de nouveau sélectionnés selon leur rapport m/z et subir de nouveau des collisions énergétiques ou bien être photo-activés. Cette sélection successive d'ions peut être réalisée n fois dans le piège (MS^n).

II.3 La spectrométrie de masse native : étudier la structure native de protéines et de complexes protéiques

La structure native d'une protéine est la forme tridimensionnelle qu'elle adopte dans le milieu biologique et qui lui confère sa (ou ses) fonction biologique. Cette structure est généralement admise comme la plus stable thermodynamiquement.[57] Les protéines sont, pour la grande majorité, dotées d'une structure 3D particulière. Cette structure reste cependant une caractéristique dynamique et la protéine peut explorer un paysage conformationnel plus étendu. Le paysage conformationnel d'une protéine structurée peut être assimilé à un puits dont les rebords sont rugueux, représentant des minima locaux et un minimum global. Ce minimum global est en fait la structure "native" ou fonctionnelle de la protéine. Les minima locaux sont toutefois des zones accessibles par la molécule. Ayant une structure qui évolue dans le temps, une protéine peut donc adopter successivement les différentes conformations associées aux minima locaux avec une probabilité inférieure au minimum global. En outre, ces minima donnent tous accès à des voies qui mènent au minimum global, donc à la structure native, la plus probable.[58] Le paysage conformationnel des IDP (protéines intrin-

sèquement désordonnées) en revanche, ressemblerait à un plateau "rugueux" sans minimum global. La protéine n'adopte donc pas de structure particulière mais évolue autour des différents minima locaux avec des probabilités équivalentes.[57]

De nombreuses techniques d'analyse permettent d'étudier la structure native des protéines telles que la cristallographie par rayons-X, la résonance magnétique nucléaire (RMN) ainsi que la cryo-microscopie électronique (cryo-EM). La cristallographie a notamment permis d'obtenir la structure d'un très grand nombre de protéines structurées. Cette technique a permis de nourrir une très grande base de données de structures 3D de protéines de taille variable (jusqu'à 10^6 g.mol⁻¹) appelée *Protein Data Bank* (PDB). Cependant cette technique nécessite une grande quantité de molécules et la cristallisation des protéines. Cette étape demande du temps et n'est pas toujours facile à effectuer. De plus, la collecte des mesures ainsi que l'analyse des résultats peuvent prendre jusqu'à plusieurs mois.[59] La diffraction aux rayons-X pose donc des difficultés dans la mise en place, exige beaucoup de temps et n'est pas applicable aux IDP.

D'autre part, l'analyse par résonance magnétique nucléaire s'est révélée être un atout majeur dans l'étude de la structure de protéines. Elle a notamment permis de compléter les données de structures des protéines dans la base de données PDB. L'analyse RMN des protéines se fait en phase liquide et solide. En phase solide, la RMN permet d'étudier des systèmes beaucoup plus gros car elle donne des spectres moins complexes. La phase solide permet de "figer" les structures et donc de limiter la complexification de l'analyse due à la dynamique des protéines en phase liquide. Les progrès de la RMN permettent aujourd'hui de résoudre la structure de protéines de la taille de l'ordre de la centaine de kDa.[60] Cependant, si l'analyse de la structure de protéines jusqu'à 25 kDa est aujourd'hui maîtrisée, celle d'édifices plus volumineux est plus complexe en phase liquide (les spectres sont plus complexes dû à la plus grande quantité de couplages et à la dynamique des molécules à température ambiante).[61] En effet, la solubilité, la dynamique et la complexité des spectres (spectral crowding) peut s'avérer être un défi. Cette complexité s'avère être également riche en informations puisque les spectres peuvent permettre d'accéder à un grand nombre de structures différentes de la molécule. En revanche, la complexité des spectres peut être réduite en utilisant le marquage isotopique sur des sites spécifiques de la molécule. Toutefois, cette méthode réduit également la quantité de protéines analysables car la quantité de sites marqués ne permet pas d'observer l'intégralité de la molécule. Aussi l'analyse par RMN demande beaucoup de temps (1 à 2 semaines) et de quantité d'échantillon du fait de la faible sensibilité de détection (\sim mmol.⁻¹) et le coût du matériel de marquage isotopique peut également être un inconvénient à cette technique.[62]

La cryo-microscopie électronique est une technique d'analyse émergente dans le domaine de l'étude de structure 3D de molécules biologiques. Cette technique consiste à congeler très rapidement les solutions de molécules à analyser de manière à les "figer" dans leur structure native. L'analyse par microscopie électronique permet d'obtenir l'image de molécules uniques. Les struc-

tures obtenues sont rassemblées dans une base de donnée spécifique à la cryo-EM, la "Electron Microscopy Data Bank" (EMDB). Les progrès en terme d'instrumentation et de traitement de données permettent aujourd'hui d'obtenir des images de plus en plus résolues. Son atout par rapport à la DR-X est qu'elle ne nécessite pas de cristalliser les protéines et que celles-ci peuvent être congelées dans une solution proche du milieu natif en terme de pH et de concentration en sels.[63]

La spectrométrie de masse native a vu le jour après l'apparition de la source électrospray. Cette source permet de conserver la structure des protéines et complexes protéiques.[32] La spectrométrie de masse native correspond à une approche "top-down" de l'étude de protéines et de complexes non covalents. Cette technique apporte des informations complémentaires aux techniques plus conventionnelles sur la structure de protéines (RMN, rayons-X).[30] En effet, la native-MS permet d'obtenir des informations sur la stœchiométrie d'édifices moléculaires (*e.g.* les protéines avec structure quaternaire) ainsi que la structure et la dynamique structurale de protéines de très grande taille (virus, anticorps).[64, 65]

Qu'est-ce que la native MS exactement? Quels sont ses atouts? Il s'agit d'appliquer des conditions idéales à la conservation de la structure native des molécules depuis leur stockage en phase liquide jusqu'à la détection en masse en passant par l'ionisation. Les protéines sont des molécules existant à l'origine dans le milieu biologique (intracellulaire, extracellulaire, mitochondrie *etc.*). Les conditions dites natives correspondent en général à une solution aqueuse concentrée en sels et à pH neutre, mais ne sont pas nécessairement adaptées à l'ionisation par électrospray. Les sels peuvent encrasser l'instrument en formant des agrégats de sels dans la source, entraver l'ionisation de la protéine en nuisant à la désolvatation et créer des adduits avec la protéine et donc complexifier le spectre de masse.[66–68] Ainsi les conditions en phase liquide doivent respecter deux conditions : conserver la structure et être compatibles avec l'ionisation par électrospray. L'usage d'une solution d'acétate d'ammonium à pH 7 s'est avéré respecter ces deux conditions.[69] La solution d'acétate d'ammonium n'est pas un tampon, le pH neutre n'est donc pas garanti. L'acétate d'ammonium reste cependant un bon candidat car très volatil et donc compatible avec l'ESI. De plus, quand bien même ce n'est pas un tampon, l'acétate d'ammonium limite la chute du pH lors du processus ESI à 4.5 contre un pH plus faible pour l'eau pure.[70] Par la suite, l'ionisation par électrospray, même s'il s'agit d'une source d'ionisation favorable à la native-MS doit être effectuée à des conditions les plus douces possible (surtout lorsqu'il s'agit de complexes se dissociant aisément). C'est à dire que les tensions appliquées au niveau de la source doivent être les plus faibles possibles (tout en maintenant l'ionisation suffisante de l'échantillon) de manière à ce que le transfert (et la désolvatation) depuis la source jusqu'à la détection soit le plus progressif possible.

La figure II.7 provient d'une étude de Heck *et al.* sur l'édifice macromoléculaire *Helicobacter pylori* uréase par spectrométrie de masse et est un exemple de l'atout qu'est la spectrométrie de masse native pour l'étude de complexes.[64] *Helicobacter pylori* uréase est constitué de plusieurs

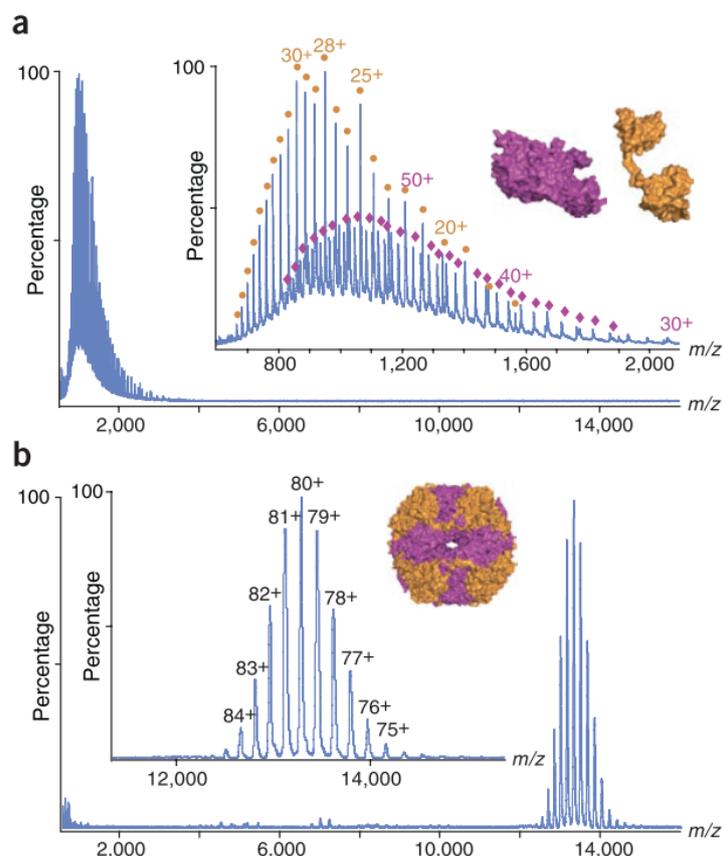


FIGURE II.7 – (a) Spectre de masse de *H. pylori* urease dénaturée. (b) Spectre de masse de l'uréase native. Figure extraite de la référence [32]

sous ensembles moléculaires. Ce complexe est maintenu essentiellement par des liaisons hydrogène et électrostatique qui peuvent se dégrader en solution ou lors du processus electrospray lors de l'analyse ESI-MS "classique". L'origine de la rupture de ces liaisons n'est pas connu et le spectre de masse montre une variété de sous-ensembles issus de l'uréase. L'analyse par ESI-MS native a permis d'observer l'édifice intact dans un premier temps. Puis à partir du complexe, la dissociation par collision à permis d'identifier les sous-ensembles le constituant.

La MS native est donc une technique à la fois rapide et sensible. Elle permet d'analyser des échantillons de composition complexe et en faible quantité. Enfin, il est possible d'étudier des complexes protéiques sans les dissocier.

La nano-ESI est utilisée en native-MS pour sa grande tolérance à la présence de sels en solution. Cette source est compatible avec des conditions en solution largement utilisées dans le domaine de l'étude de molécules biologiques, plus adaptées à la conservation de la structure native, tout en

garantissant l'ionisation et l'analyse par spectrométrie de masse.[50, 53]

La MS native couplée à la spectrométrie de mobilité ionique a également amené des informations structurales en complément de la spectrométrie de masse.[32] Ce couplage permet d'obtenir des informations sur la forme globale de la molécule ainsi qu'une valeur de section efficace de collision qu'il est alors possible de comparer aux valeurs théoriques calculées à partir de données de RMN ou de cristallographie.

III Couplage pompe-sonde laser et MS

Un accès optique (trou et hublot) a été aménagé dans le bâti sous vide hébergeant les pièges à ions, à l'arrière du spectromètre de manière à pouvoir introduire un faisceau lumineux à l'intérieur du piège et engendrer des interactions de type excitation, fragmentation, *etc.* avec les ions. Il a été placé de manière à être aligné avec les deux pièges (HPC et LPC). De plus, l'électrode qui se situe à l'arrière du spectromètre a été agrandie pour atteindre un diamètre de 5 mm. Le faisceau peut pénétrer, sans trop être coupé, au centre des deux pièges. Enfin, le trou a été bouché par une fenêtre de silice fondue de manière à conserver la pression adéquate dans les pièges ainsi que la transmission de la lumière.[23]

III.1 Montage expérimental

Le couplage du piège avec un laser ayant été utilisé depuis de nombreuses années, je me focaliserai ici sur la description du montage à deux couleurs permettant des mesures résolues en temps. Un premier laser émet dans l'UV avec une longueur d'onde de 266 nm, un autre émet dans le visible à 545 nm. Ces deux lasers sont des lasers pulsés pompés par des cristaux Nd:Yag, de 5 ns de largeur d'impulsion et de fréquence 10 Hz.

III.1.a Fonctionnement laser

Ces lasers sont pompés optiquement par des lampes flash puis Q-switchés pour engendrer les impulsions. Le "Q-switch" permet de générer des impulsions laser intenses et courtes, 5 ns pour les modèles utilisés ici.

Les lampes flash induisent le pompage au niveau excité du milieu amplificateur (cristal de Nd:Yag). L'inversion de population est optimale après $\sim 200 \mu\text{s}$ de pompage optique. Ainsi, dès lors que l'inversion de population atteint le niveau souhaité, la cavité laser est "ouverte", et les photons générés par émission stimulée sont accumulés dans cette cavité. Ce déclenchement de l'émission stimulée très rapide forme alors une impulsion laser très courte et très intense.

La longueur d'onde des photons générés par émission stimulée à partir du pompage du cristal Nd:Yag est de 1064 nm. On obtient un faisceau à 266 nm à partir de la 4^{ème} harmonique (FHG)

du faisceau fondamental. La puissance mesurée du faisceau UV émergent après FHG est de 2 mJ par impulsion. La deuxième couleur désirée étant à 545 nm, il est impossible de l'obtenir par simple génération d'harmonique à partir du Nd :Yag. Un Oscillateur Paramétrique Optique (OPO, horizon) pompé par le second laser Nd:Yag (Surelite I, Continuum) est donc utilisé.

Un OPO permet, grâce à l'optique non-linéaire, de former un faisceau monochromatique de l'UV au lointain infrarouge. En effet, en partant d'un photon incident de fréquence ω_p , son passage dans le cristal non-linéaire va créer deux nouveaux photons de fréquence plus faible que celle du photon incident : ω_s pour signal et ω_i pour idler (ou complémentaire) 1.1.

$$\omega_p = \omega_s + \omega_i \quad (1.1)$$

L'OPO fonctionne à partir de la 3^{ème} harmonique du laser Nd :Yag (355 nm) et la gamme de longueur d'onde est de 410 nm à 680 nm. Il permet donc d'obtenir une longueur d'onde de 545 nm en sortie d'OPO pour le signal (et 1018 nm pour l'idler).

III.1.b Montage optique

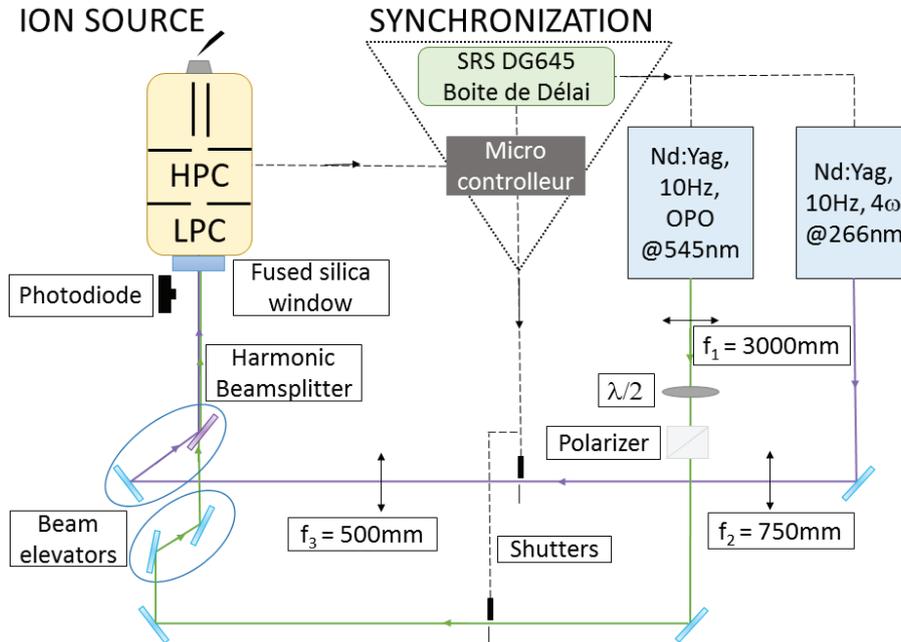


FIGURE III.8 – Schéma du montage pompe-laser couplé au spectromètre de masse

Les mesures résolues en temps qui seront présentées dans cette thèse nécessitent l'utilisation de deux faisceaux laser, pompe et sonde. Pour que les deux faisceaux pompe et sonde puissent interagir avec les ions piégés, il est nécessaire de recombinaison des faisceaux en amont du spectromètre de masse. La figure III.8 est un schéma du montage optique mis en place pour les expériences de pompe-sonde

laser.

La ligne violette représente le faisceau UV. Les miroirs (rectangles bleus) sont des miroirs protégés par un film d'aluminium qui offre une réflectance de 90% dans l'UV (à partir de 250 nm) mais surtout qui protège leur surface. Un périscope a également été placé pour élever le faisceau à la hauteur de la fenêtre d'entrée du spectromètre de masse. Deux lentilles de distance focale 750 mm et 500 mm ont été placées sur le chemin optique de manière à réduire la taille du faisceau laser à l'intérieur du spectromètre de masse. Enfin un obturateur est placé sur le chemin optique de façon à bloquer le passage du faisceau en temps voulu (cette notion sera abordée dans la partie suivante "Synchronisation").

La ligne verte correspond quant à elle au faisceau laser visible (à 545 nm). Ce faisceau passe à travers une lentille, pour réduire sa taille dans les pièges. Il passe ensuite à travers une lame demi-onde ($\lambda/2$), puis par un polariseur. Ce dispositif permet de réduire la puissance du faisceau laser en sortie de polariseur en jouant sur l'orientation de la lame à retard de phase par rapport au faisceau.

La lame à retard de phase $\lambda/2$ est un appareil optique capable de modifier la polarisation de la lumière. Elle est constituée d'un matériau biréfringent. Dans ce matériau, les deux composantes de la lumière ne se propagent pas à la même vitesse selon l'axe lent (perpendiculaire à l'axe optique, axe x sur le schéma III.9) ou l'axe rapide (parallèle à l'axe optique, axe z sur le schéma III.9). La lame $1/2$ onde peut retarder la phase sur l'une des deux composantes de la lumière incidente ce qui provoque un déphasage. L'angle de rotation de la polarisation dépend de l'angle entre la polarisation incidente et l'axe de la lame (représenté par une flèche pointillée figure III.9). Une lame $\lambda/2$ dont l'angle avec la polarisation incidente est θ , induira une rotation de la polarisation de 2θ et un déphasage de π du faisceau en sortie.

Sur la figure III.9 est présenté un schéma de l'état de polarisation d'un faisceau incident polarisé horizontalement après son passage dans une lame demi onde (cylindre gris) puis dans un polariseur (cube blanc). Le polariseur sépare les composantes verticales et horizontales d'une polarisation donnée. Dans notre cas, il transmet la polarisation horizontale et la polarisation verticale est réfléctée sur la face de séparation de faisceau (à l'intérieur du polariseur). L'onde ressortira orthogonalement au faisceau incident et transmis.

Ainsi, pour modifier l'intensité du laser, on peut jouer sur l'angle entre la lame $\lambda/2$ et l'onde incidente afin de faire varier l'amplitude de la composante horizontale, qui sera transmise par le polariseur et utilisée dans la suite du montage optique. Pour illustrer le fonctionnement de la lame demi onde et du polariseur sur l'atténuation du faisceau laser trois cas de figures sont décrits sur la figure III.9 :

- (A) La lame $\lambda/2$ fait un angle de 90° avec la polarisation incidente. Alors la polarisation

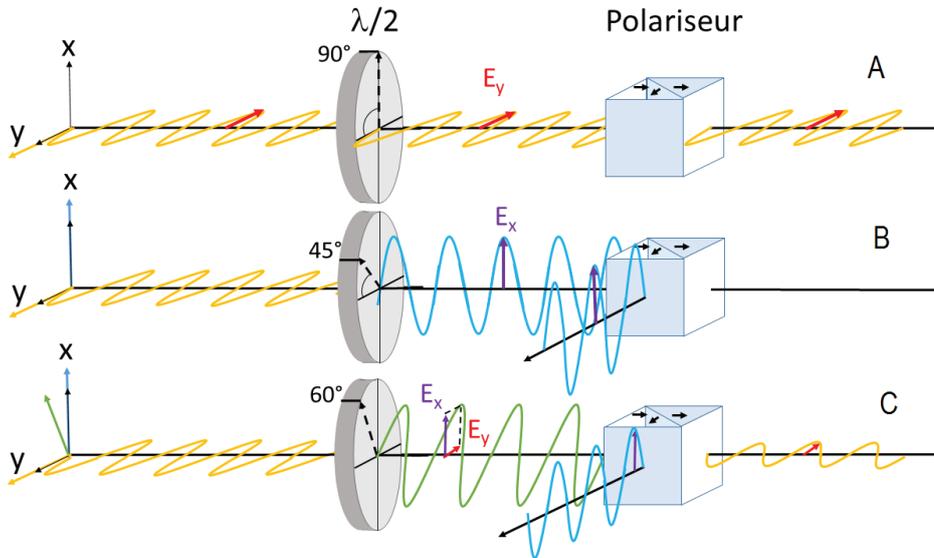


FIGURE III.9 – Schéma du montage du polarimètre pour modulation d'intensité

induite fait un angle de 180° avec l'incidente, soit pas de modification de la polarisation. La lame n'induit qu'un déphasage avec le faisceau incident polarisé horizontalement. Tout le faisceau est donc transmis par le polariseur puisque la composante verticale est nulle.

- (B) Lorsque l'angle est à 45° , la polarisation en sortie (en bleu sur le schéma) fait donc un angle de 90° avec l'onde incidente. La polarisation est donc passée de horizontale à verticale. La lame engendre un faisceau polarisé verticalement, le faisceau est donc totalement réfléchi dans le polariseur puisque cette fois la composante horizontale est nulle. Le faisceau laser ne peut continuer son trajet dans le montage présenté sur la figure III.8, c'est "l'extinction".
- (C) Si la lame fait un angle de 60° avec l'onde incidente, alors la polarisation résultante (en vert) fera un angle de 120° par rapport à la polarisation incidente. La polarisation résultante du passage dans la $\lambda/2$ possède une composante verticale (flèche violette) et horizontale (flèche rouge). Seule la composante horizontale est transmise par le polariseur, on observera donc une baisse de l'intensité du faisceau en sortie du système optique.

La lame $\lambda/2$ étant montée sur un socle rotatif, on pourra moduler l'intensité du faisceau en modulant manuellement l'angle de la lame demi onde. Ce système n'est pas en place sur le trajet optique du laser de pompe, nous avons donc joué sur le délai entre le déclenchement de la lampe flash et du Q-switch du laser pour faire varier l'intensité du faisceau (entre $200 \mu\text{s}$ et $300 \mu\text{s}$). Enfin, un obturateur et un périscope sont utilisés tout comme sur le trajet du faisceau UV présenté précédemment. Le dernier miroir utilisé en haut du périscope a été mis en place afin de recombinaison des faisceaux pour qu'ils puissent se recouvrir dans le piège à ions. Il s'agit d'un miroir dichroïque dont les propriétés sont de refléter le faisceau à 266 nm et de transmettre le 532 nm (la transmission à 545 nm reste suffisamment bonne). La différence de longueur du chemin optique parcouru par les deux

lasers, induit un délai de 10 μs entre les deux impulsions, déclenchées au même moment, lorsqu'elles atteignent la fenêtre d'entrée du spectromètre. Ce délai a été mesuré grâce à une photodiode placée devant cette fenêtre.

III.2 Synchronisation

Afin d'obtenir un dispositif expérimental qui permette de faire des mesures résolues en temps, nous avons synchronisé les instruments ensemble, c'est à dire le spectromètre de masse (le piégeage des ions plus précisément) et les deux lasers. Pour cela il nous faut savoir :

- À quel moment les ions sont prêts à interagir avec les lasers? C'est à dire à quel moment le piégeage commence (et se termine)?
- À quel moment les impulsions laser doivent arriver dans le spectromètre? Il nous faut pouvoir déterminer le moment où les lasers peuvent être déclenchés afin que les impulsions n'arrivent ni avant ni après que les ions soient piégés.
- À quel moment commencer un nouveau cycle de mesure?

III.2.a La spectrométrie de masse résolue en temps?

Tout d'abord, le spectromètre de masse utilisé, LTQ-VELOS ne fonctionne pas de manière régulière. En réalité la durée d'un cycle de mesure dépend de la vitesse de remplissage du piège à ions. En effet, cette vitesse est relative à la quantité d'ions formés par la source. Or cette quantité peut varier selon le flux d'échantillon sortant de l'électrospray. Thermo Scientific a breveté le mode "AGC" (Automated Gain control) qui permet de stopper le remplissage du piège lorsqu'il est optimal. Cette quantité est propre aux paramètres "internes" de l'appareil. Un courant d'ion est mesuré lors d'un préscan qui précède le scan analytique. Cette mesure permet ensuite à l'appareil de déterminer le temps d'injection des ions nécessaire pour le scan analytique. Lorsque le piège est rempli, les ions sont envoyés vers les détecteurs pour ensuite obtenir un spectre de masse c'est à dire un scan (on scanne la tension continue U tout en gardant le rapport U/V constant).

Différents modes de balayage ("scan mode") sont utilisables sur l'appareil. Ils permettent de jouer sur la vitesse de balayage des ions lors de la détection. Le mode "Enhanced" est l'un des plus lents accessibles. En utilisant ce mode on obtient des spectres plus résolus, les massifs isotopiques sont plus distincts. On peut alors mieux connaître la composition des ions.

Un autre paramètre qui a été utilisé est le temps de piégeage des ions dans la trappe. Ceci est possible en MS^2 , méthode où l'on peut contrôler à la fois l'amplitude de l'excitation mais aussi le temps d'activation collisionnelle, utilisée pour l'expérience de pompe-sonde laser. Cette durée de piégeage sera par la suite déterminée de manière à maintenir les ions piégés le temps de l'interaction avec les deux lasers (donc en prenant en compte le délai pompe-sonde), l'énergie de collision dans

cette expérience est maintenue à 0 (NCE = 0). Le signal indiquant le piégeage des ions sera utilisé comme déclencheur dans les expériences pompe-sonde décrites dans la partie suivante.

III.2.b Pompe-sonde laser et MS²

Pour mener à bien l'expérience pompe-sonde au sein du spectromètre de masse, il nous faut répondre à plusieurs contraintes. Il faut tout d'abord que les ions d'intérêt soient sélectionnés puis piégés. Il faut ensuite que les impulsions laser arrivent dans le spectromètre de masse séparées d'un délai contrôlé. Il faut qu'une seule impulsion par laser interagisse avec les ions. Enfin le cycle peut recommencer dès lors que de nouveaux ions sont prêts dans le piège.

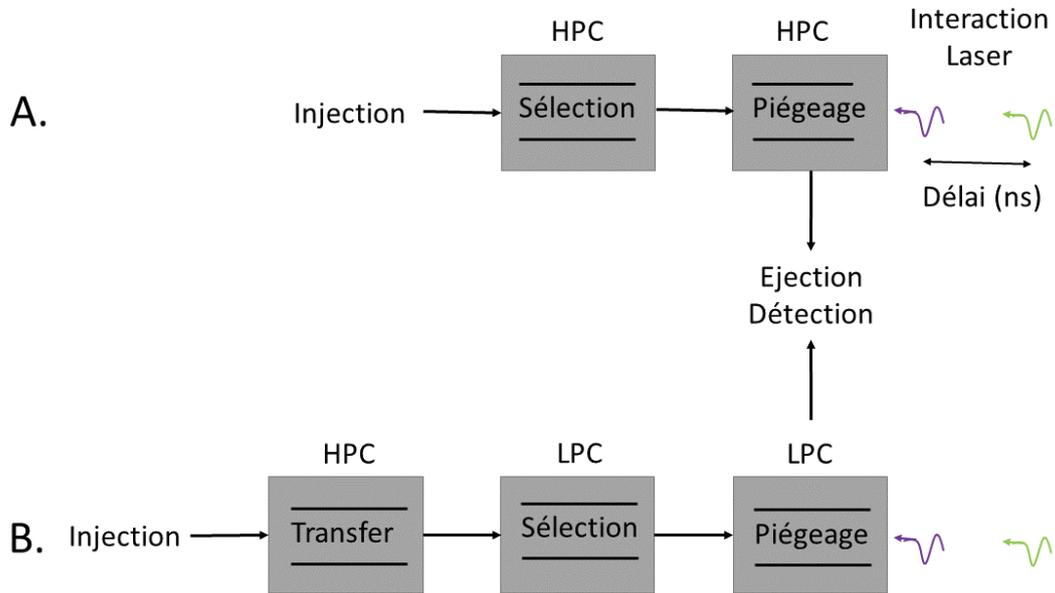


FIGURE III.10 – Schéma de la séquence des événements qui ont lieu au cours de l'expérience pompe-sonde au sein du spectromètre de masse

Le schéma III.10 présente les différentes étapes énoncées de l'expérience lorsque l'interaction a lieu dans le piège "haute pression", HPC (A) ou dans le piège "basse pression", LPC (B). Un boîtier de délai (Digital delay generator, DG645 Stanford Research Systems) a été utilisé comme déclencheur externe pour les deux lasers. Cet appareil peut générer des délais allant de 0 à 2000 ns avec une précision de 5 ps. Un générateur interne de fréquence permet de régler la fréquence interne désirée, soit 10 Hz (la fréquence optimale de fonctionnement des lasers).

Toutes les sorties du générateur de délai ont été utilisées afin d'instaurer les différents délais nécessaires à l'utilisation des lasers (durée d'impulsion, délai entre flash et Q-switch, *etc.*). Comme indiqué dans le manuel d'utilisation, les lasers continuum (surelite I et II) sont déclenchés par des impulsions crête descendant (5V → 0V → 5V) de 10 μs. Nous avons donc introduit 10 μs de durée

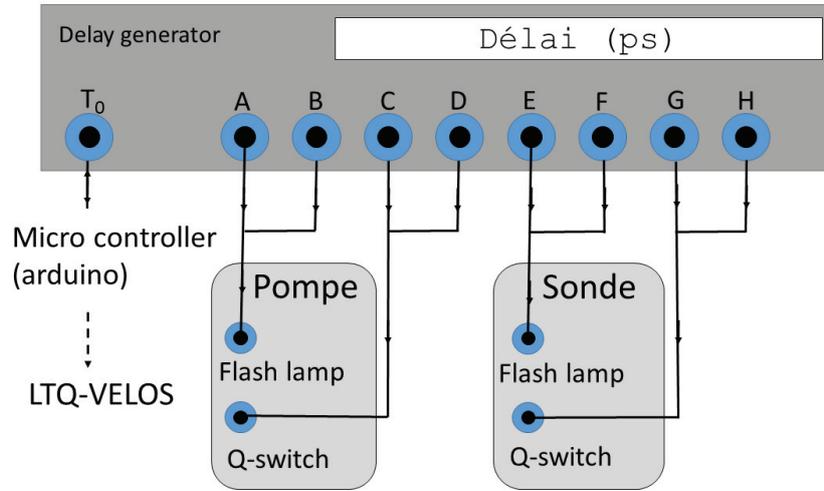


FIGURE III.11 – Schéma du branchement de la boîte de délai aux lasers

d'impulsion et un front descendant de 5V à 0V pour le déclenchement des lampes et du Q-switch, puis un délai entre ces deux derniers de $240 \mu s$. Le délai pompe-sonde est réglé sur le déclenchement des lampes flash des lasers (entre A et E sur le schéma III.11). Par définition, le délai pompe-sonde est le délai entre l'arrivée des impulsions pompe et sonde sur l'échantillon. Compte-tenu des différences de trajet optique entre les deux impulsions, un offset doit être ajouté à la différence numérique lue sur le générateur de délai entre les 2 Q-switch. Cet offset est déterminé en superposant temporellement les deux impulsions sur une photodiode à l'entrée du spectromètre de masse (= "faire le zéro").

Des obturateurs mécaniques sont positionnés sur les chemins optiques de manière à ne laisser passer qu'une impulsion pompe et sonde par scan. De cette manière, chaque spectre de masse enregistré correspond à une seule interaction pompe-sonde avec les ions piégés. Le but étant d'éviter l'absorption multiple des pulses pompe et/ou sonde par les mêmes ions (la raison est que la dynamique déclenchée par la pompe se déroule sur des temps longs et que la pompe comme la sonde peuvent être réabsorbées par les fragments et/ou l'espèce excitée, ce qui viendrait brouiller complètement la signature temporelle de la dynamique étudiée).

Compte tenu du fonctionnement irrégulier du spectromètre de masse et celui à 10 Hz des lasers, il n'est pas possible d'asservir les uns à l'autre ou vice versa. Il est par conséquent nécessaire de les faire fonctionner indépendamment mais de les interfacer avec des obturateurs contrôlés par quelques tests logiques que nous avons mis en œuvre avec un microcontrôleur (*Arduino*). Le rôle du microcontrôleur est de commander l'ouverture des obturateurs, d'une part si et seulement si les ions sont présents dans le piège, et d'autre part en s'assurant de l'ordre des impulsions laser (pompe d'abord puis sonde), dont le délai exact est, lui, contrôlé précisément par le générateur de délai.

Le schéma figure III.12 est une représentation visuelle et illustrative (pas à l'échelle) de la

succession des évènements qui se produisent lors de l'expérience.

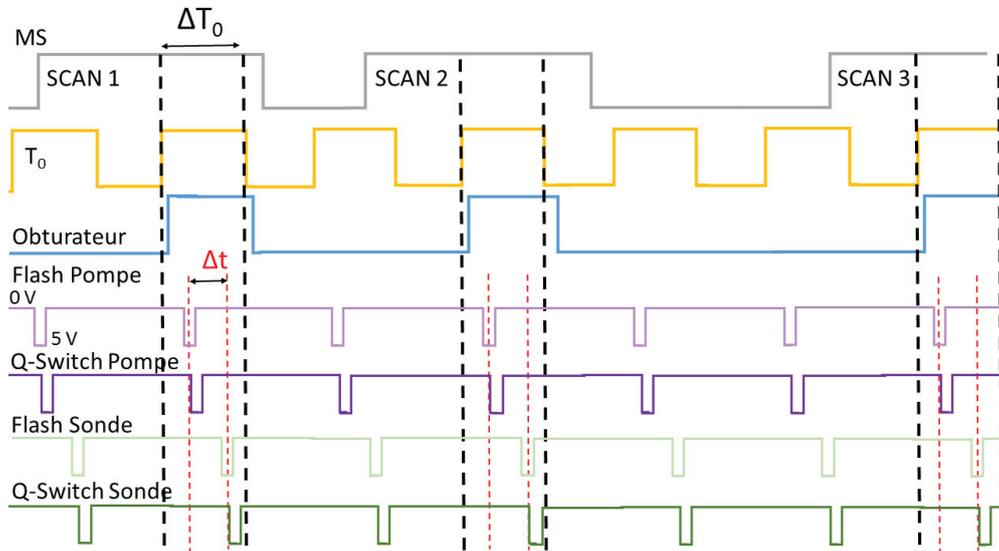


FIGURE III.12 – Schéma des signaux de synchronisation contrôlés grâce au microcontrôleur et au générateur de délais. Sont représentés : en gris le signal du piégeage des ions, en jaune le signal général "T₀" de sortie de la boîte de délais qui reste haut jusqu'au dernier front descendant (correspond à un cycle pompe-sonde des lasers), en bleu le signal d'entrée des obturateurs, en violet clair et foncé respectivement les signaux des lampes flashes et du Q-switch du laser de pompe et en vert clair et foncés les impulsions les signaux des lampes flash et Q-switch du laser de sonde.

```

1      digitalWrite(SHUTTERS, LOW) ; Initialement les shutters
      sont clos

2      while(1)
      {
3          while (digitalRead(MSIN)); Attendre fin du cycle MS
      precedent
4          while (!digitalRead(MSIN)); Attendre nouveau cycle MS
5          while (!digitalRead(SRS_t0)); Attendre fin cycle laser
      precedent
6          while (digitalRead(SRS_t0)); Attendre debut nouveau cycle
      laser
7          digitalWrite(SHUTTERS, HIGH); Ouvrir shutters
8          while (!digitalRead(SRS_t0)); Attendre fin du cycle laser
      en cours
9          digitalWrite(SHUTTERS, LOW); Fermer shutters
    
```

Le code ci-dessus décrit les différents ordre et les différentes étapes de synchronisation des la-

sers avec le spectromètre de masse. Tant qu'un nouveau cycle laser n'a pas commencé, rien ne se passe (1.3). Dès lors que le micro-contrôleur reçoit le signal du piégeage des ions, nouveau cycle MS (1.4, premier front montant en gris figure III.12), il attend de recevoir le signal provenant de la boîte de délai, indiquant un nouveau cycle laser pompe-sonde (1.5-6, front montant jaune sur la figure III.12). La première ligne pointillée indique l'instant où le piégeage et le cycle pompe sonde sont synchronisés. Les shutters peuvent alors s'ouvrir (1.7, front montant bleu) Á l'instant où T_0 se termine (front descendant jaune indiqué par une deuxième ligne pointillée, 1.8), il est demandé aux shutters de se fermer (1.9). C'est la fin d'un cycle MS, un scan est enregistré. Le début du scan suivant se déroule de la même façon et ainsi de suite pendant toute la durée de l'acquisition.

Les obturateurs utilisés ici sont des appareils dont la mécanique est relativement lente (voir figure III.13). Nous avons retardé de 12.5 ms les impulsions laser par rapport au début de la séquence de la boîte de délai de manière à prendre en compte le délai d'ouverture des shutters. De même on s'assure qu'ils soient bien fermés avant l'arrivée des impulsions du cycle suivant en commandant au micro-contrôleur de déclencher la fermeture dès la fin du cycle en cours. Ce qui impose, en première approche, une gamme de délai restreinte (100 ms - 150 ms), mais largement suffisante par rapport aux délais explorés (jusqu'à 30 ms).

La figure III.13 est un schéma du fonctionnement temporel des obturateurs utilisés. On compte d'après ce schéma un temps de 30 ms d'ouverture/fermeture des shutters.

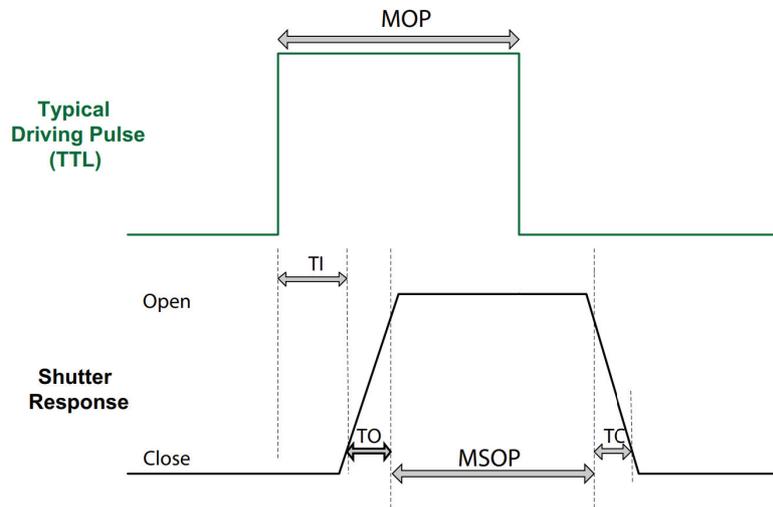


FIGURE III.13 – Temps caractéristiques d'ouverture et fermeture du shutter. TI est le temps écoulé entre la mise sous tension d'ouverture du shutter et le début de l'ouverture mécanique de celui-ci : 8 ms. TO, temps que l'obturateur met à s'ouvrir d'une exposition de 20% à 80% : 3 ms. MSOP est le temps minimum d'ouverture de l'obturateur lorsque MOP dure 10 ms (durée minimum du pulse électronique qui commande l'ouverture) : 27 ms. TC est enfin le temps pour passer de 80% d'ouverture à 20% : 4 ms (Source : Thorlabs, SH05 operating manual).

Le temps de piégeage a été paramétré à 170 ms, il est limité par la fréquence des lasers et le

temps d'ouverture et fermeture des shutters. La liste des délais a été créée de manière à ce que ces derniers soient répartis uniformément sur une échelle logarithmique entre 50 ns et 5 ms avec 60 délais auxquels ont été ajoutés 5 délais négatifs de contrôle (-5 μ s, -4 μ s, -3 μ s, -2 μ s et -1 μ s). La liste a ensuite été mélangée aléatoirement de manière à éviter de surinterpréter les biais de mesure de type déviation lente.

Un programme interne au logiciel d'acquisition des spectres de masse (Xcalibur de Thermo) associé à un programme créé par Xavier Dagany ingénieur de recherche à l'ILM, nous permet d'automatiser la gestion de l'enregistrement des spectres tout au long de l'expérience (pour les 65 délais). Ce programme fait le lien entre les différents éléments nécessaires à l'acquisition des données (liste des délais, liste des acquisitions, boîte de délai, spectre de masse). Nous pouvons créer une "séquence d'acquisition" grâce au logiciel *Thermo Xcalibur* fourni par *Thermo*. La séquence contient la liste de toutes les acquisitions qui devront être faites par le spectromètre de masse au cours d'une expérience complète, 65 acquisitions (1 par délai). Dans chaque élément de la séquence (acquisition), les paramètres d'acquisition sont enregistrés (le rapport m/z de (ou des) l'ion à sélectionner, le temps de piégeage, l'énergie d'activation par collision (si besoin), la durée d'une acquisition *etc.*). Ces paramètres seront appliqués par le spectromètre de masse au cours de chaque acquisitions (dans l'expérience pompe sonde, ces paramètres sont les mêmes pour chaque acquisition). Nous avons choisis une durée d'acquisition de 2 min qui donnent environ 400 scans. Ce nombre de scans est suffisant pour obtenir un spectre de masse moyen et une faible dispersion.

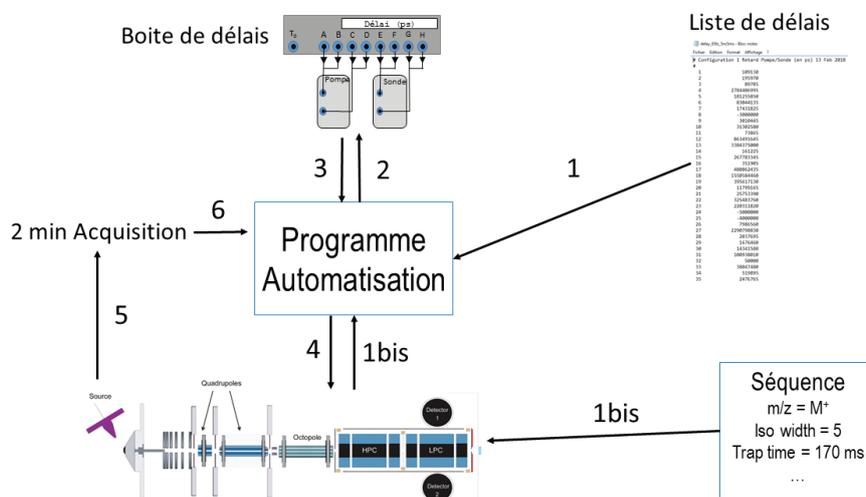


FIGURE III.14 – Schéma représentant les différentes étapes permettant de faire des acquisitions automatiques de l'expérience pompe-sonde.

Avant le début de la première acquisition la liste des délais est chargée dans le programme (étape 1 schéma III.14), la séquence est lancée, "play", par le système d'acquisition du spectromètre de masse (étape 1 bis), le programme reçoit cette information (étape 1 bis) et le premier délai est chargé sur la boîte de délais (étape 2). Dès que le délais est chargé, le programme envoie un signal au

MS qui permet de déclencher l'acquisition (étapes 3-4-5). Après les 2 min paramétrées, le système d'acquisition envoie au programme un signal de fin d'acquisition (étape 6). Le spectre de masse est enregistré, un nouveau délai est chargé dans la boîte de délai, la procédure recommence ainsi de suite jusqu'à la fin de l'acquisition du dernier délai.

IV Spectrométrie de mobilité ionique

Dans la problématique de mesure de dynamique conformationnelle, un autre instrument disponible au laboratoire nous a permis de sonder la conformation de peptides et de protéines. Il s'agit d'un spectromètre de mobilité ionique.

Le spectromètre de mobilité ionique est un appareil qui permet de mesurer la mobilité (K) des ions dans un tube rempli de gaz, sous l'effet d'un champ électrique faible. Il est couplé à un spectromètre de masse de type quadrupôle-temps de vol (Q-ToF), comme figuré sur la figure IV.15. Le Q-ToF est utilisé comme analyseur et détecteur en masse.

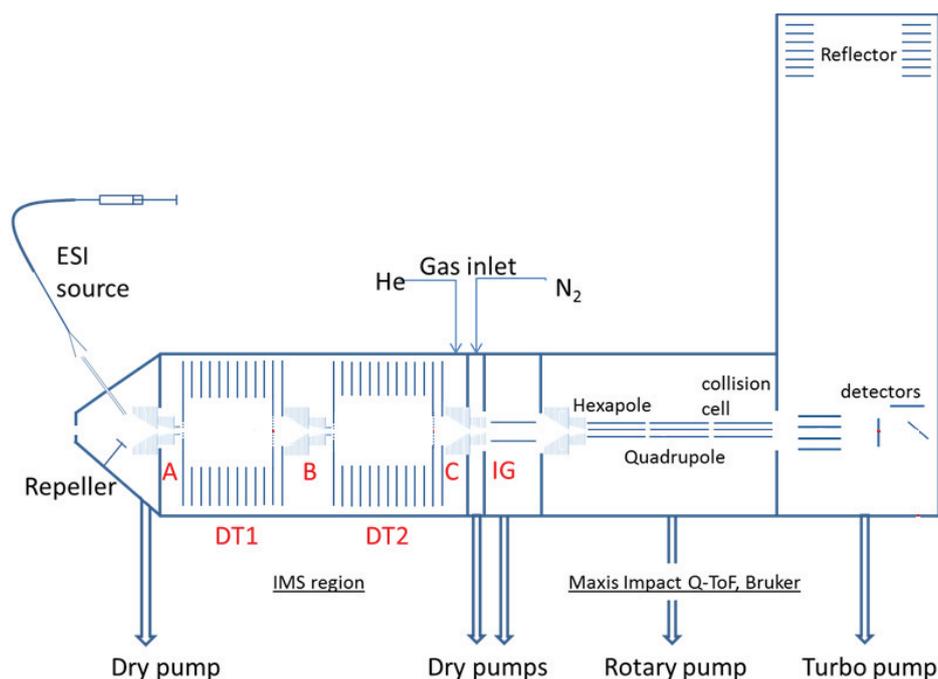


FIGURE IV.15 – Schéma du dispositif de mobilité ionique couplé à un spectromètre de masse Q-ToF (temps de vol) avec A, B, C les trois funnels et DT1 et DT2 respectivement les tubes de mobilité 1 et 2.

Le Q-ToF est composé d'un hexapôle (juste après le funnel C), qui a pour fonction de focaliser les ions. Deux analyseurs sont placés à la suite, un quadrupôle et le ToF. Après le passage dans ces deux analyseurs, les ions sont détectés, on obtient alors un spectre masse associé à un spectre de mobilité.

IV.1 Mobilité ionique et section efficace : Définition

À l'équilibre, la vitesse d'un ion dans un gaz sous l'effet d'un champ électrique dépend de sa mobilité dans ce gaz :

$$v_d = K.E \tag{1.2}$$

- v_d : Vitesse des ions (m/s)
- E: Champ électrique (V/m)
- K: mobilité ionique

La mobilité K d'un ion dépend de sa section efficace de collision Ω avec le gaz tampon. Cette relation a été décrite comme par Revercomb et Mason.[71] L'équation de Mason-Schamp donne la relation entre la mobilité et la section efficace de collision d'un ion :

$$K = \frac{3}{16} \cdot \frac{ze}{N} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{M}} \cdot \sqrt{\frac{2\pi}{k_B T}} \cdot \frac{1}{\Omega} \tag{1.3}$$

avec

- K: la mobilité des ions dans le tube ($V^{-1}.s^{-1}$)
- E: le champ électrique appliqué dans le tube (V/m)
- T: la température dans le tube (K)
- k_B : La constante de Boltzmann ($m^2.kg.s^{-2}.K^{-1}$)
- m et M : respectivement la masse de l'Hélium et de la molécule d'intérêt (kg)
- N: le nombre d'atome d'Hélium dans le tube
- Ω : la section efficace de collision de la molécule d'intérêt
- z: la charge de l'ion
- e: la charge élémentaire (C)

Cette équation ne concerne que les ions soumis à un champ électrique faible. À haut champ électrique, la mobilité K dépend de l'intensité du champ électrique et la vitesse des ions v_d n'est plus proportionnelle à E.

IV.2 Mobilité ionique et section efficace de collision : Méthode expérimentale

Le spectromètre de mobilité ionique utilisé ici (figure IV.15) a été construit au laboratoire.[40] Il est constitué d'une source électrospray, de deux tubes de mobilité successifs (DT1 et DT2) ainsi que de trois funnels.

Les 3 funnels sont situés, le premier après la source (A), le deuxième entre les deux tubes (B) et le troisième en sortie du tube 2 (C). Leur rôle est de guider et (re)focaliser les ions. Ces ions peuvent être piégés dans les funnels grâce à l'application de champs RF résonnant et d'un courant continu.

Lors des expériences de mobilité, nous mesurons le temps de parcours total t des ions de l'injection des ions dans le tube jusqu'à la détection dans le Q-TOF. Ce temps total comprends t_0 (*i.e.* le temps de dérive des ions dans les guides d'ion du QToF) et t_d le temps de dérive des ions dans les tubes uniquement (DT1 et DT2). t_0 ne dépend pas du champ électrique appliqué dans les tubes, c'est une constante.

$$t = t_0 + t_d \quad (1.4)$$

D'après l'équation 1.3 la section efficace d'un ion dans un gaz est proportionnel à sa mobilité dans ce gaz. De plus d'après la définition de la mobilité, équation 1.2, la vitesse des ions est liée à leur mobilité, on en déduit donc le temps de parcours des ions dans le tube de mobilité en fonction de la mobilité de ces ions:

$$t_d = \frac{L}{K.E} \quad (1.5)$$

L est la longueur du tube, soit 79 cm. On peut donc exprimer le temps mesuré (temps total de parcours des ions) en fonction de la mobilité:

$$t = t_0 + \frac{L}{K.E} \quad (1.6)$$

Un champ électrique constant est appliqué dans les tubes DT1 et DT2. Ces derniers sont remplis de gaz tampon (He) à une pression d'environ 4 Torr. Les ions se déplacent dans le tube sous l'effet d'un champ électrique. Leur vitesse dépend, selon Mason *et al.* de leur masse et de leur charge mais également de la température du milieu.[71] Les ions sont ralentis grâce aux collisions avec le gaz (refroidissement collisionnel). La vitesse des ions dans ce gaz dépend donc également de la pression. Ils sont d'autant plus ralentis qu'ils sont volumineux et/ou que la surface d'interaction avec le gaz est grande. Les ions sont alors séparés dans le tube en fonction de la masse et de la charge ainsi que

la forme globale des ions, pour une température et une pression données.

La figure IV.16 est le schéma d'un tube de mobilité dans lequel évoluent trois conformations différentes d'un même ion. La vitesse de ces derniers dépend donc uniquement de la section efficace de collision de l'ion avec le gaz.

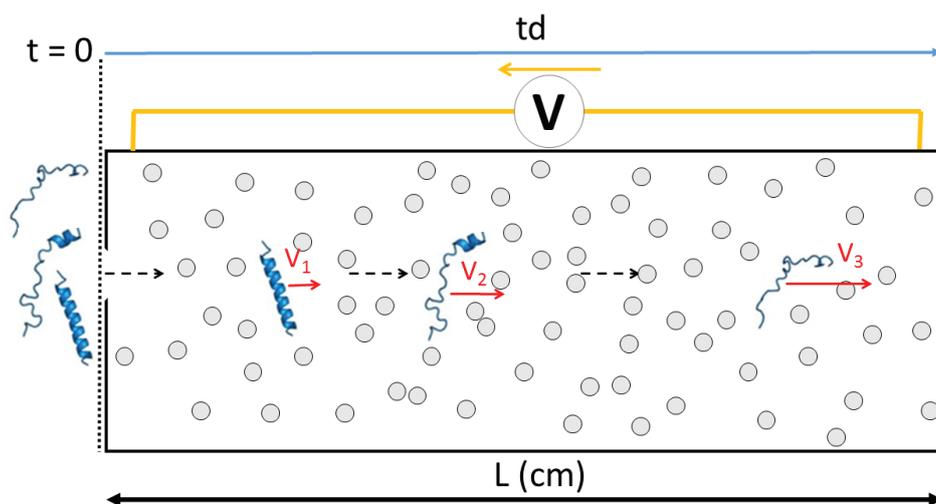


FIGURE IV.16 – Schéma de représentation du parcours des ions dans un tube de mobilité ionique où les 3 molécules en bleu ont la même masse et charge mais des structures différentes. Les disques gris représentent le gaz tampon (He). V_1 , V_2 et V_3 sont la vitesse de chaque ion dans le gaz.

En appliquant différentes tensions dans le tube on peut tracer la droite $t_d d = f(\frac{1}{E})$, comme présenté sur la figure IV.17. Ainsi, la pente de cette droite, d'après l'équation de Mason-Schamp 1.7, est proportionnelle à Ω , les autres paramètres restants constants (Pression, température, masse réduite, longueur du tube).[40] La valeur de l'ordonnée à l'origine est t_0 .

$$\Omega_d = \frac{Pente}{L} \cdot \frac{3}{16} \cdot \frac{ze}{N} \cdot \sqrt{\frac{1}{\mu}} \cdot \sqrt{\frac{2\pi}{k_B T}} \quad (1.7)$$

La valeur de la CCS permet d'identifier la structure de la molécule étudiée par comparaison avec des données de structures théoriques (ou modèles) et expérimentales (RMN, DR-X).

Grâce à la présence des deux tubes successifs, il est possible de faire de la mobilité en tandem. De la même manière qu'avec le tandem-MS, les ions sont sélectionnés en m/z avant d'être activés, en tandem-IMS le critère de sélection est le temps de dérive. Cela correspond, pour un ion de m/z donné, à une sélection en conformation.

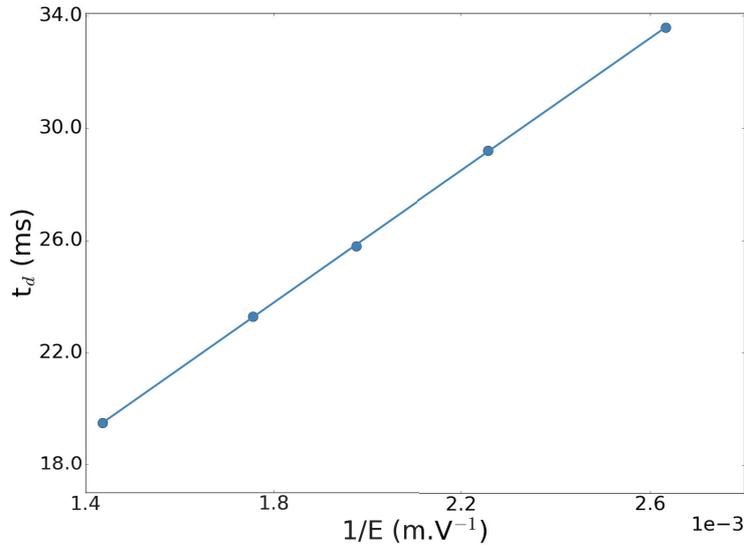


FIGURE IV.17 – Temps d’arrivée d’un ion (peptide [HGGGGW,Ag]⁺) en fonction de l’inverse du champ électrique. La section efficace de collision est extraite à partir de la pente de la droite tracée par régression linéaire. Les cercles sont les points expérimentaux mesurés.

V Perspectives : Couplage laser et IMS

L’objectif de ce couplage est de pouvoir utiliser le laser comme déclencheur de dynamique conformationnelle. Il permettrait de déclencher un changement de conformation par un laser de pompe, et mesurer ensuite la dynamique conformationnelle de la molécule par mobilité ionique en mesurant les changements de temps d’arrivée ou bien en observant une modification du paysage conformationnel de la molécule par exemple.

V.1 Montage optique

Nous avons, dans un premier temps, tenté d’aligner un laser dans le tube de mobilité. L’objectif est que le faisceau atteigne le centre du funnel B (carré rouge, figure V.18), lieu d’interaction privilégié entre le laser et les ions. Le laser utilisé est également un Nd :Yag. Un faisceau UV est produit par un cristal générateur de 4^{ème} harmonique du faisceau fondamental à 1064 nm. Il fonctionne à 10 Hz.

Plusieurs contraintes ont ralenti notre démarche. Tout d’abord, la distance entre le laser et l’entrée du spectromètre est faible, ce qui nous laisse peu de marge de manœuvre pour un alignement optimal. Ensuite, pour vérifier si le laser atteint le funnel B, ouvrir le spectromètre est le moyen le plus sûr. Ce qui signifie, casser le vide dans le tube, l’ouvrir, aligner, refermer puis pomper. Ce processus demande beaucoup de temps. Enfin, la qualité et la puissance du faisceau se sont avérées insuffisantes pour mettre en œuvre ce dispositif.

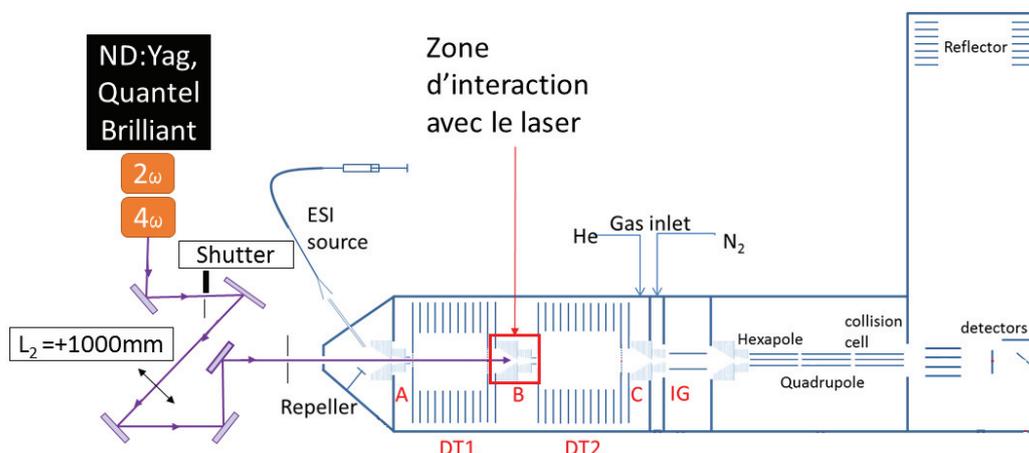


FIGURE V.18 – Schéma du montage optique du couplage pompe-sonde laser et mobilité ionique.

V.2 Principe d'utilisation

La mobilité ionique est un appareil synchronisé à une horloge fixe, que l'on peut faire fonctionner à la fréquence des lasers (10 Hz). Ainsi, les ions générés par la source électrospray vont pouvoir parcourir le premier tube et être séparés notamment en fonction de leur conformation. Grâce au funnel noté B sur la figure V.18, les ions dont la conformation a été choisie (en fonction du temps qu'elle met à atteindre le funnel B) seront piégés et pourront alors interagir avec le laser. La synchronisation du laser peut se faire directement avec le piégeage des ions puisqu'ils fonctionnent à la même fréquence. Les ions sont ensuite libérés dans le deuxième tube et seront de nouveau séparés s'il y a apparition de nouvelle(s) conformation(s) suite à l'absorption du laser.

VI Conclusion

La grande majorité des expériences menées au cours de cette thèse se sont faites sur piège à double pression LTQ Velos, muni d'une source électrospray. Cet appareil modifié au laboratoire nous permet d'étudier les ions en interaction avec un ou plusieurs faisceaux lasers dans l'UV et le visible. Nous avons mis en place un montage optique et un dispositif de synchronisation des appareils et d'automatisation des acquisitions pour des expériences résolues en temps de pompe-sonde laser à deux couleurs. Enfin, l'appareil de mobilité ionique à deux tubes de dérive couplé à la spectrométrie de masse a été l'instrument notamment utilisé pour l'étude du paysage conformationnel d'un peptide intrinsèquement désordonné.

Le chapitre suivant comportera sur l'étude de voies de relaxation de chromophores après absorption d'un ou plusieurs photons.

Chapitre 2

Photo-excitation de chromophores

I Introduction

I.1 Chromophore pour l'étude de conformation de peptides

L'ionisation par electrospray et la spectrométrie de masse sont utilisées couramment pour l'analyse structurale de molécules biologiques. Depuis, de nombreuses techniques sont apparues afin de sonder de plus en plus profondément et de plus en plus précisément la structure de ces molécules toujours plus complexes. La mobilité ionique, des approches de spectrométrie de masse "Top-Down" utilisant différentes méthodes de dissociation (CID, ECD, *etc.*) et le cross-linking sont parmi les techniques les plus largement utilisées pour l'étude de structures de protéines.[35, 39, 72] Récemment, la photo-dissociation en spectrométrie de masse est devenue un nouvel outil permettant de sonder la structure de molécules biologiques. Elle a notamment permis de produire de nouveaux fragments *via* la dissociation de liaisons non affectées par les méthodes conventionnelles de dissociation. Deux gammes de longueur d'onde sont principalement employés : dans l'infrarouge (IRMPD) et dans l'ultraviolet (UVPD).[37, 73–75] Les voies de fragmentation induites par l'une ou l'autre méthode sont très différentes, elles dépendent de l'énergie des photons, du temps caractéristique de dépôt d'énergie dans le système et de la molécule étudiée.

L'IRMPD (IR multiple photons dissociation): l'absorption multiple, séquentielle, de photons de basse énergie (IR) résonnants avec les transitions vers des niveaux vibrationnels excités. C'est un processus qui permet d'augmenter l'énergie interne du système. Ce chauffage est important car la redistribution interne d'énergie vibrationnelle (IVR), en diffusant l'énergie vers le reste de la molécule, permet de relaxer les modes vibrationnels excités et, par conséquent, d'absorber de nouveaux photons. De ce fait, étant une voie de chauffage statistique malgré le caractère résonnant de l'absorption de chaque photon, la fragmentation se produit *via* les premières voies accessibles, *i.e.* les voies de plus basse énergie. C'est pourquoi elle provoque la rupture des liaisons les plus labiles. Dans le domaine de caractérisation de peptides et de petites protéine, l'IRMPD permet d'observer des ions fragments non produits par CID mais également des fragments *b/y* de *m/z* plus petits ainsi

que des ions immonium permettant une meilleure identification de la séquence du peptide. Enfin, elle permet de réduire les fragments issus d'une déshydratation, perte de H_2O , très présents sur les spectres CID et n'apportant aucune information structurale.[73] Lorsqu'un photon infrarouge est absorbé, les ions sont portés à un état vibrationnellement excité. L'absorption successive de multiples photons permet d'augmenter l'énergie interne de la molécule. La fragmentation a lieu lorsque l'énergie interne de l'ion atteint le niveau de dissociation. Ce processus nécessite l'absorption de plusieurs photons consécutifs, il s'agit d'un mécanisme d'activation lent.[37, 55, 76, 77]

La dissociation par UV (UVPD) est un processus impliquant des photons de plus haute énergie. Un photon UV contient suffisamment d'énergie pour entraîner des voies de fragmentation beaucoup plus énergétiques en passant par l'état électronique excité de la molécule contrairement à l'IRMPD qui fait intervenir les modes vibrationnels.[37] De nouvelles voies de fragmentation sont alors observées (différentes de l'IRMPD et de la CID). La dissociation issue de l'absorption d'un seul photon contre l'absorption multiple de photons pour l'IRMPD, fait de l'UVPD un processus de dissociation beaucoup plus rapide. De plus, au vue de la quantité d'énergie déposée dans le système (4.7 eV par photons pour 266 nm *vs* ~ 0.1 eV en IR), on pourra alors observer un plus grand nombre de fragments différents permettant une plus grande couverture de séquence du peptide (ou la molécule biologique) étudié.[37, 78] En effet, les liaisons plus fortes de la molécules peuvent éventuellement être rompues. Dans le cas de l'UVPD, l'utilisation d'un chromophore greffé sur la molécule d'intérêt a démontré une grande sélectivité des molécules étudiées et des liaisons clivées.[79, 80]

La dissociation induite par laser (LID) dans le domaine du visible est ensuite apparue comme une technique permettant une plus grande spécificité des espèces dissociées. Les liaisons peptidiques sont excitées dans l'UV (< 220 nm) et les acides aminés aromatiques absorbent la lumière autour de 280 nm. En revanche, les peptides et protéines n'absorbent pas la lumière au delà de 300 nm. Par conséquent, le greffage d'un chromophore sur ces systèmes, dont la section efficace d'absorption est spécifique à une longueur d'onde du visible, apporte un site spécifique d'absorption de photons. Le greffage se fait sur un site capable de former une liaison covalente entre le peptide (ou de la protéine) et le chromophore, par exemple on peut utiliser la dérivation des histidines, tyrosines ou lysines ou se servir des cystéines pour former une liaison S-S ou S-C. Cette nouvelle technique assimilée à des techniques pré-existantes d'identification et de quantification par spectrométrie de masse a permis de faciliter l'identification de molécules complexes par exemple les oligosaccharides et la quantification de protéines en milieu complexes.[81–84] L'utilisation de chromophores dans l'étude de structure de molécules biologiques a également été adopté pour des expériences de FRET et FRET d'action (Förster Resonance Energy Transfer).[85] Le FRET est le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes. En biologie, elle permet de caractériser la distance entre deux fluorophores greffés sur une molécule en mesurant le déclin de fluorescence du chromophore donneur ou l'augmentation de celle de l'accepteur par microscopie.[86, 87] Le FRET a également pu être mesuré en phase gazeuse mais les détecteurs de fluorescence sont difficile à mettre en place dans

un spectromètre de masse.[88–90] Ainsi, le FRET d'action à été développé de manière s'affranchir de la mesure de fluorescence pour la caractérisation de distances.[23, 85] Le FRET d'action est le couplage du FRET et de la spectroscopie d'action (mesure de la photodissociation d'ions en fonction de l'énergie des photons).[91] En spectrométrie de masse, la détection des ions fragments résultants de l'absorption de photons est beaucoup plus sensible que la détection de photon.

Dans les expériences de spectroscopie d'action menées par le groupe, les chromophores utilisés sont la rhodamine 575 utilisé comme "donneur" et le QSY7 comme "accepteur". La Rhodamine est un chromophore fluorescent.[92, 93] Le QSY7 un quencher de fluorescence. La fluorescence étant un mécanisme de relaxation peu probable par rapport aux autres voies de relaxation, il y aura donc compétition entre dissociation et redistribution de l'énergie du chromophore vers le reste de la molécule.

L'utilisation de chromophores est largement adoptée pour l'étude de la structure de protéines et de complexes protéiques *via* la photodissociation en spectrométrie de masse. En ce qui concerne notre équipe, la compréhension des mécanismes d'absorption et de relaxation des chromophores utilisés pour le FRET d'action est au cœur de nos activités. En ce sens, notre intérêt va vers l'étude de la photo-physique et de la photo-chimie de ces molécules en phase gazeuse mais également de leurs propriétés lorsque greffées sur des molécules biologiques. Dans ce chapitre, nous irons donc sonder les propriétés optiques de deux chromophores, un dérivé de la Rhodamine et le QSY7, ainsi que l'évolution de ces propriétés lorsque les chromophores sont greffés sur des peptides, par spectrométrie de masse et spectroscopie d'action.

I.2 Les voies de relaxation des xanthènes

Les xanthènes sont une famille de colorants contenant le composé xanthène (un cycle pyrane entouré de deux cycles benzéniques) dont les Rhodamines (575, 6G *etc.*) et le QSY7 font partie.

Kulesza *et al.* ont sondé la photo-excitation des xanthènes en phase gazeuse en comparant les résultats expérimentaux à des calculs CC2 et TDDFT.[94] Dans cet article, le groupe a exploré les propriétés optiques de chromophores utilisés pour l'étude de la structure de peptides en spectrométrie de masse. Dans ces expérience, l'observable est la fragmentation des systèmes étudiés. Il s'est avéré, en comparant les propriétés optiques obtenues en phase liquide *vs* phase gazeuse, que la fragmentation n'est pas une sonde directe des propriétés d'absorption du système. La multitude des voies de relaxation accessibles par ces molécules est extrêmement importante. Ainsi, pour comprendre et interpréter les résultats de la photo-dissociation de chromophore-peptide(ou protéine) il nous faut comprendre quel lien y a-t-il entre l'absorption de photons et la fragmentation.

Les voies de relaxations des molécules après photo-excitation sont nombreuses et dépendent des conditions expérimentales. Les plus communes d'entre elles sont rassemblées sur de diagramme I.1.

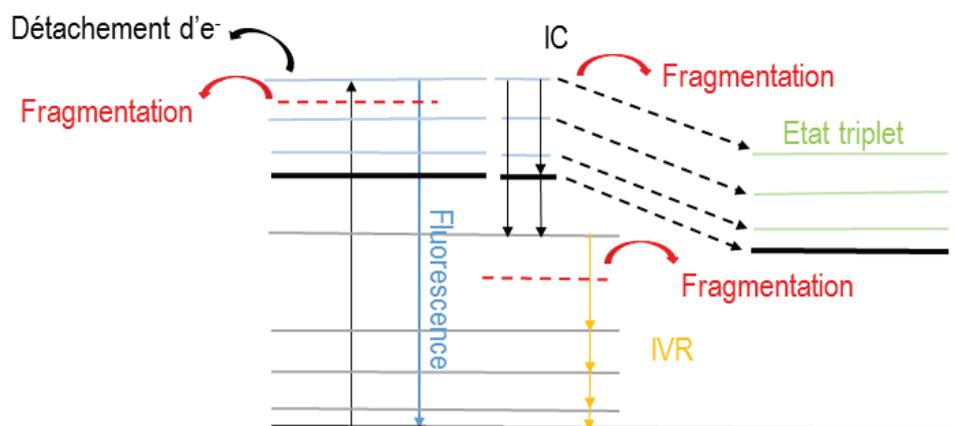


FIGURE I.1 – Schémas de quelques chemins possibles de relaxation d'un système moléculaire photo-excité.

Le groupe de R. Jockusch présente deux routes principales possibles, lors de la photo-excitation de la Rhodamine. Ces deux routes sont: l'absorption séquentielle de deux photons qui amène la molécule à un haut état électronique excité, et des cycles successifs d'absorption/émission de photons menant au chauffage graduel du chromophore.[95] Dans le cas de l'absorption de deux photons, un premier photon est absorbé et amène l'ion au premier état excité S_1 puis deux mécanismes sont envisagés. Le premier mécanisme propose que le "long-lived" état triplet est atteint *via* le passage inter-système (inter-system crossing, ISC) à partir de l'état S_1 . Dans le second, il y a conversion interne (IC) entre l'état excité S_1 et un haut état vibrationnel de l'état S_0 . Dans les deux cas, si le taux d'absorption des deux photons surpasse le taux de refroidissement collisionnel alors l'absorption du second photon permettra de passer la barrière de dissociation. En revanche, si le taux de refroidissement collisionnel est supérieur, alors l'état fondamental sera rapidement retrouvé et l'absorption d'un deuxième photon ne permettra pas d'atteindre le seuil de fragmentation. Sur la route menant à l'absorption multiple de photons, le premier photon absorbé amène l'ion à l'état excité S_1 puis un processus de relaxation vibrationnelle et émission de photons par fluorescence fait redescendre l'ion à l'état S_0 dans un état vibrationnel de plus haute énergie. L'absorption successive de photons conduit alors au chauffage progressif de la molécule en peuplant progressivement les états vibrationnels de l'état fondamental jusqu'à ce que le $n^{ième}$ photon permette de passer la barrière de dissociation. En conclusion, les voies sont nombreuses même si certaines peuvent être privilégiées. La photo-dissociation ne dépend pas uniquement du niveau d'énergie de dissociation de la molécule mais également du flux de photons, du rendement quantique de fluorescence de la molécule, de la vitesse de refroidissement collisionnel et de la section efficace d'absorption des états intermédiaires.[95]

Ainsi, les voies de dissociation empruntés par un système dépendent, en plus des propriétés intrinsèques du système, des conditions expérimentales. Kulesza *et al.* ont alors tenté de répondre aux

questions des voies de fragmentation en utilisant les calculs théoriques pour soutenir les résultats de la photodissociation de différentes rhodamines en spectrométrie de masse lorsque ces molécules sont irradiées par des impulsions de 5 ns.[? , Kulesza2016a]’hypothèse de l’absorption d’un photon unique pour mener à la photodissociation est rapidement écarté pour les rhodamines, sauf le QSY7. Donc, dans le cas des rhodamines, un processus à 2 photons est envisagé (*cf.* absorption d’un 2^{ème} photon à l’état excité, Forbes *et al.*) et la dissociation a alors lieu à un état excité supérieur à l’état S_1 . [95] Dans cette situation, la population de l’état S_1 évolue tout au long de la durée de l’impulsion. La probabilité d’absorption d’un deuxième photon menant à la transition $S_1 \rightarrow S_N$ dépend donc de la durée de vie de l’état S_1 et du flux de photons. Pour les rhodamines fluorescentes, la durée de vie de l’état S_1 est similaire à la durée d’impulsion, ce qui rend la probabilité d’absorber le deuxième photon très importante. Dans le cas de QSY7, très peu probablement fluorescent, la durée de vie de l’état S_1 est très courte devant la durée d’impulsion, la probabilité d’absorption du second photon est donc trop faible pour observer la transition $S_1 \rightarrow S_N$. Cette interprétation est soutenue par le fait qu’à une durée d’impulsion beaucoup plus courte, 25 ps (flux de photons beaucoup plus grand), la transition $S_1 \rightarrow S_N$ est observée pour QSY7. On peut alors estimer que la durée de vie de l’état S_1 de QSY7 est de l’ordre de la ps. L’association des résultats expérimentaux de spectroscopie d’action sur différentes rhodamines et des calculs théoriques ont ainsi permis de révéler des mécanismes de dissociation de ces molécules. Ces résultats ont montré l’influence des conditions expérimentales sur la photo-dissociation de chromophores en phase gazeuse. Ils montrent l’importance de caractériser les propriétés optiques de chaque chromophore utilisé comme sonde de la structure de molécules biologiques.

Nous venons de voir que la photodissociation de QSY7 avec une impulsion ns était cohérente avec la dissociation après absorption d’un photon unique. Dans la partie suivante de ce chapitre, nous verrons que ce mécanisme n’est pas si simple. La dissociation de QSY7 nécessite l’absorption de multiples photons visibles à l’état fondamental et nous étudierons l’influence de la taille du système sur ce mécanisme. Nous avons également sondé l’influence du refroidissement collisionnel et calculé le nombre de photons nécessaires pour atteindre le niveau de dissociation. Puis dans une dernière partie nous explorerons la durée de vie de l’état triplet de la rhodamine et sa réactivité avec un gaz radicalaire par spectrométrie de masse.

II Mécanisme de dissociation multi-photons de systèmes chromophores-peptide

Les résultats présentés dans cette partie sont issus d’un article publié en 2017.[96]

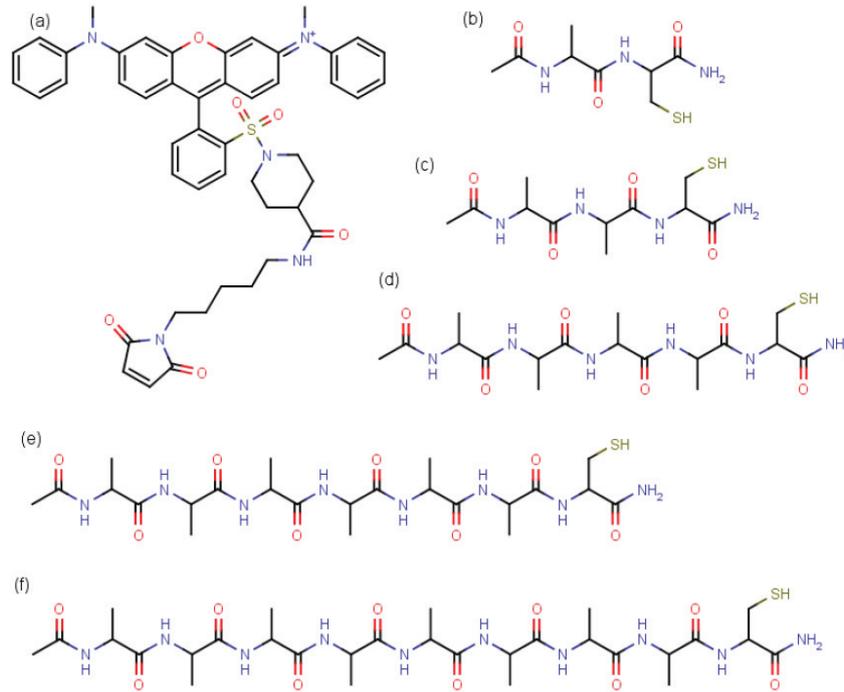


FIGURE II.2 – Schémas des différents systèmes étudiés, QSY7 (a), Ala-Cyst (b), Ala₂-Cys (c), Ala₄-Cys (d), Ala₆-Cys (e) et Ala₈-Cys (f), le chromophore est greffé sur tous les peptides.

II.1 Introduction

La photodissociation dans le visible implique des processus photo-physiques en compétition à la jonction entre l'UVPD et l'IRMPD en passant par une modification de l'état électronique de la molécule. Sur le modèle de l'UVPD, l'activation par un photon visible peut être un processus rapide (quelques ns pour un pulse laser ns).[94] L'absorption de plusieurs photons successifs peut être requise pour engendrer la dissociation du système selon l'énergie de liaison de ce dernier et la compétition entre la dissociation et la redistribution d'énergie (IVR), tout comme en IRMPD.[95]

Dans cette partie, nous étudierons la fragmentation par lumière visible d'un dérivé de la rhodamine QSY7 (a) sur la figure II.2, greffé sur des peptides de différentes tailles (b, c, d, e, f). QSY7 est un quencher de fluorescence, dont la fragmentation est très efficace à 545 nm en phase gazeuse.[83] Il contient une partie C5 maleimide : une chaîne carbonée et un groupement maleimide (C₄H₂O₂N) en bout de chaîne. Cette partie (C5 maleimide) sera nommé plus tard, "linker". Ce groupement maleimide permet le greffage du QSY7 sur la cystéine présente sur chaque peptide (voir section II.2), *via* la réaction avec la fonction thiol.

L'analyse de la nature et de la quantité des fragments photo-induits en fonction de l'énergie du laser sur différentes tailles de peptides et les mesures de dynamique de refroidissement par collisions permettront de mieux connaître les mécanismes photo-physiques impliqués dans les sys-

tèmes chromophore-peptide comme l'absorption multiple de photons et le chauffage vibrationnel. Les mesures d'évolution de la fragmentation en fonction de la taille du peptide nous permettront de tester un éventuel processus de redistribution d'énergie sur le système. Les mesures des rapports de branchement des fragments par CID en comparaison avec la photo-dissociation permettront de différencier les voies de fragmentations les plus accessibles par ces deux méthodes : fragmentation à l'état fondamental ou à l'état excité. Enfin, les calculs et simulations permettront de déterminer le nombre de photons nécessaires à la dissociation selon la taille du système.

L'étude des voies de photo-dissociation de grandes molécules, par exemple les protéines, est un domaine qui reste encore à explorer car l'utilisation de chromophores dans l'UV et le visible est relativement récente dans des applications analytiques en MS²[97, 98] ou pour des expériences de FRET et spectroscopie d'action.[85, 99]

II.2 Méthode

Les différents peptides étudiés dans cette partie ont été dissouts dans l'eau pour les plus petits (AC, A₂C, A₄C) et dans le trifluoroéthanol (TFE) pour A₆C et A₈C de façon à atteindre une concentration de 1 mg/mL. La réaction de greffage s'effectue avec un mélange équimolaire de chromophore et de peptide à 10 μM dans l'eau : méthanol (1:1). Le greffage se fait de manière spontanée dans ces conditions. La liaison du groupement maleimide avec le peptide se fait entre un carbone (CH) du maleimide et le groupement thiol de la cystéine du peptide (voir figure II.7 A).

Les expériences de spectrométrie de masse ont été menées en utilisant le LTQ. Le piégeage et l'interaction laser sont décrits dans le chapitre 1. Les deux lasers utilisés lors de l'expérience pompe-sonde sont également décrits dans ce chapitre. Les études de fragmentation par CID sont faites dans le piège haute pression. Les ions simplement chargés des peptides dérivés sont observés (la charge permanente est localisée sur le chromophore).

Les rapports de branchements (BR) ont été calculés comme suit:

$$BR = \frac{I_f}{I_{tot}} \quad (2.1)$$

Où I_f est l'intensité des fragments f et I_{tot} est l'intensité totale des ions sur le spectre.

Le rendement de fragmentation (FY) est défini par :

$$FY = -\log\left(\frac{I_p}{I_{tot}}\right) \quad (2.2)$$

Avec I_p , l'intensité de l'ion parent.

Le montage pompe-sonde est sensiblement identique à celui présenté dans le chapitre 1.

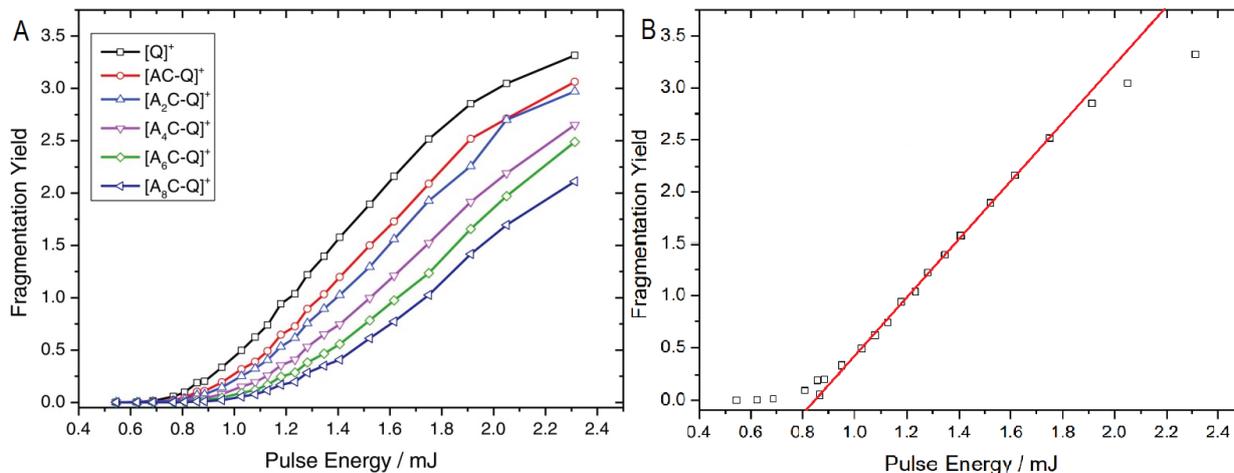


FIGURE II.3 – Rendement de fragmentation en fonction de l'énergie par pulse, (A) du [QSY7]⁺ (carré noir), [Ala-Cyst-QSY7]⁺ (rond rouge), [Ala₂-Cys-QSY7]⁺ (triangle bleu), [Ala₄-Cys-QSY7]⁺ (Triangle vers le bas magenta), [Ala₆-Cys-QSY7]⁺ (losange vert) et [Ala₈-Cys-QSY7]⁺ (triangle vers la gauche bleu foncé), (B) du [QSY7]⁺ (carré noir) avec la droite tracée par extrapolation (rouge)

II.3 Rendement de fragmentation en fonction de l'énergie par pulse laser

L'influence de l'énergie par pulse du laser sur la photodissociation a été étudiée dans un premier temps pour différentes longueurs de poly-alanines. Le rendement de fragmentation défini par l'équation 2.2 est tracé en fonction de l'énergie par pulse à 545 nm, figure II.3 (A). Il existe, dans nos conditions expérimentales, un seuil inférieur au dessous duquel aucune dissociation n'est observée. Ensuite, le rendement de fragmentation augmente linéairement avec l'énergie puis, notamment pour les petits systèmes, il atteint un seuil de saturation. On peut observer que plus la taille du peptide augmente, plus le seuil d'apparition de la dissociation augmente ($\sim 0,9$ mJ pour [Ala₈Cys-QSY7]⁺). De plus, plus la taille des peptides augmente, plus la pente diminue. La pente et l'ordonnée à l'origine de chaque courbe ont été déterminées par extrapolation linéaire de la portion centrale (linéaire) des courbes. La figure II.3 (B) présente la droite d'extrapolation des données de QSY7 (en rouge).

Les valeurs de la pente et de l'ordonnée à l'origine issus des fits pour les différents systèmes sont rassemblées dans le tableau 2.1. La pente et l'ordonnée à l'origine associées à chaque peptide ont été tracées en fonction du nombre de degré de liberté de ces derniers. D'après la figure II.4, il semble exister une relation linéaire entre la pente ou l'ordonnée à l'origine et le nombre de degrés de liberté.

L'évolution sigmoïdale de la fragmentation en fonction de l'énergie par impulsion laser suggère que le système doit absorber un certain nombre de photons avant de pouvoir passer la barrière de dissociation (seuil de fragmentation). De plus, l'évolution linéaire de la pente et de l'ordonnée à l'origine de cette courbe en fonction de la taille du système nous laisse penser que plus le système est grand (plus grand nombre de degré de liberté) plus il requiert de photons pour passer le seuil de fragmentation. En supposant que l'énergie de dissociation des liaisons ne change pas avec la taille

II Mécanisme de dissociation multi-photons de systèmes chromophores-peptide

Système	Ordonnée à l'origine / mJ	Pente
[QSY7] ⁺	0,85 ± 0,02	2,80 ± 0,03
[AlaCys-QSY7] ⁺	0,94 ± 0,01	2,570 ± 0,02
[Ala ₂ Cys-QSY7] ⁺	0,96 ± 0,03	2,38 ± 0,04
[Ala ₄ Cys-QSY7] ⁺	1,02 ± 0,04	2,10 ± 0,04
[Ala ₆ Cys-QSY7] ⁺	1,13 ± 0,06	2,10 ± 0,07
[Ala ₈ Cys-QSY7] ⁺	1,20 ± 0,06	1,94 ± 0,05

TABLE 2.1 – Liste de la pente de l'ordonnée à l'origine des peptides étudiés

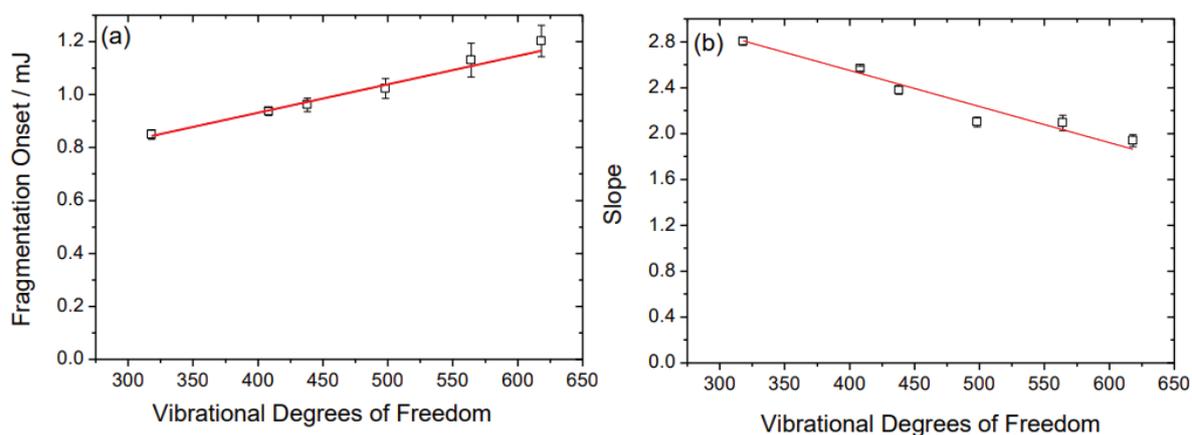


FIGURE II.4 – (a) ordonnée à l'origine et (b) pente associées aux résultats obtenues pour les différents systèmes en fonction du degré de liberté (taille du peptide)

de la molécule, pour conserver un même rendement de fragmentation d'ions de masse croissante (de nombre de degré de liberté croissant) il faut augmenter l'énergie interne de l'ion. L'énergie interne doit donc augmenter linéairement avec la taille de la molécule pour garder un même rendement de fragmentation.

Nous avons donc montré dans cette partie que le processus de photo-dissociation est un mécanisme d'absorption de n photons ($n > 1$). De plus, la dépendance du seuil de fragmentation avec la taille de la molécule laisse penser qu'il existe un processus de redistribution de l'énergie dans le système.

II.4 Refroidissement des ions par collision

La figure II.5 présente le spectre de masse de $[A_2C-Q]^+$ après irradiation par une impulsion laser de pompe et sonde tous les deux à 545 nm et à un délai de 30 ns (en haut). Le spectre de masse de ce peptide après irradiation par une impulsion de la pompe uniquement est tracé dans la fenêtre centrale. Enfin, le spectre du peptide après absorption d'une impulsion de la sonde uniquement est présenté en bas de la figure. L'énergie par impulsion des pulses pompe et sonde se situe sous le seuil de fragmentation, d'où la très faible intensité et quantité de fragments lorsque la pompe ou la sonde sont utilisées seules. Cependant, lorsque le peptide est irradié par les deux lasers simultanément (à 30 ns d'intervalle), on peut voir que l'intensité des fragments produits est très supérieure à la somme des intensités des fragments produits avec un seul laser. Le délai de 30 ns ne permet pas aux deux impulsions de se recouvrir. De fait, les photons de la pompe et de la sonde ne peuvent pas être absorbés simultanément. L'absorption des impulsions pompe et sonde sont donc des événements indépendants l'un de l'autre.

L'effet de l'absorption de deux impulsions nous montre qu'il y a un effet de réabsorption des photons par le système. Les photons de la pompe absorbés permettent à la molécule de se dissocier seulement après absorption de l'impulsion sonde. Il semble s'agir d'un mécanisme à plusieurs étapes. La photo-dissociation implique donc l'absorption de multiples photons successifs.

L'intensité des fragments étant importante suite à cette réabsorption, on peut supposer que le système met plus de 30 ns à se relaxer vers l'état fondamental. Il est donc possible de mesurer cette dynamique de relaxation en mesurant l'évolution de la fragmentation en fonction du délai pompe-sonde. Les courbes de photo-fragmentation de $[A_2C-Q]^+$ en fonction du délai entre les deux impulsions pompe et sonde dans le piège haute pression (a) et basse pression (b) sont présentées sur la figure II.6. Chaque courbe présente un déclin mono-exponentiel avec une constante de temps de $668 \pm 64 \mu\text{s}$ pour HPT et $2646 \pm 140 \mu\text{s}$ pour LPT. On constate que plus la pression de gaz tampon est haute, plus la relaxation après absorption de la pompe est rapide.

Les collisions entre le gaz et les ions étant plus nombreuses lorsque la pression est plus haute,

II Mécanisme de dissociation multi-photons de systèmes chromophores-peptide

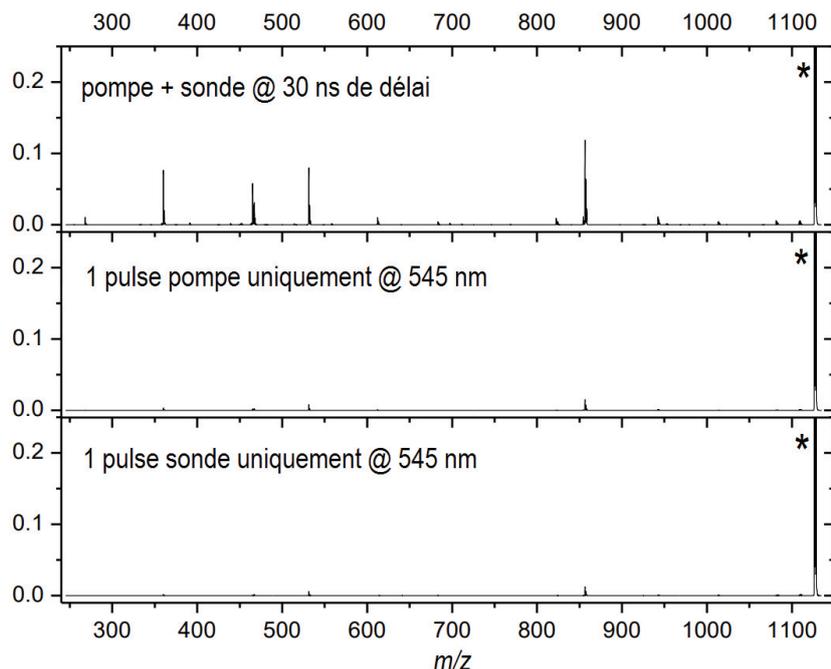


FIGURE II.5 – Spectre de masse du peptide $[A_2C-Q]^+$ (*) et des fragments après irradiation par une impulsion sonde uniquement (bas), par une impulsion pompe uniquement (centre) et par une impulsion pompe + sonde avec un délai de 30 ns (haut).

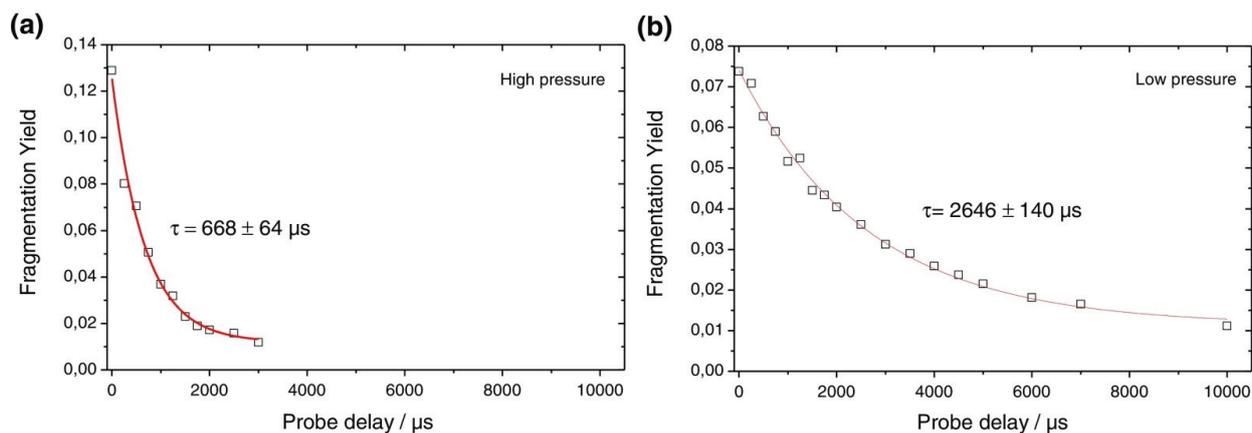


FIGURE II.6 – Courbe de photo-fragmentation de $[A_2C-Q]^+$ dans le piège haute pression (a) et basse pression (b) en fonction du délai pompe-sonde

on peut supposer que l'effet de la relaxation plus rapide dans le piège haute pression vient du phénomène de refroidissement collisionnel des ions par le gaz tampon (He).

II.5 CID vs VisPD

Jusqu'à présent, nous avons montré que la photo-dissociation des systèmes - QSY7 greffé sur des peptides nécessitait l'absorption de multiples photons successifs. Nous avons également montré que l'énergie absorbée par le chromophore était redistribuée sur les modes de la molécule.

Afin de mieux définir les voies de relaxation empruntées par le système lors de la photo-dissociation, nous avons comparé la nature et l'intensité des fragments induits par collision (CID) *vs* induits par laser (VisPD). Les spectres de masse obtenus pour le peptide par CID (en haut) et VisPD (en bas) sont présentés figure II.7.

De manière à faciliter l'interprétation du spectre de masse et comparer les types de fragmentation entre CID et LID, les fragments ont été regroupés en 3 grandes familles selon la position de la liaison rompue (figure II.7): dans le chromophore (entouré en vert), dans le linker (entouré en bleu) et dans le peptide (entouré en rouge). L'attribution des fragments à ces trois familles est facilitée par le fait que l'ion ne porte qu'une seule charge et qu'elle est localisée sur le chromophore. Par conséquent, les fragments de basse masse ($m/z < 550$) sont tous des fragments du chromophore, les fragments de haute masse ($900 < m/z$) correspondent tous à une rupture de liaison dans le peptide et les fragments intermédiaires correspondent à une fragmentation dans le linker.

En comparant ces deux spectres on peut s'apercevoir que la nature des fragments observés par CID et LID sont identiques. On peut donc supposer que les voies de dissociation empruntées par le système au cours de ces deux techniques de fragmentation sont les mêmes. La CID est une technique de dissociation qui passe par l'excitation des modes vibrationnels de la molécule à l'état fondamental. On suppose donc ici que la dissociation par LID de ces systèmes a également lieu à l'état fondamental.

II Mécanisme de dissociation multi-photons de systèmes chromophores-peptide

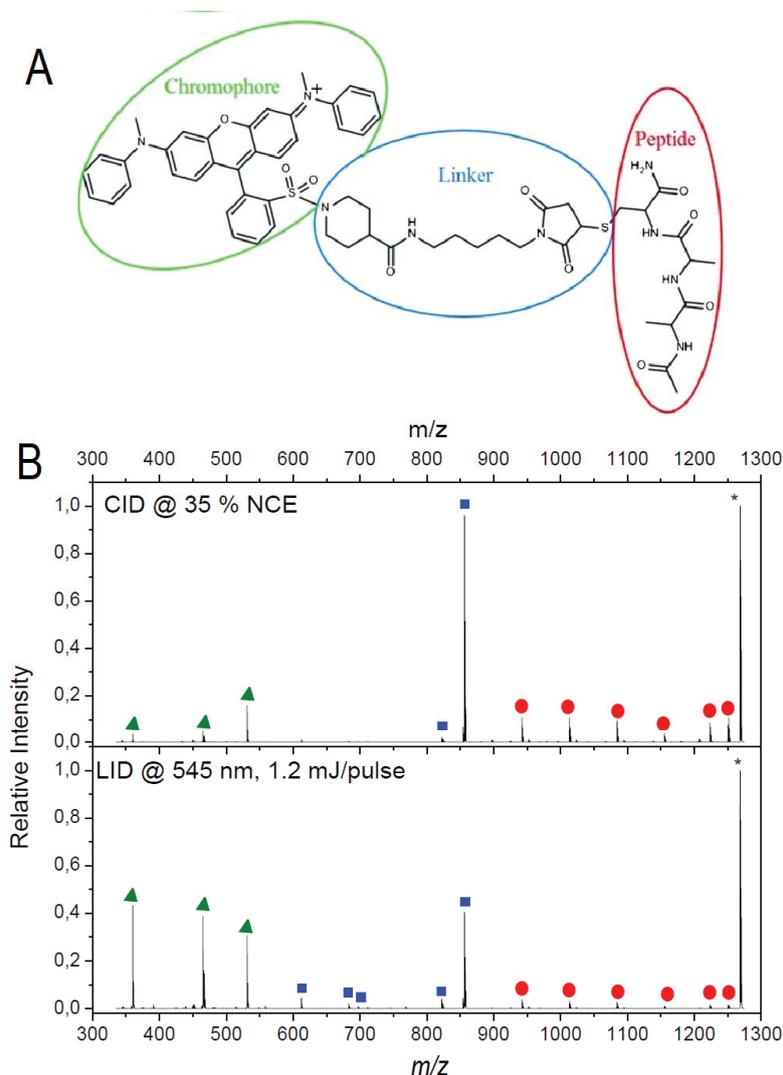


FIGURE II.7 – (A) Schéma du système [A₂C-Q]⁺ avec le chromophore entouré en vert, le linker entouré en bleu et le peptide en rouge. (B) Spectre de masse CID (haut) et VisPD (bas) de [A₄C-Q]⁺ avec une énergie de collision normalisée de 35% et une énergie par impulsion de 1,2 mJ/pulse, l'ion précurseur est marqué d'un "*", les triangles verts indique les fragments de la famille du chromophore, ceux marqués d'un carré bleu sont de la famille du linker et les ronds rouges correspondent à l'ion fragment de la famille du peptide.

Les différentes zones de rupture de liaison donnant lieu aux fragments observés sur les spectres de masse sont présentés sur le schéma du système figure II.8 et sont rassemblés dans le tableau 2.2.

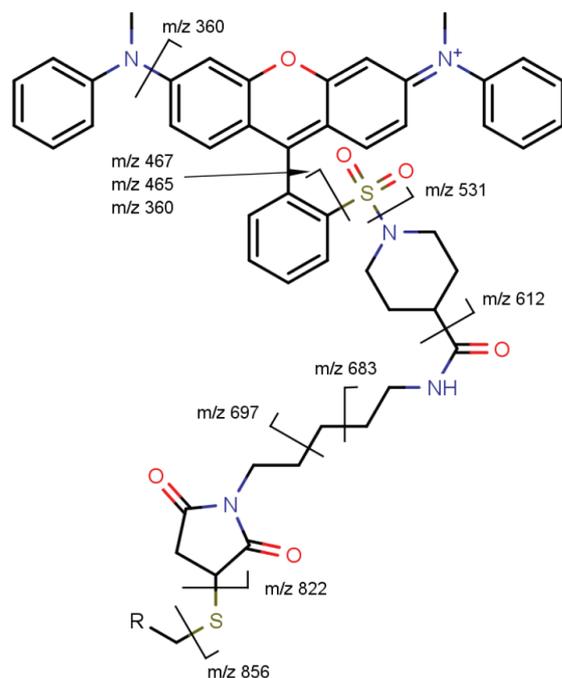


FIGURE II.8 – Schéma du système montrant les différentes ruptures de liaison ayant eu lieu lors de la dissociation par collision et par photo-dissociation sur le chromophore et le linker. Le R indique la position du C_α de la cystéine présente sur le peptide

m/z	Perte	Intensité Relative		Attribution
		CID	LID	
[H] 1268,6	0	1	1	parent(*) [Ala ₄ Cys-QSY7] ⁺
1251,6	17	0,11	0,015	perte de NH ₃
1250,6	18	0,077	0,013	perte de H ₂ O
1223,52	45,08	0,086	0,015	perte de NH ₂ -CH=O (C_{term})
1207,52	61,08	0,013	0,0022	perte de NH ₃ + CH ₃ CHO
1155,52	113,08	0,034	0,0096	y ₄
1084,48	184,12	0,095	0,027	y ₃
1013,44	255,16	0,11	0,32	y ₂
952,4	316,2	0,01	0,0074	a ₄ -H ₂ O
942,4	326,2	0,11	0,039	y ₁
856,36	412,24	0,96	0,4	C - S rupture de chaîne latérale, H sur S
854,36	414,24	0,068	0,044	C - S rupture de chaîne latérale, H sur C
822,4	446,2	0,02	0,042	perte du chromophore

Suite sur la page suivante

II Mécanisme de dissociation multi-photons de systèmes chromophores-peptide

<i>Suite de la page précédente</i>				
m/z	Perte	Intensité Relative		Attribution
		CID	LID	
697,35	571,25	0,0011	0,01	C ₃ linker C-C
683,34	585,26	0,0036	0,02	C ₂ linker C-C
612,26	656,34	0,0086	0,044	Rupture Piperidine - C
531,2	737,4	0,16	0,31	Rupture N-S
467,24	801,36	0,026	0,15	Rupture C-S chromophore
465,24	803,36	0,046	0,39	Rupture C-S chromophore
360,2	908,4	0,034	0,43	Rupture C-S + perte de chaîne latérale

TABLE 2.2 – Liste des fragments observés sur les spectres de masse CID et LID. Seuls les canaux de fragmentation d’intensité relative $> 1\%$ dans l’un des deux spectres ont été attribués.

Le rapport de branchement a été calculé pour chaque famille de fragment en sommant l’intensité des ions concernés. Le rapport de branchement (BR) est défini par l’équation 2.1 dans la partie II.2 de ce chapitre. La figure II.9 représente l’évolution de ce rapport de branchement en fonction de l’énergie de collision (a) et de l’énergie par pulse laser (b) dans le cas du $[A_4C-Q]^+$ (cette évolution du BR est semblable pour toutes les tailles de peptide). Sur cette figure, on peut observer qu’au delà d’une énergie de collision de 25% des fragments issus de la rupture au sein du linker et du peptide apparaissent. Au delà d’une NCE de 30%, on peut voir apparaître des fragments du chromophore. La forme sigmoïdale adoptée par le rapport de branchement de l’ion parent en fonction de l’énergie de collision a été observée auparavant dans des expériences par CID.[100] Memboeuf *et al.* ont interprété ces résultats en partant du fait que l’énergie de collision est transformée en énergie interne (chauffage collisionnel) et que cette énergie interne est distribuée statistiquement sur tous les degrés de liberté.

Concernant les résultats obtenus par VisPD, les rapports de branchements montrent une préférence dans la dissociation du chromophore. Les rapports de branchement du linker et du peptide atteignent tout deux un maximum avant de retomber à 0, alors que la fragmentation du chromophore ne cesse d’augmenter jusqu’à atteindre un plateau. On peut expliquer ce phénomène par le fait que ces deux régions (linker et peptide) contiennent le chromophore intact capable de ré-absorber des photons et de se dissocier de nouveau. De fait, à très haute énergie par pulse (≥ 1.3 mJ/pulse dans cette expérience) la plupart des fragments associés à la dissociation du chromophore semblent provenir d’une fragmentation secondaire des fragments contenant le linker et le peptide, la charge étant située sur le chromophore, ces fragments sont donc toujours observables sur le spectre de masse.

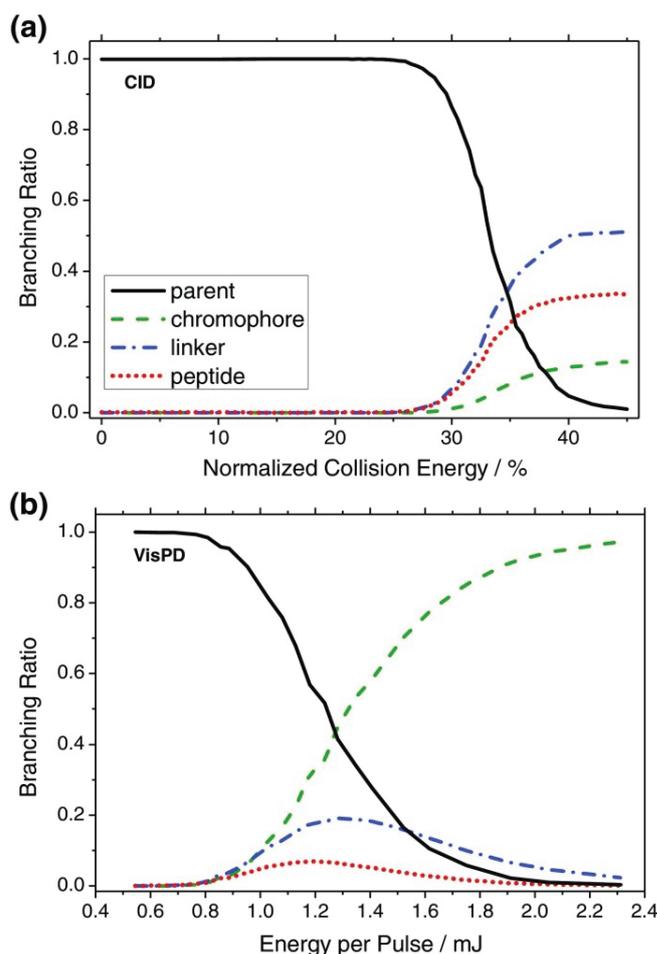


FIGURE II.9 – Rapport de branchement du système $[A_4C-Q]^+$ en fonction de l'énergie de collision par CID (a) et de l'énergie par impulsion en VisPD (b).

La fragmentation par CID est provoquée par une excitation des modes vibrationnels des ions donc par chauffage collisionnel. La nature des fragments produits par LID étant identiques à ceux produits par CID, on peut supposer que les voies de dissociation sont également identiques. En revanche, la comparaison des BR entre CID et LID laisse penser que si la fragmentation survient après chauffage vibrationnel du système, le mécanisme qui en est à l'origine est différent entre ces deux méthodes.

On peut aller un peu plus loin dans l'interprétation des valeurs des rapports de branchement. Par CID, la famille de fragments dominante est celle du linker. On peut donc émettre l'hypothèse que les liaisons rompues sont les voies de plus basse énergie. Les rapports de branchement du chromophore sont, en revanche, les plus faibles. On en déduit, de fait, que ces liaisons sont plus fortes. La fragmentation dominante du chromophore par LID nous laisse alors supposer que l'énergie absorbée, est concentrée au niveau du chromophore malgré une redistribution de cette énergie qui mène à la dissociation des autres parties de la molécule.

II.6 Simulation du nombre de photons absorbés pour induire la photo-dissociation

Nous avons donc pu observer que la photo-dissociation du système QSY7-peptide était provoquée après l'absorption de plusieurs photons. Nous avons également déduit de l'évolution du rendement de fragmentation en fonction de l'énergie par pulse laser pour différentes tailles du peptide que le nombre de photons à absorber pour induire la fragmentation augmentait avec la taille. Nous en avons déduit que l'énergie absorbée était redistribuée sur tous les modes du système. Nous avons donc calculé le nombre de photons théoriques nécessaires pour provoquer la fragmentation pour les différentes tailles de peptides étudiés, à partir d'un modèle simple.

On peut écrire l'équation générale de la réaction qui se produit lors de l'excitation d'un ion en considérant un déclin uni-moléculaire.



Dans les expériences LID où l'énergie de collision (NCE) est maintenue à zéro, la vitesse d'excitation est dominée par la vitesse d'absorption des photons. La relaxation de cet état excité peut se faire *via* la dissociation du système, l'émission d'un photon ou la refroidissement collisionnel.[95] Le chromophore étudié ici est un quencher de fluorescence, ainsi l'émission de photon n'est pas une voie favorisée (ce mécanisme à une très faible probabilité de se produire). De plus, nous avons montré dans la partie II.4 que la vitesse de refroidissement collisionnel est de l'ordre de la milliseconde. Cette vitesse est 10^6 fois plus grande que la durée d'une impulsion laser (ns) pendant laquelle sont limités l'ensemble des événements d'absorption des photons. On peut donc présumer que tous les systèmes qui dissocient atteignent la barrière de dissociation plus rapidement qu'ils ne se refroidissent par collision.

Afin de calculer le nombre de photons absorbés par le système avant la photo-dissociation, on considérera donc un modèle simple pour un système donné où n photons doivent être absorbés dans les 5 ns de durée d'impulsion laser de manière à atteindre la barrière de dissociation.

En utilisant des lasers d'excitation de différentes largeur d'impulsion, la durée de vie de l'état excité du QSY7 a été estimée à une centaine de ps.[94] Par conséquent, on peut considérer que l'absorption successive de photons par le chromophore pendant la durée de l'impulsion laser est une succession d'événements indépendants.[94, 101, 102] La statistique de Poisson est une distribution de probabilité discrète. Elle décrit une probabilité d'événements indépendants survenant par unité de temps. La probabilité d'absorber n photons peut donc être décrite par la statistique de Poisson. On considérera alors la probabilité $S(N)$, à une énergie d'impulsion donnée, qu'une molécule absorbe moins de n photons et donc survive à l'irradiation laser. Dans ce modèle, nous admettons que l'absorption de $n-1$ photons ne permet pas de dissocier la molécule. En revanche, c'est l'absorption du $n_{i\grave{e}me}$ photon qui permettra de dépasser la barrière de dissociation. En définissant $P(N,i)$, la

Espèces	Degrés de liberté vibrationnels	n photons nécessaires à la fragmentation
Q^+	318	16
$[AC-Q]^+$	408	18
$[A_2C-Q]^+$	438	19
$[A_4C-Q]^+$	498	21
$[A_6C-Q]^+$	564	23
$[A_8C-Q]^+$	618	25

TABLE 2.3 – Degrés de liberté vibrationnels et nombre de photons absorbés déterminé pour chaque système étudié à partir du fit des résultats expérimentaux et des simulations.

probabilité qu'un système absorbe i photons où est N le nombre moyen de photons absorbés pendant un pulse laser, alors $S(N)$ est la probabilité de survie de l'ion parent après irradiation à une certaine énergie par pulse.

$$S(N) = e^{-N} \sum_{i=0}^n \frac{N^i}{i!} \quad (2.4)$$

Le nombre moyen de photons (N) absorbés par une molécule irradiée par une impulsion laser est proportionnel à la section efficace d'absorption σ du chromophore et du flux de photons du pulse.

$$N = \frac{\sigma \lambda E_P}{hcA} \quad (2.5)$$

Avec la longueur d'onde $\lambda = 545$ nm, E_P est l'énergie du pulse laser et A la section efficace d'interaction du laser avec les ions *i.e.* un facteur correctif pour prendre en compte les pertes de photons dues notamment au recouvrement imparfait entre nuage d'ions et laser. La section efficace d'absorption de QSY7 est de $3,66 \times 10^{-16}$ cm². La taille du spot laser au sein du piège est estimée à $\sim 2,5$ mm ce qui donne une surface de $A \sim 0,05$ cm².

Les courbes de rendement de survie de l'ion précurseur en fonction de l'énergie par pulse laser sont tracés sur la figure II.10. Ces courbes ont été fittées par le modèle à n photons, n étant la variable. On peut voir que les simulations (trait plein) reproduisent fidèlement les courbes expérimentales (carrés), d'autant plus que le système est grand. Ceci confirme que le modèle de l'absorption successive de photons est valable. A partir de ces simulations, le nombre de photons requis pour induire la fragmentation, et donc pour reproduire les courbes expérimentales, a pu être déterminé. Ce nombre varie de 16 à 25 avec la taille du système. Ces valeurs sont rassemblées dans le tableau 2.3.

Les erreurs les plus importantes dans les simulations viennent essentiellement de l'estimation de la taille du faisceau, de son recouvrement avec le nuage d'ions dans le piège et de l'usage d'un modèle par étapes simple pour la dissociation.

Enfin, la figure II.11 montre un relation linéaire entre le nombre de photons nécessaires à la

II Mécanisme de dissociation multi-photons de systèmes chromophores-peptide

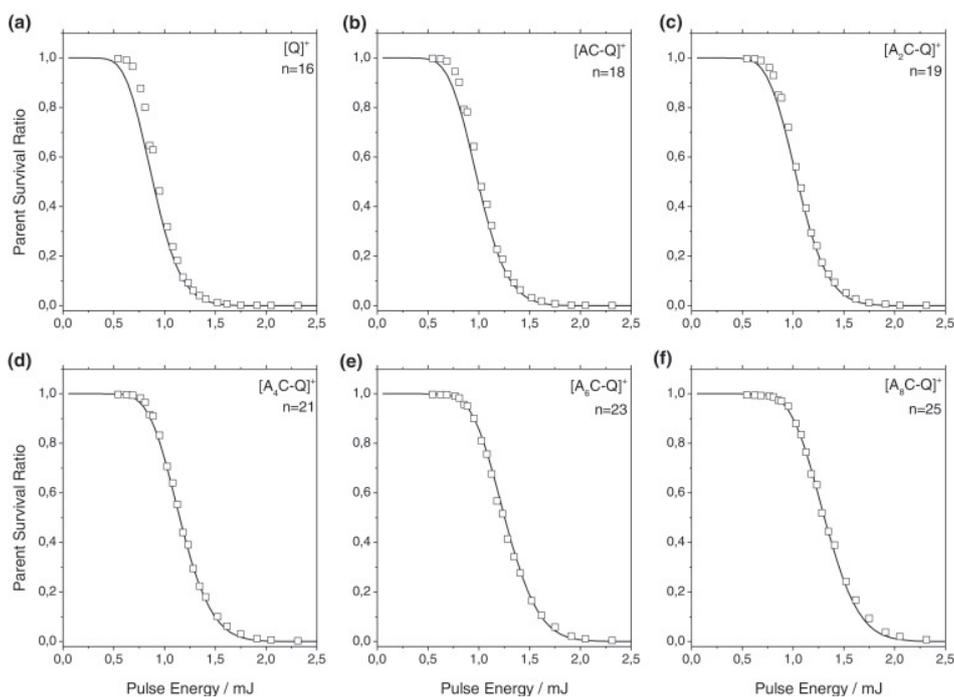


FIGURE II.10 – Résultats expérimentaux (carrés) du rapport de survie du parent en fonction de l'énergie par impulsion pour $[QSY7]^+$ (a), $[AC-Q]^+$ (b), $[A_2C-Q]^+$ (c), $[A_4C-Q]^+$ (d), $[A_6C-Q]^+$ (e) et $[A_8C-Q]^+$ (f). Les courbes de simulation optimales (trait plein) sont calculées pour n photons absorbés.

fragmentation (donc l'énergie totale déposée dans le système) et le nombre de degrés de liberté vibrationnels de chaque système étudié. Également observée par Memboeuf *et al.* lors d'expériences par CID, cette relation linéaire est expliquée par la relation linéaire entre la taille du système (nombre de degrés de liberté) et l'énergie de dissociation.[100]

Ces derniers résultats indiquent que le seuil de photo-dissociation est atteint après absorption de 16 photons pour le système le plus petit, QSY7 maleimide seul, et 25 photons pour le plus grand. La relation linéaire du nombre de photons théoriques requis pour la dissociation avec le nombre de degrés de liberté va dans le sens de notre hypothèse selon laquelle l'énergie est redistribuée statistiquement sur tous les modes.

II.7 Conclusion

Les différentes observations faites tout au long de cette étude (profil sigmoïdal du rendement de photo-fragmentation en fonction de l'énergie par pulse, seuil de fragmentation dépendant de la taille du peptide greffé et refroidissement collisionnel observé grâce aux expériences pompe-sonde) montrent que l'absorption successive de multiples photons est nécessaire pour induire la dissociation du système et que cette dissociation a lieu à l'état fondamental. Par ailleurs, l'utilisation d'un modèle simple a suggéré qu'entre 16 à 25 photons sont nécessaires pour induire la photo-dissociation du système lorsque sa taille augmente.

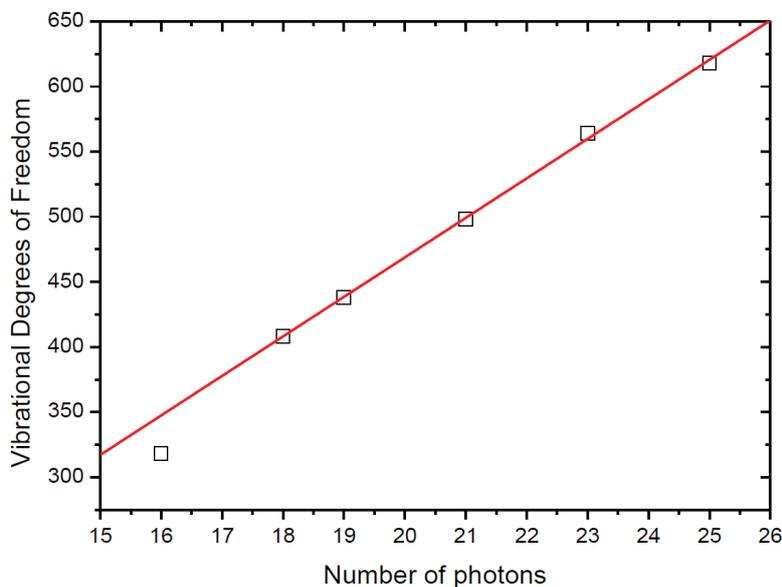


FIGURE II.11 – Degrés de liberté des différents système, $[\text{QSY7}]^+$, $[\text{AlaCys-QSY7}]^+$, $[\text{Ala}_2\text{Cys-QSY7}]^+$, $[\text{Ala}_4\text{Cys-QSY7}]^+$, $[\text{Ala}_6\text{Cys-QSY7}]^+$ et $[\text{Ala}_8\text{Cys-QSY7}]^+$ en fonction du nombre de photons requis pour induire la dissociation.

Les expériences de CID et VisPD menées en parallèle ont montré des allures différentes des rapports de branchement des 3 familles de fragments. On a pu ainsi en déduire que le processus de fragmentation qui se cache derrière ces deux techniques est différent, et également différent du mécanisme à deux photons décrite et modélisé par Kulesza *et al.* pour les xanthènes fluorescents.[94] La CID conduit à un chauffage équivalent de tous les modes vibrationnels du système. L'énergie vibrationnelle est donc totalement délocalisée ce qui explique que le critère de fragmentation soit purement énergétique. Dans ce cas, sans localisation préférentielle de l'énergie dans le système, les liaisons rompues sont les voies de plus basse énergie.

La fragmentation suite à l'absorption successive de photons pourra être mieux appréhendée si l'on regarde plus en détail la relaxation non radiative du chromophore. Une étude antérieure sur la Rhodamine (semblable au QSY7) a montré que la capacité de quenching de fluorescence est due à une conversion interne (IC) ultrarapide, 10 ps, relative à la rotation des chaînes latérales volumineuses.[101, 103, 104] Par conséquent, nous invoquons un processus IC similaire pour QSY7 basé sur les modes de torsion de basse énergie des groupements méthylamino-benzène. Les calculs TD-DFT des géométries d'équilibre à l'état fondamental (GC) et à l'état excité (EX) réalisés par A. Kulesza, soutiennent cette hypothèse, figure II.12. On remarque que les zones dont la géométrie change entre l'état fondamental et l'état excité sont les modes de torsion des groupements benzène.

En conclusion, la fragmentation issue de l'absorption de photons visibles se décrit comme suit

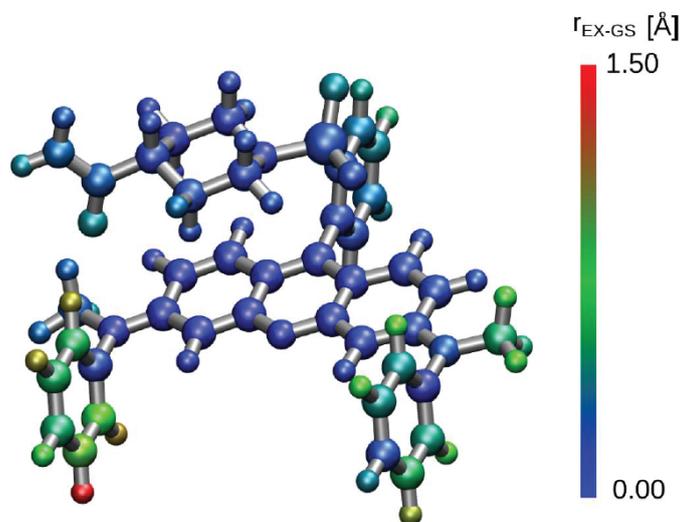


FIGURE II.12 – Représentation des changements de géométrie de QSY7 entre les structures à minimum d'énergie des états S_0 (GS) et S_1 (EX) calculés au niveau ω B97X-D[105]/def2SVP[106] en utilisant Gaussian09 Rev D.01[107]. Le code couleur des atomes retranscrit la longueur du vecteur de déplacement entre la géométrie de l'état fondamental (GS) et l'état excité relaxé (EX).

(chaque étape décrite est représentée sur la figure II.13). Les photons absorbés successivement mènent chacun à l'état excité S_1 qui relaxe par conversion interne vers l'état fondamental S_0 où le système revient en capacité d'absorber un photon supplémentaire. Lors du mécanisme de relaxation par IC, seuls quelques modes vibrationnels résonnants sont excités, puis, l'IVR joue son rôle de redistribution sur l'ensemble des degrés de liberté du système. Si l'IVR était complet et instantané, les voies de fragmentation les plus basses seraient empruntées dans les mêmes proportions (rapports de branchement) qu'observé par CID. L'observation des mêmes fragments par LID suggère que la fragmentation a bien lieu à l'état fondamental, mais les différences de BR posent nécessairement question. A partir de l'observation préférentielle de fragments "du chromophore" par LID, on peut forger l'hypothèse suivante : à partir de l'état électronique excité 'sur' le chromophore, le processus de IC implique vraisemblablement des états vibrationnels localisés eux aussi au niveau du chromophore. Dans ce cas, un IVR incomplet expliquerait une accumulation non statistique d'énergie au niveau du chromophore et, ainsi, l'observation non conforme à l'énergétique statistique, de fragments localisés sur le chromophore. Selon ces considérations, qui seraient à confirmer par des simulations de couplage vibroniques, on peut postuler que le caractère "photo-spécifique" de la fragmentation du QSY7 tient à la compétition entre processus de redistribution IVR et processus d'accumulation d'énergie (par IC) sur certains modes vibrationnels spécifiques pouvant mener à une fragmentation "locale" du chromophore. Cette fragmentation "locale" du chromophore et les rapports de branchement différents du linker et du peptide peuvent également s'expliquer par la présence "d'un goulot d'étranglement" de la redistribution de l'énergie au niveau de la liaison C-S-N.

La fluorescence ou la fragmentation dans les états électroniques excités (*cf.* Kulesza *et al.*) ou

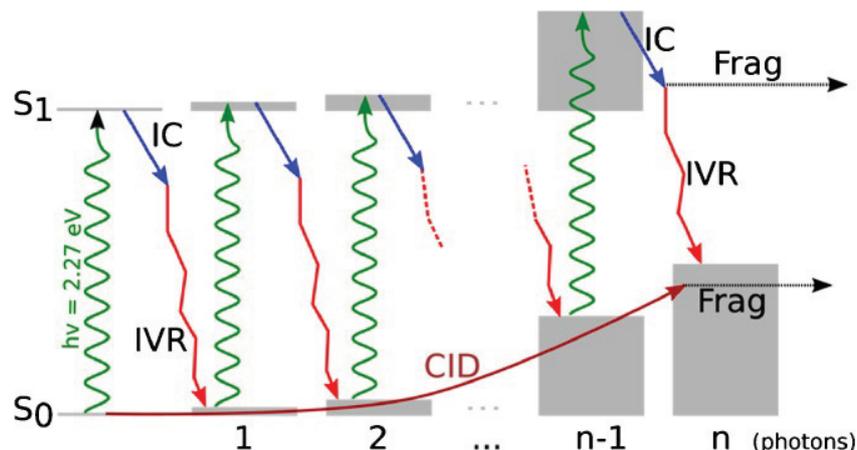


FIGURE II.13 – Schéma représentant les processus énergétiques suivant la CID (flèche rouge foncée) et VisPD dans un système peptide-chromophore. CID : les collisions induisent une excitation progressive des modes vibrationnels. VisPD : l'absorption d'un photon à 545 nm apporte 2.27 eV (flèche verte) au système. L'énergie électronique de l'état excité est convertie en énergie vibrationnelle par conversion interne (flèche bleue), puis elle est redistribuée sur tous les modes du système par IVR (flèche rouge). L'absorption séquentielle des photons suivie de la CI chauffe progressivement les états vibrationnels de la molécule (rectangles gris).

après conversion interne ne sont pas les seules voies de relaxation ouvertes après l'absorption de photons mais qu'il y a aussi, parmi les autres voies existantes (*cf.* Jockusch *et al.*) la possibilité qu'il se produise un "croisement" inter-système (ISC) vers un état triplet. C'est cet aspect particulier qui a été sondé dans la section suivante. Nous avons généré et caractérisé l'état triplet de la Rhodamine6G, nous avons également mesuré sa durée de vie et enfin nous avons étudié sa réactivité avec un gaz radicalaire.

III Réactivité de l'état triplet de la Rhodamine

III.1 Introduction

La rhodamine est un colorant fluorescent. Il est largement utilisé dans de nombreux domaines car peu coûteux et la synthèse [92] et la modification de ce composé sont facilement mises en œuvre pour la production de colorants adaptés aux besoins : sonde du micro-environnement cellulaire pour des études d'imagerie par fluorescence [93], sonde de réactifs à base d'ions métalliques, anions et thiols biocompatibles[108, 109], sonde pour la bio-imagerie par FRET[110], catalyseur photoredox de réactions d'arylation par lumière visible[111]. Très peu d'études ont cependant été menées sur la réactivité spécifique de l'état triplet. Parmi ces rares études, des mesures de réactivité de l'état triplet de la rhodamine $6G^+$ (${}^3Rh6G^+$) ont montré qu'un transfert de proton pouvait avoir lieu vers des bases.[112] Cette réactivité a également été observée entre la rhodamines et de petites molécules; ces études ont montré que certaines espèces comme l'oxygène, les radicaux nitroxyl et le cyclooctatétraène pouvaient quencher l'état triplet.

III.2 Méthode

Le spectromètre de masse utilisé dans cette étude est le piège linéaire quadripolaire (LTQ Velos) décrit dans le chapitre 1. La formation de l'état triplet de la rhodamine est mise en place en piégeant la rhodamine cationique à m/z 443. L'état triplet est généré en irradiant la rhodamine piégée par un laser à diode continu (CW) à 488 nm pendant 500 ms, avec une puissance de 15 mW. Ces ions sont sélectionnés une seconde fois (MS^3) afin de les laisser évoluer le temps qu'il faut vers l'état triplet. Cet état est sondé dans une troisième étape de piégeage (MS^4) par LID. Les spectre d'action sont également mesuré à cette étape MS^4 . L'acquisition du spectre optique du singulet uniquement suit la même procédure excepté que le laser CW reste éteint pendant les 500 ms de la première étape de sélection. Les spectres optiques de $RH6G^+$ sont mesurés en scannant l'OPO de manière continue de 550 à 650 nm par pas de 0,1 nm/s, en enregistrant simultanément les spectres de masse.

L'évolution de la population de triplet au cours du temps est sondée en scannant les temps de piégeage (sans activation) en MS^3 . La durée du piégeage est ajustée de 10 ms à 10 s. La LID est exécutée par un OPO (Horizon) pompé par la troisième harmonique d'un laser ns Nd:Yag décrit également dans le chapitre 1. La longueur d'onde est fixée à 600 nm avec une puissance de 8 mJ/pulse. Afin de minimiser le bruit et la déviation standard de la mesure, 150 microscans sont enregistrés pour chaque délai.

Pour les expériences de réactivité, la ligne standard d'hélium a été remplacée afin de connecter à la place une bouteille d'hélium contenant 1% de $\bullet NO$. La réactivité de la Rhodamine avec NO_2 laisse supposer la présence d' O_2 dans la ligne He:NO qui viendrait de l'oxygène de l'air s'étant répandu dans la ligne au moment de son changement.

III.3 Génération et caractérisation de l'état triplet

Le très haut rendement quantique de fluorescence de la rhodamine indique que la voie de relaxation majoritaire est la fluorescence. Il révèle que l'"inter-system crossing" est une voie peu probable, donc que l'état triplet est peu accessible. En revanche, une fois cet état peuplé, la durée de vie peut aller jusqu'à quelques secondes en phase gazeuse. Ainsi notre démarche consiste à peupler progressivement l'état triplet en excitant la transition $S_1 \leftarrow S_0$ pendant plusieurs secondes. L'approche précédemment présentée par Schooss *et al.*, consistait à mesurer la dynamique de rétablissement de la fluorescence de diverses rhodamines pour mettre en évidence la formation de ces ions à l'état triplet.[113, 114] Dans cette approche, les mesures de fluorescence de la rhodamine sont directement effectuées dans le piège à ion à 85 K. Les photons émis sont détectés au sein du piège. La dynamique de "retour" des ions à l'état S_0 peut être directement reliée à la population de l'état T_1 . La population de T_1 a été montrée comme étant un paramètre indépendant du recouvrement des ions avec le laser, des ions qui sont restés à l'état singulet, du nombre d'ions dans le piège et des autres voies de relaxations possibles. Il a été observé par Schooss *et al.* que la durée de vie de l'état triplet en phase gazeuse est plusieurs ordres de grandeur plus longue que celle mesurée en phase liquide.

Dans notre cas, n'ayant pas la possibilité de détecter les photons émis au sein du piège à ions, nous avons développé une méthode alternative, la spectroscopie de fragmentation, permettant de mettre en évidence et quantifier la population du triplet (de manière relative).

La CID est une technique très utilisée afin de caractériser la chimie de ions moléculaires. C'est pourquoi nous avons comparé les spectres CID de $^1\text{Rh6G}^+$ et $^3\text{Rh6G}^+$ (figure III.14). Nous avons souhaité mettre en évidence l'état électronique de la rhodamine grâce à l'analyse des fragments issus de la CID.

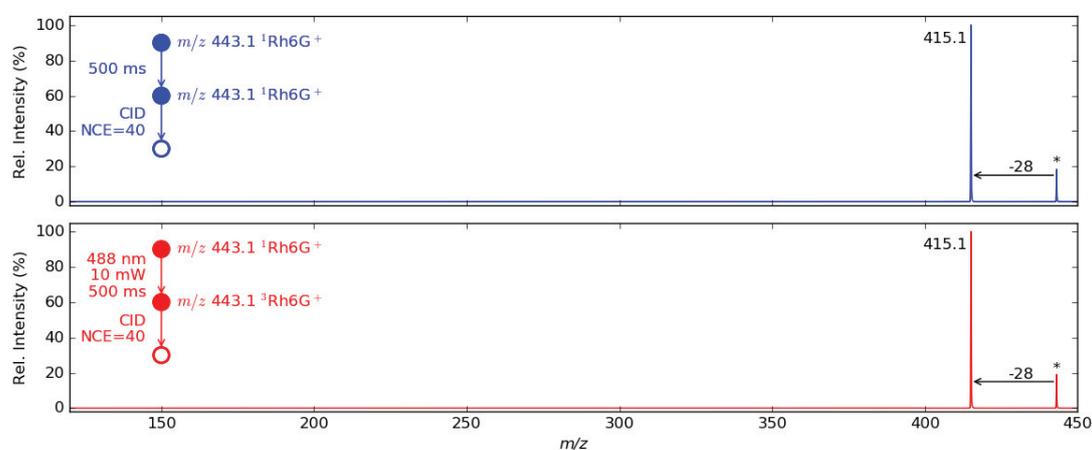


FIGURE III.14 – Spectres CID de Rh6G^+ à m/z 443,1 après 500 ms de piégeage sans irradiation (haut, $^1\text{Rh6G}^+$) et 500 ms d'irradiation à 488 nm (bas, $^3\text{Rh6G}^+$)

Les spectres CID de $^1\text{Rh6G}^+$ et $^3\text{Rh6G}^+$ sont sensiblement identiques que ce soit en terme d'intensité ou du motif de fragmentation. Le fragment majoritaire est à m/z 415.1, il correspond à une perte de C_2H_4 et apparaît autour d'une NCE de 25%. La CID ne semble donc pas être la technique adéquate pour observer la rhodamine à l'état triplet. Nous nous sommes donc servis de ses propriétés d'absorption spécifiques à 600 nm. Les spectres de photo-fragmentation de $^1\text{Rh6G}^+$ et $^3\text{Rh6G}^+$ sont présentés sur la figure III.15. Ces spectres montrent que $^3\text{Rh6G}^+$ absorbe autour de 600 nm, ce n'est pas le cas pour $^1\text{Rh6G}^+$. Il semble également que les propriétés d'absorption de l'état triplet soient les mêmes qu'en phase liquide.[115, 116] Par cette méthode nous avons mis en évidence la formation de l'état triplet.

Les fragments issus de la photo-dissociation de $^3\text{Rh6G}^+$ à 600 nm sont m/z 414.1, m/z 415.1, m/z 341.1, m/z 327.1 et m/z 428.1 et ne sont pas observés sur le spectre LID de $^1\text{Rh6G}^+$ (figure III.16) L'analyse de la nature et de l'intensité des fragments issus de la photo-dissociation de la rhodamine peuvent nous en apprendre beaucoup sur la nature de l'état électronique à partir de laquelle la molécule dissocie et les voies de dissociation empruntées (*cf.* section II). Les fragments

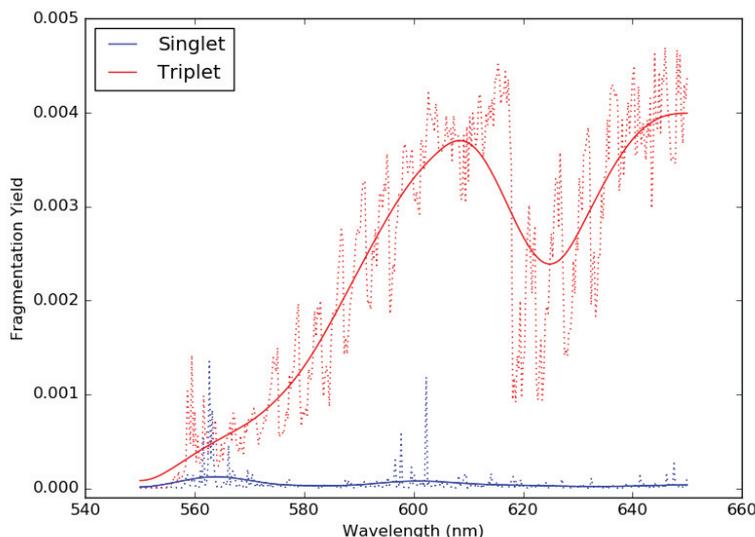


FIGURE III.15 – Spectre de fragmentation de la rhodamine 6G cationique après 500 ms d’irradiation à 488 nm (ligne rouge) et sans irradiation préalable (ligne bleue). Les propriétés optiques mesurées sont celles de l’état triplet - $^3\text{Rh6G}^+$. Les données brutes (pointillées) ont été lissées (ligne solide). Les intensités n’ont pas été normalisées.

m/z 414.1 et m/z 428.1 correspondent à une perte de Et^\bullet et Met^\bullet provenant d’une rupture homolytique (figure III.17). De tels fragments ne sont pas observés par CID à partir de la rhodamine B ni sur nos spectres CID (III.14).[117] Ils sont donc la signature de la nature radicalaire de la dissociation de l’état électronique triplet de la Rhodamine à 600 nm. Les calculs DFT, effectués par Dr. B. Chan, à partir des mécanismes de réaction proposés figure III.17 suggèrent que les fragments Et^\bullet et Met^\bullet proviennent le plus probablement d’un groupement N-ethyl. La première étape donnant lieu à la formation d’un fragment N- CH_2 certainement stabilisé par les électrons conjugués du système aromatique. Les calculs ont donné des énergies de réaction qui engendrent les fragments Met^\bullet et Et^\bullet pour $^3\text{Rh6G}^+$, de 148 kJ/mol et 164 kJ/mol (ces énergies sont bien plus hautes pour $^1\text{Rh6G}^+$: > 300 kJ/mol).

Les mesures d’évolution de la fragmentation en fonction de l’énergie de collision de l’état triplet de la rhodamine (après 500 ms à 488 nm) et du singulet (après 500 ms sans irradiation) sont présentés figure III.18). On peut noter qu’il est impossible de différencier l’évolution de la fragmentation du triplet (demi-cercle rouge) de la fragmentation du singulet (demi-cercle bleu et cyan). Ces résultats nous indiquent que les collisions énergétiques avec l’état triplet, ramènent la rhodamine à l’état singulet avant de former des fragments. On peut donc supposer que les collisions énergétiques agissent comme quencher de l’état triplet. On en déduit (de nouveau) que la CID, qu’il s’agisse de la nature des fragments ou de l’évolution de leur intensité en fonction de l’énergie de collision, ne peut être utilisée comme sonde de l’excitation de l’état triplet.

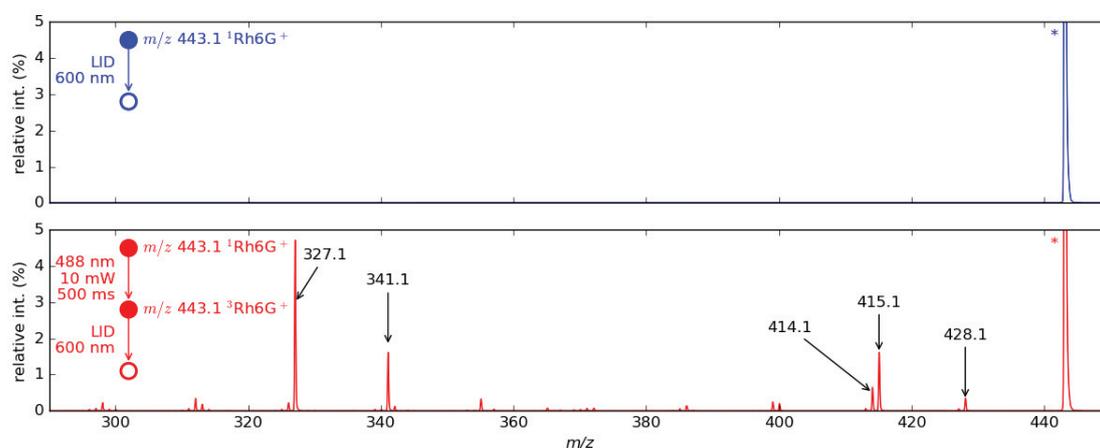


FIGURE III.16 – Spectres de masse LID à 600 nm après 500 ms sans irradiation (haut, singulet) et après 500 ms d’irradiation à 600 nm (bas, Triplet) de la $[Rh6G^+]$ à m/z 443,1 (annoté *).

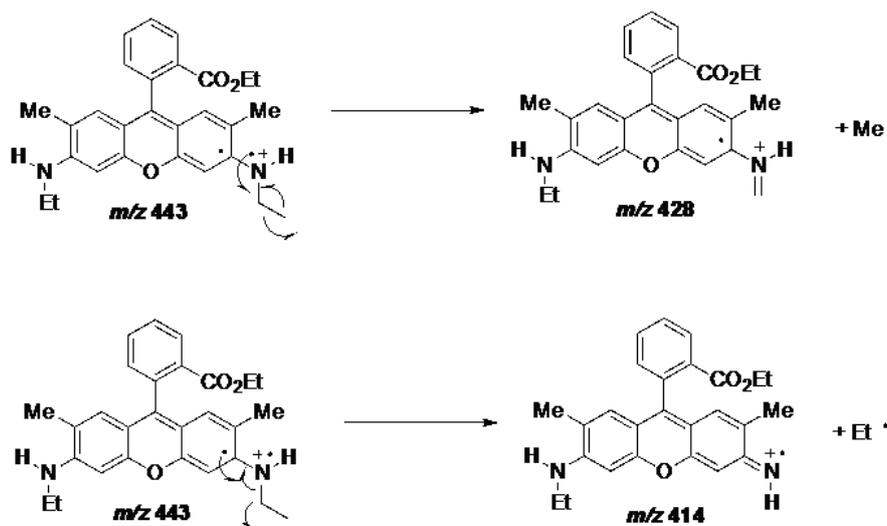


FIGURE III.17 – Schéma du mécanisme proposé pour la perte des radicaux Met et Et de ${}^3Rh6G^+$

III.4 Évolution de la population de l’état triplet

On a vu que la fragmentation à 600 nm était spécifique du triplet. Par conséquent, le rendement de photo-fragmentation à 600 nm est proportionnel à la population du triplet et grâce au dispositif pompe-sonde il est possible de suivre l’évolution de cette population en utilisant l’évolution du rapport de photo-fragmentation à 600 nm en fonction du temps de relaxation après une irradiation à 488 nm.

Sur la figure III.19, sont présentés les rapports de fragmentation en fonction du délai pompe-

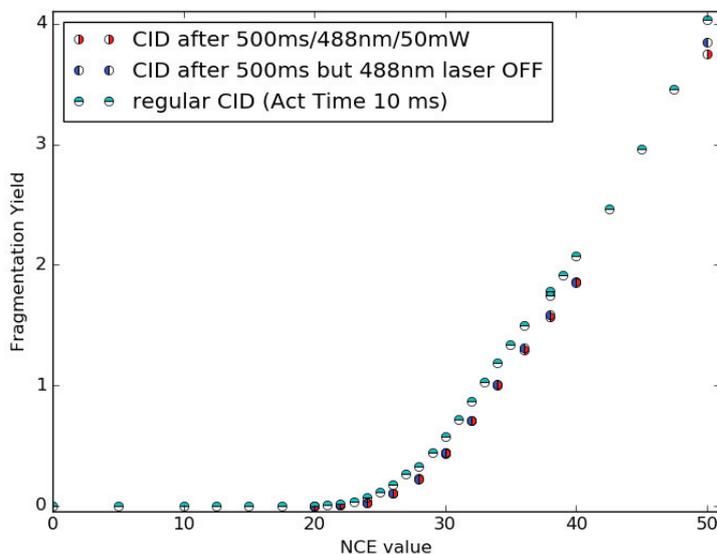


FIGURE III.18 – Rendement de fragmentation de la rhodamine $6G^+$ en fonction de l'énergie par collision (NCE), après 500 ms sans irradiation (bleu), après 500 ms à 488 nm (rouge), sans irradiation et immédiatement après la sélection (cyan)

sonde dans l'hélium (en bleu) et dans l'Hélium avec 1% de NO (rouge). Les différents jeux de données (cercle, étoile, triangle, pentagone) présentent un déclin mono-exponentiel. Tous les jeux de données ont été fittés ensemble (pour les deux gaz tampons) par une fonction de décroissance mono-exponentielle de type :

$$A_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} + B \quad (2.6)$$

Où A_0 et B sont des paramètres ajustables. Ils sont variables pour chaque jeu de donnée. Ils prennent en compte les petites variations des conditions expérimentales pouvant affecter le système observé (pression, température, puissance laser, *etc.*) Le temps caractéristique τ est le paramètre commun à tous les jeux de données. Ce paramètre est le marqueur de la durée de vie de l'état triplet. Donc dans des conditions semblable cette durée est indépendante des conditions expérimentales et doit donc être identique pour chaque jeu de donnée. La fonction issue du modèle prenant en compte les différentes constantes de réaction est décrite plus en détail dans la sous-partie III.7.

D'après les résultats du fit, dans l'hélium, la durée de vie de l'état triplet est de 1888 ± 47 ms, ce qui est du même ordre de grandeur que les données de la littérature (2060 ms).[113] Les collisions avec les gaz rares quenchant très inefficacement l'état triplet à la différence de l'He.[114] La différence de pression d'He ($< 0,4 \times 10^{-3}$ mbar ici et 0,2 mbar pour la ref[113]) ne semble pas jouer de rôle sur la durée de vie du triplet. Greisch *et al.* ont choisi de faire ces mesures à haute pression

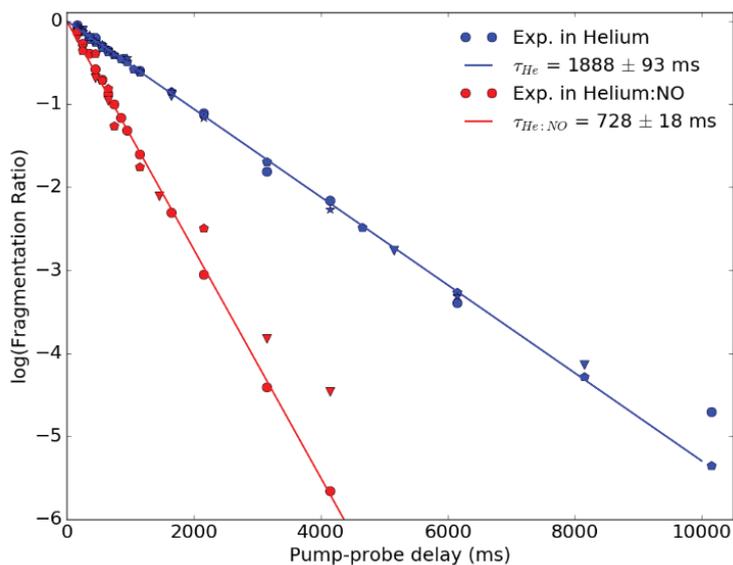


FIGURE III.19 – Évolution du rapport de photo-fragmentation de Rh6G^+ à 600 nm en fonction du délai pompe-sonde après 500 ms d’irradiation à 488 nm dans l’hélium (bleu) et hélium avec 1% de NO (rouge). Plusieurs jeux de données sont tracés sur la figure (circle, étoile, triangle, pentagone)

de manière à ce que le refroidissement collisionnel empêche la dissociation de Rh6G^+ . La différence avec la durée de vie rapportée par Kondel *et al.* réside probablement dans les traces éventuelles de O_2 quencher de triplet, provenant certainement de la source électrospray (à pression atmosphérique) ou dans les différentes températures des pièges (≥ 298 K ici *vs* 286 K) qui activent alors des processus de relaxation non radiative vers l’état singulet fondamental, dans notre dispositif.[113, 114]

Nous avons sondé l’effet du réchauffement par collision sur le quenching de l’état triplet en utilisant le même dispositif pompe-sonde. Nous avons mesuré la dissociation photo-induite à 600 nm après 500 ms d’irradiation à 488 nm et activation par collision à différents NCE (figure III.20).

Sur la figure III.20, le rendement de photo-fragmentation après application d’une NCE présente une courbe décroissante que l’on a fittée par une fonction mono-exponentielle. Ainsi, la valeur de NCE associée au quenching de l’état triplet est très faible, de l’ordre de 0.5 %. De plus on peut voir sur cette même figure, panneau de gauche, que la largeur de la fenêtre d’isolation a une grande influence sur le rendement de photo-dissociation. De précédentes études ont montré des résultats similaires. L’excitation par collision avec une fenêtre d’isolation étroite peut induire la rupture de liaisons faibles, de complexes non covalents mais également des réarrangements structuraux de faible énergie.[118, 119]

Par conséquent, l’excitation par collisions de ${}^3\text{Rh6G}^+$, due à l’application d’une énergie de collision et/ou une étroite fenêtre d’isolation, engendre un quenching du triplet. Ces observations

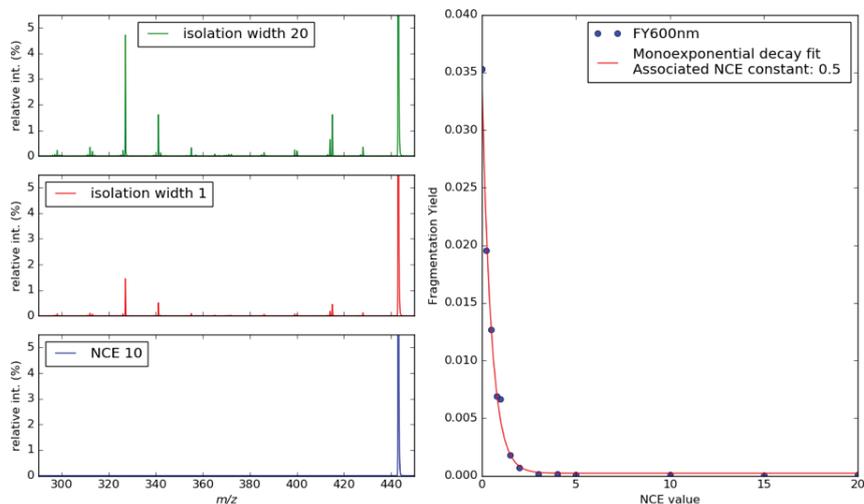


FIGURE III.20 – Rendement de photo-fragmentation de la rhodamine $6G^+$ en fonction de l'énergie par collision (NCE) après 500 ms à 488 nm (droite). Spectre de masse LID à 600 nm après 500 ms d'irradiation à 488 nm suivie par une large fenêtre d'isolation $\Delta m/z$ 20 (haut gauche), une petite fenêtre d'isolation $\Delta m/z$ 1 (milieu gauche), et une large fenêtre d'isolation et une NCE de 10 avant l'impulsion à 600 nm (bas gauche)

confirment la grande sensibilité de l'état triplet face au chauffage collisionnel.

III.5 Compétition entre réactivité et quenching

Enfin, la durée de vie de l'état triplet a été mesurée en présence de $\bullet\text{NO}$ dans le piège (figure III.19, rouge). La durée de vie est alors réduite à 728 ± 9 ms. Elle reste très longue comparée aux valeurs obtenues en phase liquide mais devient 3 fois moins grande que la durée de vie du triplet dans l'hélium seul. Les collisions avec $\bullet\text{NO}$ sont supposées quencher l'état triplet à l'instar du dioxygène : avec 1% de O_2 dans le gaz tampon ($\sim 2 \times 10^4$ collisions ion/ O_2 par seconde), le temps de vie de ${}^3\text{Rh6G}^+$ est trop court pour être mesuré.[120] Le quenching privilégié par $\bullet\text{NO}$ plutôt que He est dû probablement aux interactions électroniques plus favorables entre ${}^3\text{Rh6G}^+$ et le doublet de $\bullet\text{NO}$. Par ailleurs, lorsque l'interaction électronique est optimale, la réactivité chimique modifie le système et laisse place au composé nitroso à l'état fondamental. Ainsi, la réactivité associée au quenching diminue sensiblement la durée de vie de ${}^3\text{Rh6G}^+$.

III.6 Réactivité de l'état triplet

C'est donc à cette réactivité que nous nous sommes ensuite intéressés. Nous avons sondé la réactivité de l'état triplet de la rhodamine $6G^+$ en ajoutant au gaz tampon 1% de $\bullet\text{NO}$ ce qui correspond à ~ 60 collisions ion/ $\bullet\text{NO}$ par seconde dans le piège à ions.[120, 121]

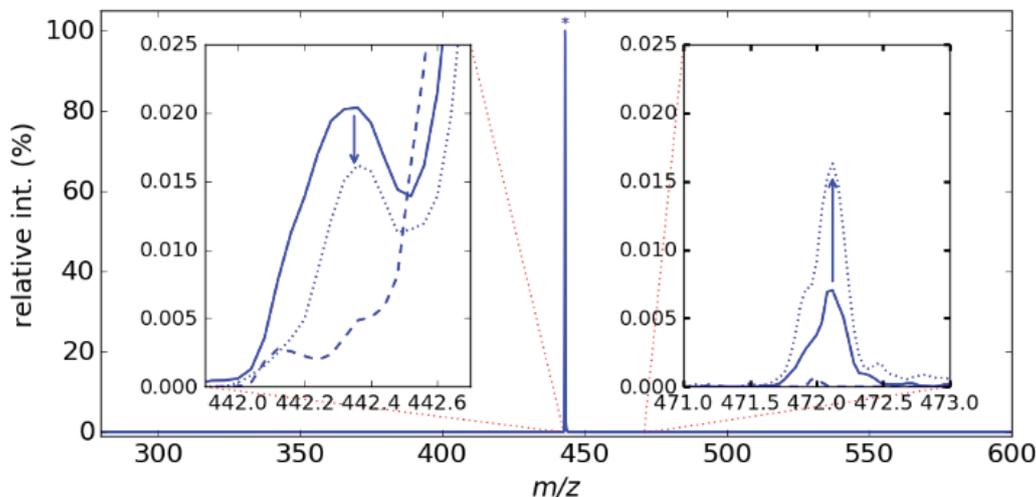


FIGURE III.21 – Spectres de masse mesurés après 500 ms d’irradiation à 488 nm suivi par une sélection MS^3 de 500 ms en présence de $\bullet NO$ (ligne continue), 5000 ms avec $\bullet NO$ (pointillés), sans $\bullet NO$ (tirets) de la $Rh6G^+$ à m/z 443,1 (annoté *). Les encarts gauches et droits montrent les pics des ions produits $[Rh6G-H]^{\bullet+}$ et $[Rh6G-H+NO]^+$

La figure III.21 présente les spectres de masse obtenus après 500 ms d’irradiation à 488 nm, à plusieurs durées de réaction (ligne continue 500 ms, pointillés 5000 ms) avec $\bullet NO$ et sans $\bullet NO$ (tirets). Aucun changement n’apparaît sur le spectre de masse sans irradiation préalable à 488 nm en présence de $\bullet NO$. En revanche, quelques pics apparaissent après l’irradiation à 488 nm. Ces pics peuvent être expliqués par la réactivité de l’état triplet de la Rhodamine. ${}^3Rh6G^+$ réagit avec $\bullet NO$ pour former un pic à m/z 442,2 et 472,2 correspondant respectivement à $[Rh6G-H]^{\bullet+}$ et $[Rh6G-H+NO]^+$. La cinétique de formation de ces produits n’étant pas mesurable (car d’intensité trop faible), l’évolution de l’intensité de ces derniers suggère cependant qu’ils ont été formés à partir de ${}^3Rh6G^+ \rightarrow [Rh6G-H]^{\bullet+}$ État singulet (ss) $\rightarrow [Rh6G-H+NO]^+$. Le rapport de branchement des collisions réactives avec $\bullet NO$ pour produire $[Rh6G-H+NO]^+$ est estimé au maximum à 0,2%-1%. Par conséquent, la majorité des collisions entre ${}^3Rh6G^+$ et $\bullet NO$ ne sont pas réactives. De fait, plus le piégeage est long (plus la durée d’interaction de ${}^3Rh6G^+$ avec $\bullet NO$ est grande) plus on observe de produits de la réaction.

Les produits de la réaction sont formés tout au long de la durée de vie de l’état triplet (figure III.22). Cette durée est $\sim 10^3$ fois plus grande que le temps de refroidissement collisionnel déterminé par le même dispositif pompe-sonde après photo-excitation visible de QSY7 dans la partie II précédente, figure II.6.[96] La formation de ces produits de réaction ne peut avoir lieu à partir des singulets vibrationnellement chauds produits par le laser continu.

Sur la figure III.23, on note que les produits de réaction sont beaucoup plus intenses lorsque la puissance du laser continu est la plus importante (cyan). Il apparaît donc que la formation de ces

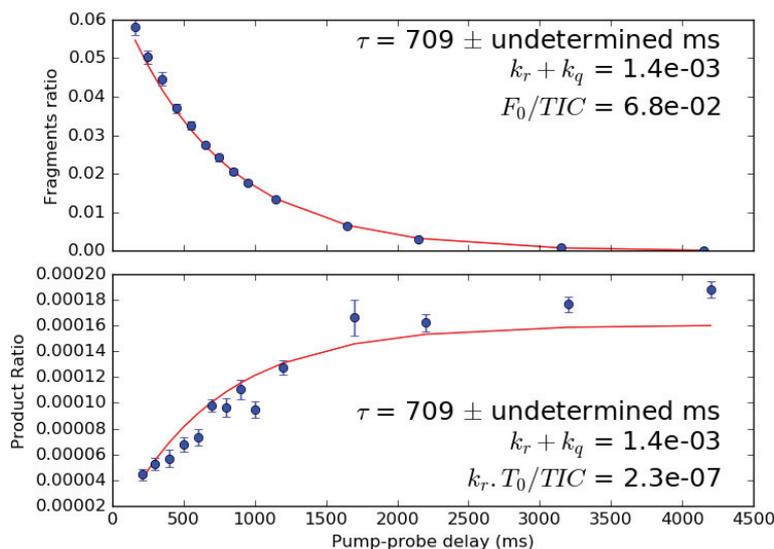


FIGURE III.22 – Rapport de la fragmentation (haut) et de la formation des produit (bas) en fonction du délai pompe-sonde pour un jeu de donnée de la Rhodamine dans He:NO. La calcul des fits est détaillé dans la partie III.7

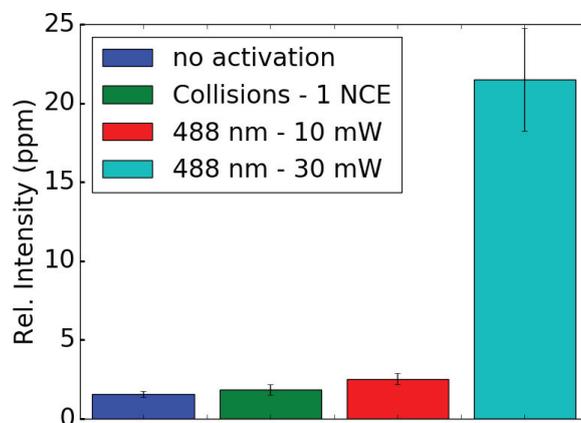


FIGURE III.23 – Intensité relative des produits Nitroso (en ppm relativement à l'intensité de l'ion parent). Les barres d'erreur indiquent une incertitude de 2σ .

produits ne soit possible qu'en la présence de l'état triplet de la Rhodamine. Cette réactivité semble être favorisée par le caractère radicalaire de l'état électronique triplet.

Les calculs DFT du Dr. B. Chan ont permis de révéler quelques mécanismes de réaction possibles et la thermochimie associée à ces mécanismes (figure III.24). Le mécanisme correspondant à l'addition simultanée de $\bullet\text{NO}$ et la perte de H est très endothermique, son enthalpie de réaction est de 260 kJ/mol pour le singulet mais est beaucoup moins endothermique pour le triplet 64 kJ/-

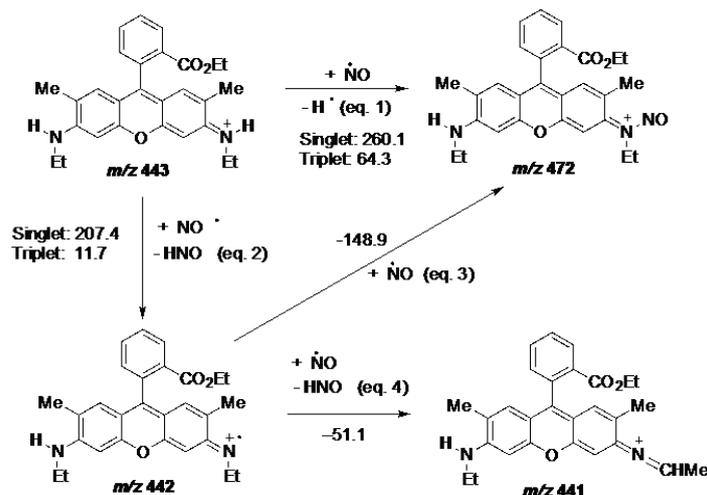


FIGURE III.24 – Thermochimie associée à la réaction du triplet avec NO calculé par DFT.

mol (figure III.24 eq.1). La deuxième voie possible est la perte d'un atome d'hydrogène en premier lieu, pour former $[\text{Rh6G-H}]^{\bullet+}$ puis HNO (figure III.24 eq.2) suivi de l'ajout de $\bullet\text{NO}$ pour former la nitroso-Rhodamine $[\text{Rh6G-H+NO}]^{\bullet+}$ (figure III.24 eq.3). La première étape de ce second mécanisme est également très endothermique pour le singulet (207 kJ/mol). Cela explique qu'aucune réaction ne soit observée sans irradiation à 488 nm. Cependant, pour le triplet, la perte de l'hydrogène est moyennement endothermique, 12 kJ/mol, et est donc énergétiquement possible. L'ajout de $\bullet\text{NO}$ *a posteriori* est très exothermique (-149 kJ/mol). Les valeurs des énergies de ce mécanisme à plusieurs étapes montrent qu'il s'agit du plus probable. De plus, l'observation de l'intermédiaire réactionnel $[\text{Rh6G-H}]^{\bullet+}$ à m/z 442.2 corrobore ce mécanisme. Une seconde déshydrogénation à partir de $[\text{Rh6G-H}]^{\bullet+}$ pourrait former $[\text{Rh6G-2H}]^{\bullet+}$. Cette réaction est calculée comme étant exothermique (-51 kJ/mol) mais n'est pas observée expérimentalement (figure III.24 eq.4). La raison la plus évidente au fait que l'on n'observe pas cette réaction est que l'ajout de $\bullet\text{NO}$ en compétition avec cette réaction (eq.3 *vs* eq.4) est 3 fois plus énergétiquement favorable (-149 kJ/mol *vs* -51 kJ/mol). Il y a donc peu de chances d'observer $[\text{Rh6G-2H}]^{\bullet+}$.

La réaction de la rhodamine avec NO_2 a également été étudiée. Durant l'installation de la ligne He:NO, il y a vraisemblablement eu génération de $\bullet\text{NO}_2$ par la réaction entre le $\bullet\text{NO}$ de la bouteille et le reste de O_2 de l'air qui remplissait la ligne d'introduction du gaz.[121, 122] Nous avons observé de manière transitoire au début des expériences, des pics évoquant une réaction avec NO_2 , figure III.25. C'est sur cette base que nous avons pensé à la génération de NO_2 par la réaction entre $\bullet\text{NO}$ et O_2 . Les résultats obtenus montrent, figure III.25, un pic à m/z 441,2 quand $\bullet\text{NO}_2$ est présent dans le piège (-2 Da par rapport à l'ion parent, pic de gauche, panneau de gauche) et un pic à m/z 488,2 (panneau de droite) correspondant à la nitro-rhodamine. Cette réaction fortuite nous a permis d'envisager un autre type de mécanisme pouvant avoir lieu (figure III.26). La nature endothermique de chaque étape de réactions avec le singulet réduit toute possibilité que NO_2

III Réactivité de l'état triplet de la Rhodamine

puisse réagir avec celui-ci. En revanche, la déshydrogénation du triplet (m/z 442) est hautement exothermique (-119 kJ/mol). De plus, contrairement à la réaction avec $\bullet\text{NO}$, la perte d'un second hydrogène pour former le produit $[\text{Rh6G} - 2\text{H}]^+$ (m/z 441, -182 kJ/mol) est en compétition avec la formation de $[\text{Rh6G} - \text{H} + \text{NO}_2]^+$ (m/z 488, -163 kJ/mol). L'observation de ces deux pics sur le spectre de masse est cohérent avec les calculs effectués sur les mécanismes proposés.

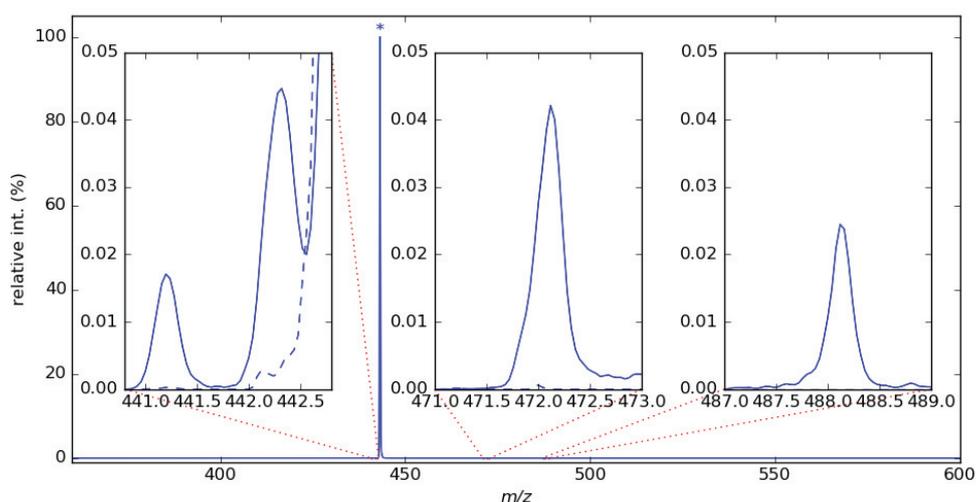


FIGURE III.25 – Spectres de masse mesurés après 500 ms d'irradiation à 488 nm suivi d'une étape MS^3 sans NO (tirets), avec NO (ligne continue) de la RH6G^+ à m/z 443,1 (annoté *).

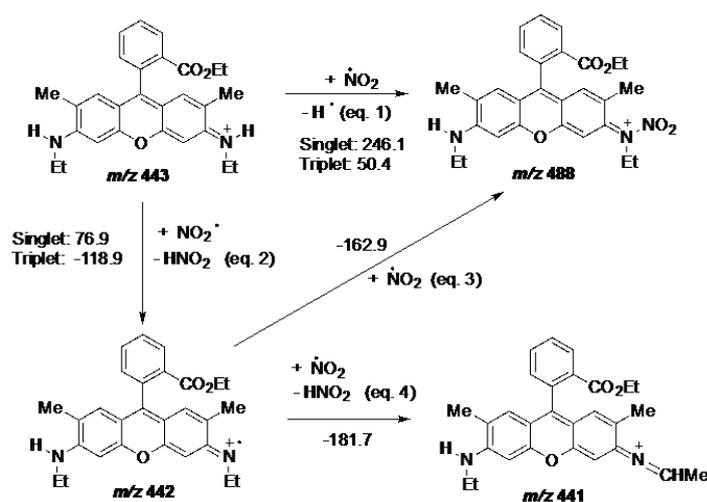


FIGURE III.26 – Thermochimie associée à la réaction du triplet avec NO_2 calculée par DFT.

III.7 Traitement de données

Dans cette partie, les différentes méthodes et modèles utilisés pour les traitement de données sont décrits.

Évolution de la population des différents acteurs de la formation de l'état triplet

La population relative du triplet (T), des fragments du singulet (S) et des produits (P) ainsi que les rapports de branchement entre la réaction du triplet de la rhodamine avec $\bullet\text{NO}$ vs. le quenching vers l'état singulet peuvent être estimés en utilisant un modèle cinétique simple présenté sur la figure III.27.

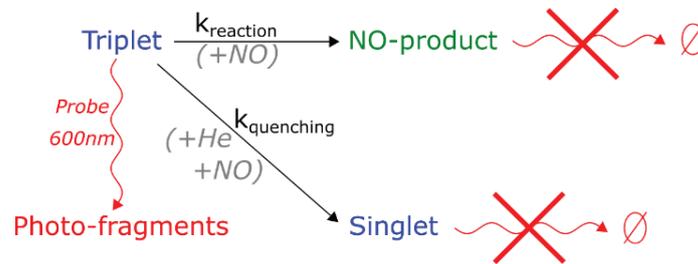


FIGURE III.27 – Schéma de la cinétique de réaction de ${}^3\text{RH6G}^+$ avec $\bullet\text{NO}$

Le triplet peut réagir avec $\bullet\text{NO}$ ou être éteint ($k_{\text{réaction}}$ vs. k_{quench}). Dans l'approximation du régime permanent pour $\bullet\text{NO}$, les pseudo constantes de vitesse du premier ordre sont notées k_r et k_q et le système peut être intégré par :

$$\begin{cases} T(t) = T_0 \cdot e^{-(k_r+k_q) \cdot t} \\ F(t) = T_0 \cdot (1 - e^{-\sigma \cdot \Phi \cdot \delta t}) \cdot e^{-(k_r+k_q) \cdot t} \\ P(t) = \frac{k_r \cdot T_0}{k_r+k_q} \cdot (1 - e^{-(k_r+k_q) \cdot t}) \end{cases}$$

À partir du modèle $T(t)$ présenté ci-dessus, la durée de vie du triplet est $1/(k_r+k_q)$. La quantité de fragments évolue selon une courbe mono-exponentielle décroissante, donc k_r+k_q peut être extrait en fittant le rapport de fragmentation. Les fits ont été ajustés en utilisant la méthode des moindres carrés. La formation du triplet ainsi que des fragments dépendent des conditions expérimentales, les différents jeux de données ont été fittés et le préfacteur a donc été déterminé indépendamment les uns des autres. La constante de déclin a été considérée comme une variable commune à tous les jeux de données dans les mêmes conditions de piégeage (gaz tampon He, température ambiante).

Extraire les rapports de branchement de la réaction du triplet vs. le quenching à partir des données expérimentales:

Le pré-facteur des produits P (défini dans la sous partie III.4), $k_r/(k_r+k_q)$ est le rapport de bran-

III Réactivité de l'état triplet de la Rhodamine

	jeu de données	Fits exponentiels des fragments et produits (s ⁻¹)			limite supérieure pour $k_r/(k_r+k_q)$
		k_r+k_q	$k_r.T_0$	F_0	
He:NO	5	1,4	0,23	68	2,4‰
	6	1,3	0,26	18	11,1‰
	7	1,6	0,26	19	8,6‰

TABLE 2.4 – Degrés de liberté vibrationnels et nombre de photons absorbés déterminés pour chaque système étudié à partir du fit des résultats expérimentaux et des simulations.

chement de la réaction *vs.* quenching multiplié par T_0 . Il peut être extrait à partir de l'ajustement par une fonction mono-exponentielle des résultats. Il faudra diviser le résultat par T_0 pour obtenir la valeur du rapport de branchement. Il est cependant impossible de déterminer la quantité de triplet dans le piège car on ne connaît pas la contribution du singulet dont le rapport m/z est identique. En revanche, les ions étant tous mono-chargés et les fragments issus de la photo-dissociation à 600 nm sont tous associés à la fragmentation du triplet. On peut ainsi remonter à la population de ce dernier. La quantité de fragments est proportionnelle à la population du triplet. La section efficace d'absorption σ , Φ la fluence et δt le temps d'interaction sont constants pour un même système. De fait, la quantité de fragments donne une valeur minimale de la population du triplet. Les trois variables des fits sont alors déterminées comme:

$$\begin{cases} k_r.T_0 \\ k_r + k_q \\ T_0.(1 - e^{-\sigma.\Phi.\delta t}) \end{cases}$$

Pour chaque jeu de données, la variable k_r+k_q est un paramètre partagé. On a pu ainsi en déduire l'équation 2.7

$$\frac{k_r}{k_r + k_q} \leq \frac{k_r.T_0}{k_r + k_q} \cdot \frac{1}{F_0} \quad (2.7)$$

Les résultats des fits et les limites maximales des rapports de branchement sont rassemblés dans le tableau 2.4

III.8 Conclusion

Nous avons mis en place un dispositif pompe-sonde qui nous a permis de mesurer les propriétés optiques, la durée de vie et la réactivité de ${}^3\text{Rh6G}^+$. Ces mesures peuvent être réalisées sur l'état triplet de divers systèmes à condition qu'il ait une longueur d'onde d'excitation spécifique de manière à pouvoir mesurer la population du triplet. De plus, bien que la section efficace de réaction du triplet avec $\bullet\text{NO}$ soit très faible en rapport avec sa désactivation, cette réaction peut être une voie de photo-dégradation possible. Enchaîner successivement la transition $S_0 \leftarrow S_1$ sur une longue période, peut accélérer le photo-blanchiment qu'il est important de comprendre afin de l'éviter, notamment dans les applications en imagerie. D'autre part, les réactions avec $\bullet\text{NO}$ se produisent pendant toute la durée de vie du triplet.

D'autres dérivés de la Rhodamine, Rh575⁺, RhB⁺ et Rh101⁺ qui sont aisément transférés en phase gazeuse par ESI sont de bons candidats pour de futures études.[113] Il sera possible d'étudier les effets de l'agrégation de dérivés de colorant sur la durée de vie et la réactivité de l'état triplet grâce à la capacité de sélectionner en masse les ions d'intérêt. Enfin, le dispositif expérimental que nous avons mis en place nous permet de préparer les intermédiaires par laser, de déterminer leur propriétés optiques et d'observer les produits de réactions sous différentes conditions. Ce dispositif ouvre la voie à de nouvelles études de photo-catalyse.

IV Perspectives : Expériences de réactivité sur ions photo-activés

Les chromophores ont l'avantage de rendre possible la photo-dissociation dans le visible de la plupart des biomolécules, qui n'absorbent pas dans cette gamme de longueur d'onde. Leur propriété d'absorption, d'émission et autres voies de relaxation ouvrent un large champ d'application dans le domaine l'étude de structures de molécules biologiques.

L'exploration de toutes les voies de relaxation possibles après photo-excitation (fluorescence, fragmentation, réactivité, ISC, ...) et de leur fonctionnement, ainsi que la compétition entre ces voies et la réactivité de ces composés est donc essentielle pour interpréter correctement les phénomènes observés et mettre en place des techniques analytiques dérivées comme par exemple le FRET d'action.

Dans ce chapitre nous avons exploré deux voies de relaxation différentes. Dans le cas du quencher de fluorescence, le QSY7, nous avons pu observer que la fragmentation avait lieu par absorptions multiples de photons successifs. Le nombre de photons absorbés avant la dissociation a été déterminé grâce à l'utilisation de modèles théoriques. Enfin, les voies de relaxation empruntées ont pu être estimées grâce aux résultats expérimentaux, soutenus par des calculs de chimie théorique.

Le second cas exploré est la formation de l'état triplet de la rhodamine et sa durée de vie, mesurée par une expérience pompe-sonde avec des délais allant jusqu'à 10 s. Ces expériences, basées sur l'observation de la photo-fragmentation des ions a donné accès à la population de l'état triplet. Nous avons également été en mesure d'observer la réactivité du triplet avec un gaz radicalaire, •NO. Les calculs DFT menés en parallèle ont aidé à prévoir les mécanismes de réactions ayant lieu entre ces deux composés.

Dans le chapitre suivant nous sonderons de nouveau des processus dynamiques photo-induits en utilisant également un dispositif pompe-sonde laser à deux couleurs. Nous suivrons alors une cascade d'événements dont l'excitation, le transfert d'électron, le changement de conformation et le transfert de proton. L'étude de dynamiques conformationnelle de molécules biologiques sera le sujet central de ce projet.

Chapitre 3

Transfert de proton

I Introduction

I.1 Transfert de proton couplé au transfert d'électron

Le transfert de proton couplé au transfert d'électron (PCET) est un mécanisme réactionnel impliqué dans de nombreux processus biologiques comme la photosynthèse [13] et la respiration cellulaire [123]. Il permet également des réactions enzymatiques peu énergétiques.[124] On peut enfin le retrouver dans des mécanismes de production d'énergie (panneaux solaires).

Il s'agit comme son nom l'indique et de manière générale d'un processus impliquant le transfert d'un proton et celui d'un électron qui peuvent, par exemple, se faire simultanément ou bien de manière séquentielle. Ce transfert peut se produire entre un ou plusieurs sites dit "donneur(s)" et "accepteur(s)" de proton et électron. Les donneurs et accepteurs peuvent être des sites situés sur une seule ou bien plusieurs molécules. Il peut être déclenché par un certain nombre de stimuli physiques ou chimiques, par exemple, changement de pH ou température, photo-excitation, *etc.*

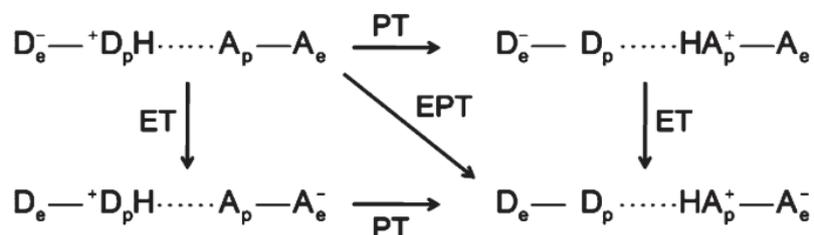


FIGURE I.1 – Schéma des différents mécanismes de transferts couplés de proton et électron avec A le/les accepteur(s) et D le/les donneur(s) [125].

On parle de transferts séquentiels lorsqu'il y a existence d'une espèce intermédiaire stable entre le transfert de l'électron et celui du proton, c'est à dire si cette espèce est observable expérimentale-

ment. La figure I.1 présente les différentes voies possibles de transfert d'électron couplé au transfert de proton. L'espèce initiale (qui peut être une seule ou deux molécules) est présentée en haut à gauche. En bas à droite est l'espèce finale, après PCET. Le mécanisme présenté en diagonale est le transfert dit "concerté"/ simultané des deux charges. Les mécanismes séquentiels peuvent s'effectuer dans n'importe quel ordre : ET puis PT ou PT puis ET. Le mécanisme dont le transfert d'électron est suivi du transfert de proton est celui qui sera observé dans la suite de ce chapitre.

Le transfert de charge photo-induit peut être un précurseur de modifications structurales des molécules en biologie.[125] C'est pourquoi il est important d'en comprendre les rouages physiques à l'échelle moléculaire. C'est dans ce cadre qu'une approche pompe-sonde laser en phase gazeuse à été développée. L'objectif étant de comprendre le rôle joué par la dynamique conformationnelle sur ces transferts de charge.

I.2 PCET : un mécanisme lié au changement conformationnel

Dans une précédente étude, la dynamique de transfert de proton couplé au transfert d'électron à été mesurée par des expériences résolues en temps et en phase gazeuse sur un peptide "modèle" composé d'une histidine en N_{term} , de trois glycines au centre et d'un tryptophane en C_{term} . [126] Lors de cette étude, MacAleese *et al.* ont observé une différence de signature optique entre les peptides HG_3W et G_3W radicalaires. C'est la première "observation" du transfert de proton. Ils ont alors mesuré la cinétique de ce transfert. L'utilisation d'un complexe avec argent est la stratégie qui a été adoptée de manière à pouvoir déclencher le processus optiquement et de manière résolue dans le temps. Ils ont d'abord observé un transfert d'électron rapide (~ 3 ps) entre le peptide et l'argent cationique. Puis, ils ont observé ce qui semble être une limite conformationnelle à la cinétique de transfert de proton. C'est pourquoi nous avons sondé l'effet de la taille et la nature des constituants du peptide sur cette dynamique conformationnelle en utilisant la dynamique de transfert de proton comme observable.

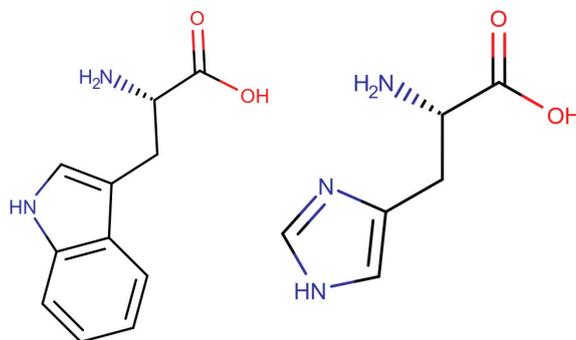


FIGURE I.2 – Schéma du tryptophane (gauche) et de l'histidine (droite).

L'acide aminé tryptophane (W ou Trp), représenté à gauche figure I.2, situé en C_{term} du peptide, a été choisi comme site "donneur" d'électron et de proton. Le tryptophane est un chromophore, il

est capable d'absorber des photons dans l'ultraviolet. Un ion argent (Ag^+) complexé au peptide est l'accepteur d'électron. Les ions métalliques sont très présents dans les processus de transfert de charge en biologie ainsi que dans les réactions de catalyse et d'oxydo-réduction.[127] Enfin, une histidine (H ou His), dont la structure est représentée à droite figure I.2 a été sélectionnée pour être l'accepteur de proton. En effet, l'histidine est un acide aminé basique, dont l'affinité protonique (à l'état neutre) est l'une des plus grandes parmi les acides aminés présents dans la nature. En revanche, les acides aminés placés entre l'histidine et le tryptophane ont été choisis de manière à ce que leur affinité protonique soit faible et donc qu'ils soient très peu susceptibles d'accepter un proton : des glycines (G ou Gly).

La dynamique de transfert de charges a été mesurée afin de mieux connaître ce mécanisme très présent dans les processus biologiques comme mentionné précédemment. L'étude de la dynamique de transfert de proton (PT) qui sera présentée dans ce chapitre est en fait la suite de mesures publiées en 2016 sur un peptide "modèle".[126] Ces mesures de dynamique ont pu être faites grâce à des mesures résolues en temps en phase gazeuse. Dans cette étude, le transfert d'électron est déclenché par une impulsion laser UV.

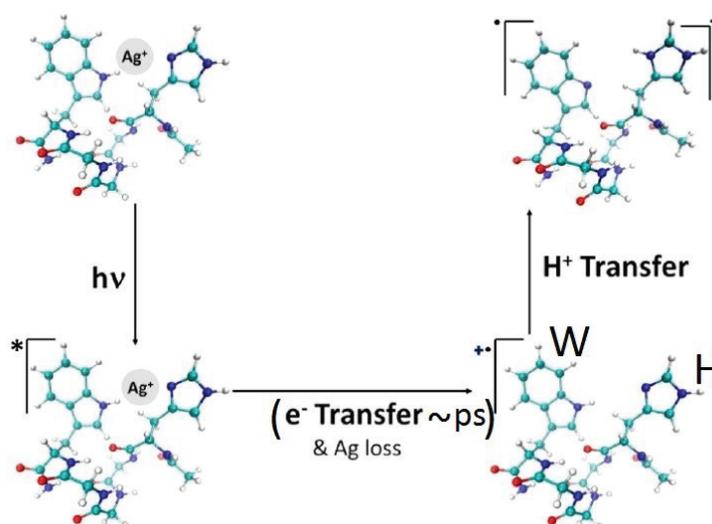


FIGURE I.3 – Schéma du mécanisme complet du transfert d'électron couplé au transfert de proton.

L'absorption des photons UV correspond à l'excitation de la transition π - π^* du tryptophane (mécanisme représenté à gauche sur la figure I.3. Le transfert d'électron qui succède à l'excitation a lieu entre le tryptophane (donneur d'électron) et l'ion Ag^+ (accepteur d'électron). Ce transfert est rapide (3.5 ps pour le peptide "modèle" précédemment étudié) et mène à la perte de l'argent neutre. Le peptide subsistant est alors radicalaire et positivement chargé, en bas à droite de la figure I.3. La charge et le radical sont donc positionnés sur l'indole du tryptophane. Cette charge est transférée jusqu'à l'histidine. Ces observations laissent supposer que l'affinité protonique du tryptophane

radicalaire en phase gazeuse est plus faible que celle de l'histidine neutre. Les propriétés optiques du tryptophane radicalaire neutre et chargé sont très différentes.[128] En effet, le maximum d'absorption du Trp radicalaire cationique est centré à 590 nm alors que le maximum d'absorption du Trp radicalaire neutre est à 473 nm. On peut ainsi observer ce transfert de proton grâce à la modification de la signature optique du tryptophane en fonction de la position de la charge sur le peptide.

La dynamique de transfert de proton s'est avérée limitée par la dynamique conformationnelle du peptide étudié. Dans cette thèse nous sommes partis de ces résultats initiaux et avons étendu l'étude à une série de peptides de taille et de nature variées de manière à explorer l'influence de la composition des peptides sur leur dynamique conformationnelle. Pour mesurer ce phénomène dynamique, on utilisera une expérience résolue en temps : pompe-sonde laser à deux couleurs.

I.2.a Expérience pompe-sonde

Le montage expérimental de cette expérience a été décrit dans le chapitre 1 "Montage expérimental et instrumentation". Les peptides étudiés sont mis en phase gazeuse et ionisés par ESI dans le spectromètre de masse. Les ions [peptide, Ag]⁺ sont sélectionnés en m/z dans le piège (HPC ou LPC). Le laser de pompe (UV) irradie les ions piégés et crée des peptides radicalaires chargés positivement issus de la perte d'Ag neutre à partir des complexes. Après un délai Δt , le laser de sonde à 545 nm interagit avec les peptides piégés. La sonde intervient à différents avancements de la réaction de transfert de proton.

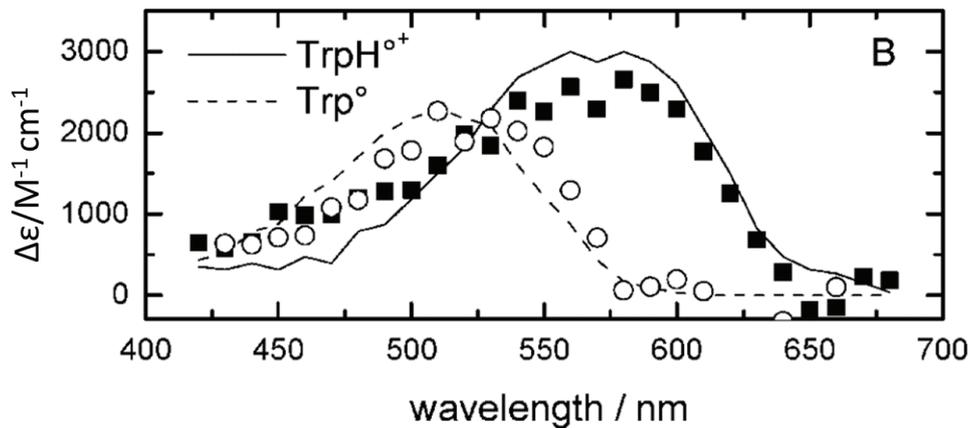


FIGURE I.4 – Spectre optique du tryptophane radicalaire cationique (trait plein) et neutre (pointillé), cette figure est adaptée à partir de [129]

Penta-peptide	Poly-glycine	Poly-alanine	Poly-proline	Cyclique	Contrôle
-	HGW	-	-	CHG ₂ WC	G ₂ W
HGAGW	HG ₃ W	HA ₃ W	HP ₃ W	CHG ₃ WC	G ₃ W
HGIGW	HG ₅ W	HA ₅ W	HP ₅ W	CHG ₄ WC	-
HGLGW	HG ₈ W	HA ₆ W	HP ₈ W	CHG ₃ WGC	-
-	WG ₈ H	WA ₆ H	WP ₅ H	CHP ₂ WC	-

TABLE 3.1 – Listes des peptides étudiés.

II Méthodologie

II.1 Mise en place

II.1.a Préparation d'échantillons

Tous les peptides utilisés, listés dans le tableau 3.1, ont été synthétisés par *Genecust*. Ils sont rassemblés en 6 groupes, les "penta-peptides" dont seul l'acide aminé central change, les "poly-glycines", "poly-alanines" et "poly-prolines" dont le nombre d'acides aminés est croissant, les "cycliques" dont les cystéines de part et d'autre forment des ponts disulfures, et les peptides "contrôle" sont des poly-glycines sans histidine. Ils ont été commandés avec une pureté $< 70\%$ et groupements terminaux protégés par amidation et acétylation. Le groupement amine en N_{term} des peptides est acétylé (ajout de CH_3CO) et le groupement carboxy en C_{term} est amidé ($CONH_2$ à la place de $COOH$). La série de peptides qui a été analysée est à l'origine sous forme de poudre (lyophilisé). La majorité des ces peptides a été mise en solution par dissolution de la poudre dans un petit volume d'eau pour atteindre une concentration en peptide de l'ordre de $500 \mu mol.L^{-1}$. Puis cette solution a été diluée dans un mélange équimoléculaire d'eau et de méthanol jusqu'à obtenir une concentration de $10 \mu mol.L^{-1}$. L'argent est ensuite ajouté par le biais d'une solution de nitrate d'argent ($AgNO_3$) à $2.5 \cdot 10^{-2} mol.L^{-1}$. La solution d' $AgNO_3$ est ajoutée de manière à obtenir une concentration en argent de $25 \mu mol.L^{-1}$ dans la solution finale (celle qui va être injectée dans la source ESI).

Pour les poly-alanines, peu solubles dans l'eau, un autre protocole de mise en solution a été mis en place. La poudre lyophilisée a d'abord été dissoute dans un mélange trifluoroéthanol (TFE) : acétonitrile (ACN) ($500\mu L:210\mu L$) auquel ont été ajoutés $42 \mu L$ de trifluoroacétate d'argent ($AgTFA$) à $45 mM$ dans l'ACN. Puis de l'eau a été ajoutée par pas de $100 \mu L$ jusqu'à ce que la solution soit limpide. Entre les ajouts d'eau, la solution a pu éventuellement être passée aux ultrasons si l'on observait des restes de poudre en suspension. Enfin, cette solution a été diluée dans un mélange (1:1) $H_2O:ACN$ pour obtenir une solution finale à $10 \mu M$.

La mise en solution des peptides à cystéines (colonne "Cyclique", tableau 3.1) s'est faite de la même façon que tous les autres peptides. La complexation avec l'argent se fait également de manière spontanée. Les peptides en solutions sont alors sous la forme oxydée, les deux cystéines de part et d'autre du peptide forment un pont disulfure. Afin de réduire ce pont, $100 \mu L$ de TCEP est ajouté

à la solution, puis, celle-ci est placée pendant 1 heure à l'étuve à 60°C. Les spectres de masses ont montré que les peptides étaient bien réduits, mais nous ne sommes pas parvenus à observer ces peptides complexés à Ag⁺.

II.1.b Fragmentation

La dynamique de transfert de charge en phase gazeuse est mesurée *via* l'observation de fragments photo-induits par la sonde.

Deux types de fragments majoritaires et communs à tous les systèmes étudiés sont pris en compte. Le premier est la rupture de la liaison C_α-C_β du tryptophane (figure II.6 A). Cette rupture mène à la perte de la chaîne latérale donnant les ions *m/z* 130 ou M-129 selon la position de la charge (avec M le rapport *m/z* de l'ion parent). Le second type de fragments est la perte complète du tryptophane et de sa partie C_{term} (mécanisme figure II.6 B). Les ions fragments formés sont *m/z* 186 ou M-185 selon la position de la charge. Ces fragments sont la signature de la fragmentation du radical.[130–132] Les fragments M-185 et M-129 sont les plus intenses pour les peptides comprenant une histidine (figure II.5 (A)).

Les peptides à cystéines (dont les ponts sont oxydés) présentent seulement le fragment M-129. La partie C_{term} du tryptophane étant attachée à la cystéine qui est elle même liée à l'autre coté de la chaîne *via* un pont disulfure ne mène donc pas à l'observation d'un fragment lors de la rupture de la liaison C_α-O-R⁺ (figure II.6 A).

Les fragments *m/z* 130 et *m/z* 186 sont exclusivement observés lorsqu'il y a absence d'histidine (figure II.5 (B)). Ces fragments montrent bien la présence rémanente du proton sur le tryptophane. Ceci met en évidence le fait que l'histidine conditionne la répartition des charges sur les fragments *via* la déprotonation de la chaîne latérale du tryptophane. Ces fragments sont de très faible intensité, nous avons choisi de ne prendre en compte que les deux fragments de plus grande intensité pour le traitement de données (à savoir M-185 et M-129).

Le rapport de fragmentation du peptide radicalaire à 545 nm a été utilisé pour évaluer ses propriétés optiques. FR_R^{Vis} est le rapport entre l'intensité des fragments du radical cation issus de l'absorption du faisceau à 545 nm, soit les ions de *m/z* 130 ou M-129 et *m/z* 186 ou M-185 et de la somme des intensités de ces ions fragments et de l'ion parent, le peptide radicalaire (équation 3.1).

$$FR_R^{Vis} = \frac{I_F^{Vis}}{I_F^{Vis} + I_R} \quad (3.1)$$

Cependant le faisceau UV, en formant le peptide radicalaire cationique, forme également des fragments. Lorsque la dissociation se produit avant le transfert d'électron, elle forme des fragments qui contiennent encore l'argent. Lorsqu'elle a lieu après le départ de l'argent, les fragments sont les mêmes que ceux formés par la sonde. On peut donc considérer que l'intensité des fragments

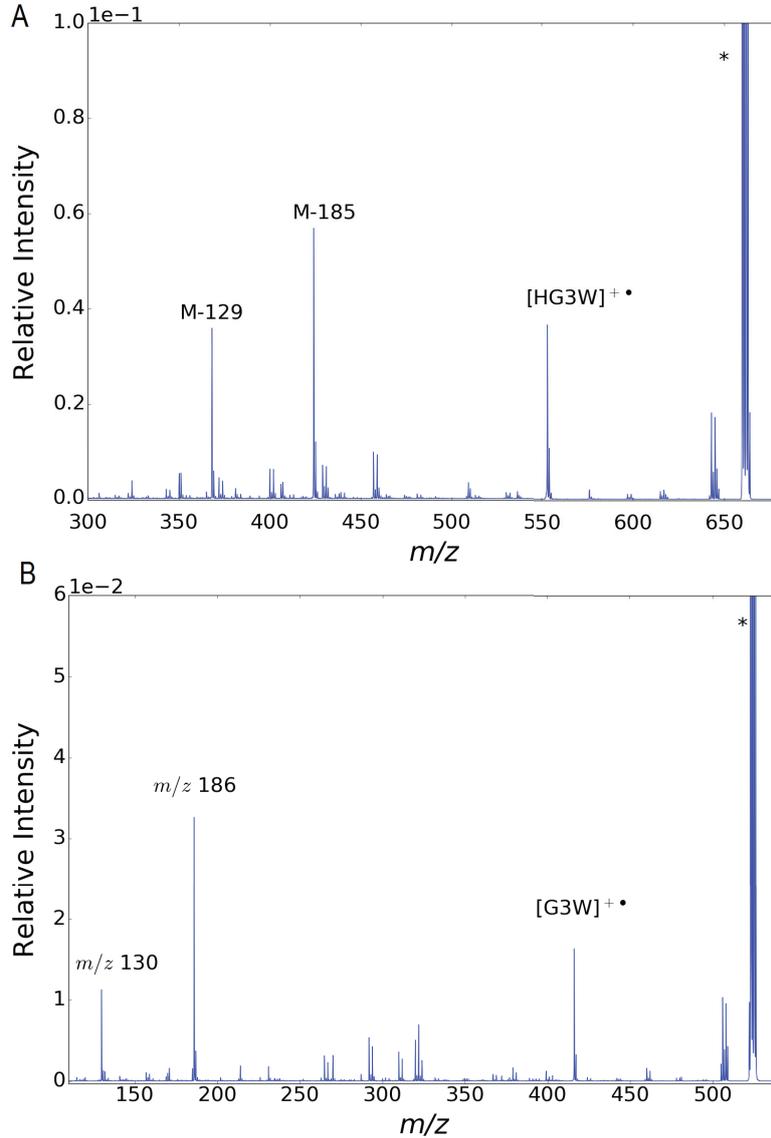


FIGURE II.5 – (A) Spectre de masse du peptide modèle HG₃W et (B) spectre de masse du peptide contrôle G₃W obtenu lors d’une expérience pompe-sonde. L’ion parent [HG₃W,Ag] $^{+}$ et [G₃W,Ag] $^{+}$ est indiqué par une (*), l’ion radicalaire [HG₃] $^{+\bullet}$, [G₃] $^{+\bullet}$ et les fragments sont indiqués sur le spectre.

mentionnés précédemment, I_F apparent sur le spectre de masse final est la somme des fragments issus de la pompe uniquement I_F^{UV} et ceux résultants de l’absorption de la sonde I_F^{Vis} (équation 3.2)

$$I_F = I_F^{UV} + I_F^{Vis} \quad (3.2)$$

Ainsi, l’intensité des fragments mesurée après absorption des faisceaux pompe et sonde I_F doit être corrigée par l’intensité des fragments issus de la pompe uniquement I_F^{UV} . En effet, c’est l’intensité des fragments formés par la sonde qui est la signature du transfert de proton. Les fragments

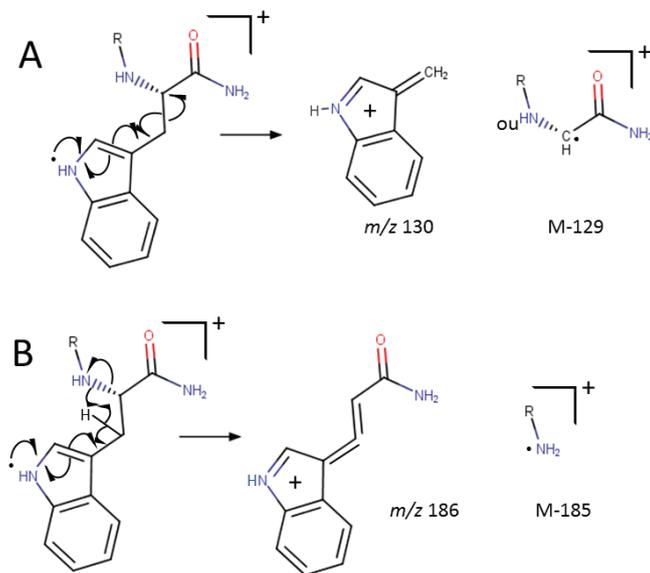


FIGURE II.6 – Schéma de fragmentation du tryptophane radicalaire. (A) mécanisme de formation des produits m/z 130 et M-129, mécanisme proposé par Joly *et al.* [131] (B) proposition de mécanisme de formation des fragments m/z 186 et M-185.

formés par la pompe et contenant l'argent sont remarquables par la forme de leur massif isotopique. On peut effectivement facilement repérer les deux isotopes de l'argent à M et M+2 d'abondance 51,8% et 48,1% respectivement (figure II.7).

Le rapport de branchement de ces fragments retourne au niveau observé avec la pompe seule quelques picosecondes après la pompe (*cf.* supplementary information [126]). On peut donc considérer, à l'échelle temporelle de notre expérience, qu'ils sont formés exclusivement par la pompe. De plus le rapport entre les fragments avec et sans argent (équation 3.3) après l'absorption de la pompe seule est constant, voir figure II.8.

$$\frac{I_F^{UV}}{I_F^{Ag}} = \alpha \quad (3.3)$$

Ce rapport est calculé, à chaque série d'expériences, à partir des spectres obtenus à délais négatifs (figure II.8) pour chacune des expériences menées : quel que soit le délai négatif, ce rapport est similaire, et on déduit α de la moyenne sur tous les contrôles négatifs. Ainsi, il est possible de corriger l'intensité totale des fragments sans argent (I_F) à partir des fragments induits par la pompe uniquement (I_F^{UV}). Alors l'intensité des fragments provenant de la sonde est estimée à partir des équations 3.2 et 3.3 et donne l'équation 3.4.

$$I_F^{Vis} = I_F - \alpha I_{FAg} \quad (3.4)$$

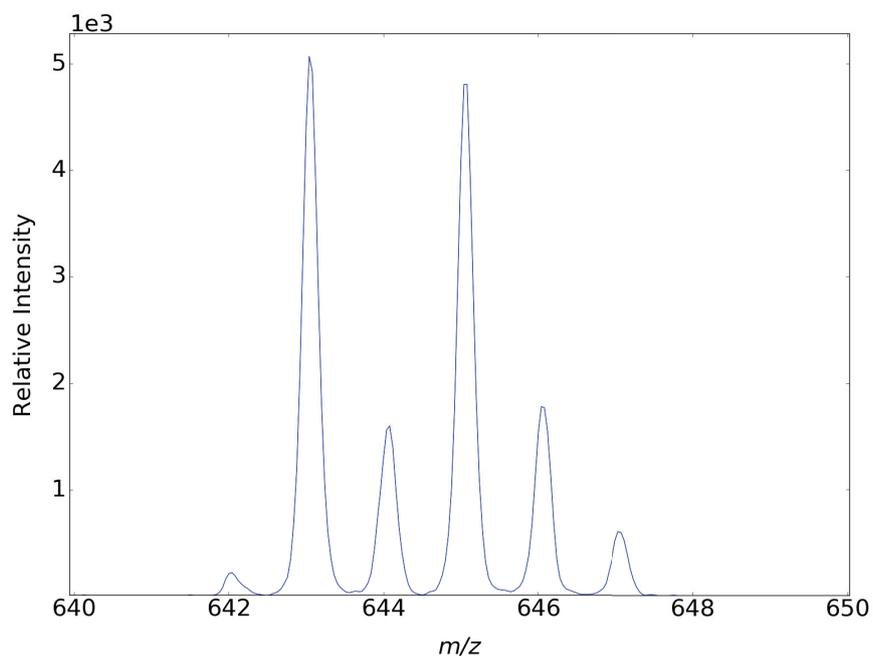


FIGURE II.7 – Massif isotopique d’un fragment contenant l’ion argent issu du complexe $[\text{HG}_3\text{W}, \text{Ag}]^+$.

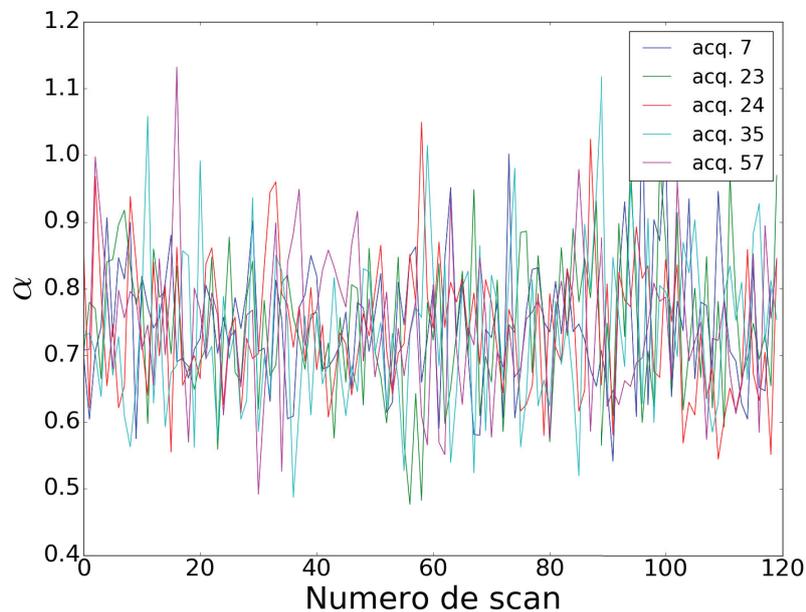


FIGURE II.8 – Valeur de α en fonction du temps de tous les délais négatifs de l’expérience pompe-sonde de HA_3W . acq. 7 correspond au délai $-3 \mu\text{s}$, acq. 23 est $-5 \mu\text{s}$, acq. 24 est $-4 \mu\text{s}$, acq. 35 est $-1 \mu\text{s}$ et acq. 57 est $-2 \mu\text{s}$. La valeur moyenne calculée de α est 0,74

On obtient donc l’intensité des fragments sans argent et induits uniquement par la sonde (I_F^{Vis}). Par conséquent, le rapport de fragmentation du peptide (équation 3.5) a pu être calculé en recom-

binant les équations 3.1 et 3.4.

$$FR_R^{Vis} = \frac{I_F - \alpha I_{FAg}}{I_R + I_F - \alpha I_{FAg}} = 1 - \frac{I_R}{I_R + I_F - \alpha I_{FAg}} \quad (3.5)$$

II.1.c Optimisation d'alignement laser

Une fois le montage optique et la synchronisation mis en place, nous devons nous assurer que les deux lasers sont bien recombinaés et qu'ils sont bien alignés au centre des pièges. Pour cela nous nous servons d'un chromophore connu qui casse aux longueurs d'ondes pompe et sonde : QSY7. Les deux faisceaux laser pompe et sonde ont été alignés indépendamment l'un de l'autre. Pour optimiser l'alignement du faisceau UV, nous nous sommes servis du peptide complexe $[HG_3W, Ag]^+$. Nous observons ainsi la quantité de peptides radicalaires cationiques (après perte d'argent neutre) produits par l'absorption de photons UV. Le spectre obtenu présente typiquement le peptide radicalaire comme fragment majoritaire à environ 10-15% du parent non dissocié (*cf.* figure II.9).

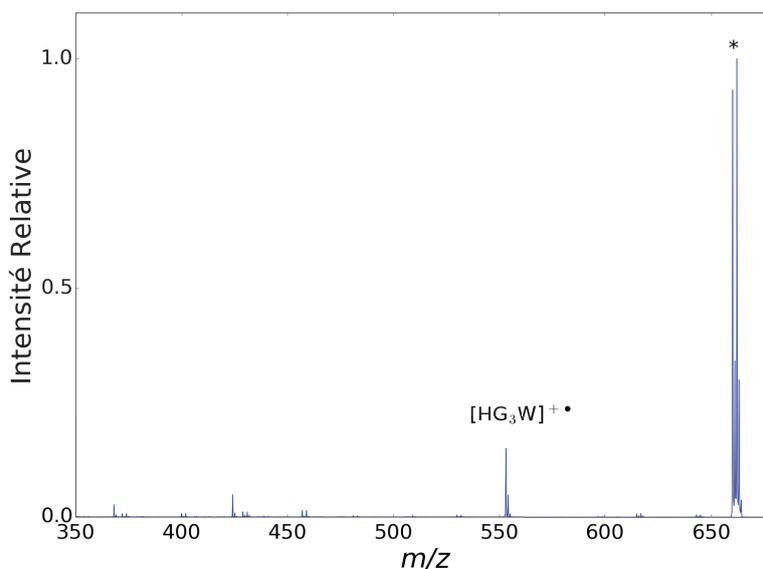


FIGURE II.9 – Spectre de photo-dissociation à 266 nm du complexe $[HG_3W, Ag]^+$ montrant la formation du radical peptide.

On optimise l'alignement du faisceau en maximisant l'intensité du pic à m/z 552 correspondant au peptide radicalaire chargé. Les autres pics apparents sur le spectre sont également issus de cette interaction mais n'ont pas été utilisés pour l'alignement car leur intensité est trop faible. Pour aligner le laser visible, à 545 nm, nous avons utilisés un chromophore, le QSY7 maleimide (déjà présenté dans le chapitre 2).

Son maximum d'absorption est situé autour de 540 nm. Le QSY7, lorsqu'il est irradié à cette longueur d'onde en phase gazeuse, forme des fragments photo-spécifiques (m/z 360, m/z 465, m/z 531,

cf.[85] et chapitre photo-dissociation) qui ont permis d'optimiser l'alignement du faisceau visible. L'alignement a donc pu être optimisé sur la quantité de fragments produits. La puissance du laser de pompe est réglée à 2 mJ/pulse et celle de la sonde est réglée à ~ 70 mJ/pulse.

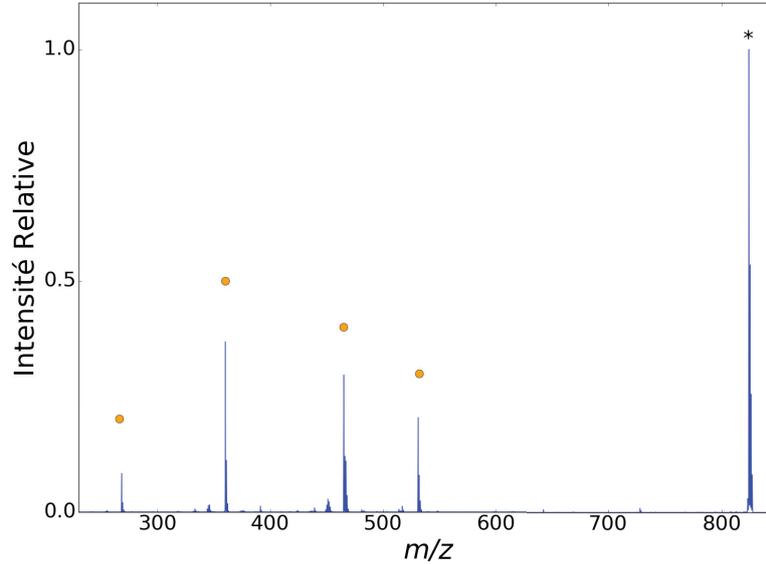


FIGURE II.10 – Spectre de masse de fragmentation du QSY7 à 545 nm. Les cercles pleins oranges marquent les différents fragments produits.

La figure II.10 est le spectre de masse obtenu lors de l'alignement du laser visible, à 545 nm, par optimisation de la fragmentation, en jouant sur les miroirs du faisceau visible, en amont du miroir dichroïque de recombinaison.

II.1.d Contrôle pompe-sonde "ON/OFF"

La superposition des deux faisceaux dans le piège est ensuite vérifiée en comparant l'efficacité de fragmentation du peptide radicalaire induit par la pompe seule et par la sonde après un délai court (500 ns). Pour cela le laser de sonde est réglé alternativement "OFF" puis "ON" puis "OFF", figure II.11. L'objectif est de vérifier que la sonde a un effet mesurable, autrement dit qu'elle produit une observable, et qu'il s'agit bien de fragmenter le radical peptide. Et pour cela on vérifie que la présence de la sonde induit bien une diminution de l'intensité du radical par rapport à la sonde seule. Cela nous permet donc de contrôler que le faisceau visible atteint un maximum d'ions radicalaires, au préalable, formés par l'UV.

La figure II.11, présente le rapport de fragmentation du peptide au cours d'une acquisition pendant laquelle le laser de pompe est successivement éteint puis allumé et de nouveau éteint, avec un délai de 100 ns. Le rapport de fragmentation est calculé de la même manière que pour l'analyse des données sur les deux fragments principaux (*cf.* équation 3.1).

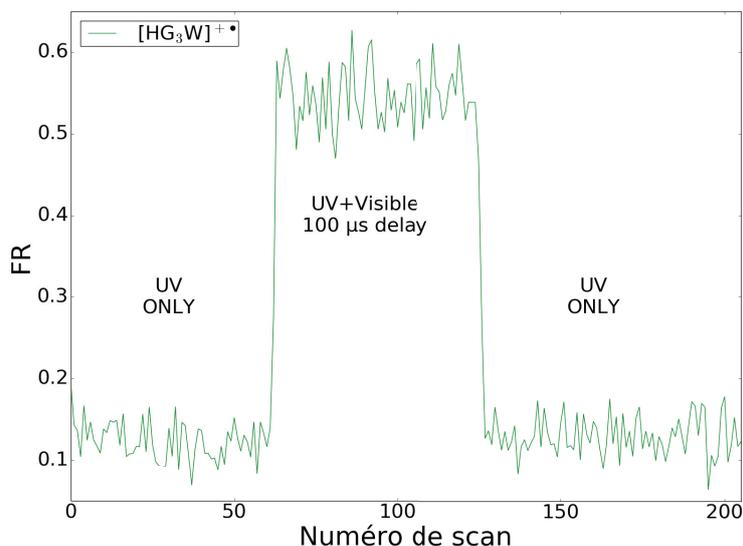


FIGURE II.11 – Rapport de fragmentation de $\text{HG}_3\text{W}^{\bullet+}$ en fonction du numéro d'acquisition.

Ce test est effectué sur une acquisition d'environ 200 spectres de masse enregistrés successivement. Le numéro du scan indiqué sur la figure correspond à un spectre de masse enregistré au cours du temps. On peut noter que même en l'absence de la sonde, le taux de fragmentation du radical est d'environ 13 %, ce qui n'est pas négligeable.

II.1.e Spectroscopie optique des peptides "modèle" et "contrôle"

Une fois le dispositif pompe-sonde mis en place et les lasers alignés nous avons testé les propriétés optiques des peptides "modèle" et "contrôle", HG_3W et G_3W respectivement. L'objectif de ces mesures est de nous assurer que nous sommes en mesure d'observer le phénomène dynamique de transfert de charge. La figure II.12 présente les spectres optiques de G_3W (rouge, panneau du haut) et de HG_3W (jaune, panneau du bas) avec un délai pompe-sonde de 30 ns (losanges) et de 10 ms (cercles).

Les spectres optiques de HG_3W et G_3W à un délai de 30 ns ont un maximum autour de 550 nm. Ils correspondent à la signature optique du tryptophane radicalaire cationique.[128] En revanche, le spectre optique de HG_3W après un délai de 10 ms est différent, le maximum est déplacé autour de 480 nm. Il correspond à la signature optique du tryptophane radicalaire neutre, et le spectre de G_3W n'a pas changé avec le délai. L'absence de changement de signature optique de G_3W contrairement à HG_3W nous indique que nous mesurons un changement de signature optique dépendant du temps (pour HG_3W). L'absence d'histidine révèle que le tryptophane reste cationique au cours du temps, il ne semble pas y avoir de transfert de proton. On a ici la preuve que le transfert de charge est bien un phénomène dynamique.

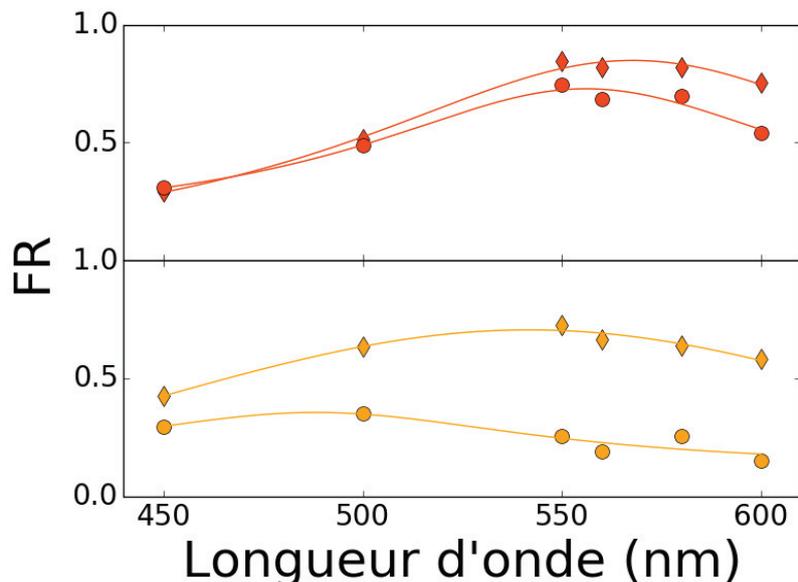


FIGURE II.12 – Spectre optique du peptide "contrôle" G₃W (fenêtre du haut) en rouge et de peptide "modèle" HG₃W (fenêtre du bas) en jaune pour un délai pompe-sonde de 30 ns (losanges) et 10 ms (cercles).

II.2 Mise en œuvre

II.2.a Liste des délais

La liste des retards à appliquer par le générateur de délais a été élaborée de manière à ce qu'ils s'étendent de -5 ns (la sonde arrive avant la pompe) à 10 ms. Les retards négatifs vont de -5 ns à -1 ns compris, par pas de 1 ns ce qui fait 5 retards. Puis, nous avons initialement prévu 195 délais allant de 50 ns à 10 ms répartis linéairement sur une échelle logarithmique. Les impulsions des deux lasers ont une largeur à mi-hauteur de 5 ns et un jitter de 1 ns. Le délai minimum de 50 ns nous assure qu'il n'y a pas de recouvrement temporel des deux impulsions pompe et sonde possible. La dynamique de transfert de proton a été évaluée à plusieurs centaines de μ s, 10 ms semblent donc suffisante pour mesurer cette dynamique. Ces 200 retards ont été ensuite placés dans une liste de manière aléatoire. Pour chaque délai, des spectres de masse sont enregistrés pendant 2 minutes, ce qui correspond à environ 300 spectres. Ainsi, pour une expérience avec 200 acquisitions comptant 2 min par acquisition, l'expérience durait 6h40 environ. La figure II.13 présente les résultats d'une expérience pompe-sonde réalisée sur le peptide HG₃W où 200 spectres de fragmentation sont mesurés avec un délai constant de 3 ms. On peut ainsi analyser l'évolution du rapport de fragmentation au cours d'une expérience longue (200 points < 6h). La seringue utilisée ayant un volume de 1 mL, en imposant un débit de 6 μ L/min, il fallait alors remplir la seringue jusqu'à trois fois au cours de l'expérience (barres verticales figure II.13). Nous nous sommes aperçus que le remplacement de solution modifiait beaucoup la stabilité du signal. En effet on peut voir sur la figure II.13 que le rapport de fragmentation du peptide n'est pas constant au cours de l'expérience. Ces observations

se sont avérés problématiques car le calcul du rapport de fragmentation en était affecté. Il nous était difficile de fitter le rapport de fragmentation en fonction du délai et d'en extraire un temps caractéristique.

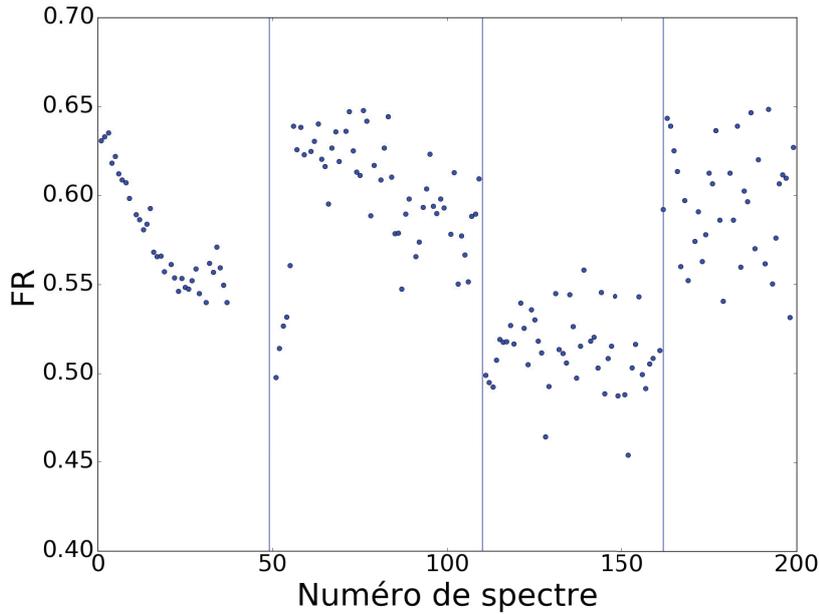


FIGURE II.13 – Rapport de fragmentation de HG_3W à un délai de 3 ms mesuré sur 200 acquisitions

Nous avons alors choisi de réduire la durée de l'expérience afin que toutes les acquisitions soient achevées avant que la seringue ne soit vide. Nous avons fait le choix de faire 65 acquisitions dont 5 délais négatifs et 60 délais entre 50 ns et 5 ms étalés sur une échelle logarithmique et toujours placés de manière aléatoire (5 ms s'est avéré suffisamment long par rapport aux dynamiques mesurées). L'expérience est entièrement automatisée (*cf.* chapitre 1).

Le retard mesuré par la photodiode au niveau de l'entrée du spectromètre de masse entre les deux impulsions déclenchées au même instant est dû à la différence de chemin optique des deux faisceaux (*cf.* chapitre 1). Cet offset de retard est indiqué sur le générateur de délai de manière à ce que le retard généré par le générateur de délai corresponde exactement au délai entre les deux impulsions dans le spectromètre de masse (sans se soucier de la différence de chemin optique).

II.2.b Déroulement de l'expérience

À l'issue de la mise en place (partie II.1.c) des dispositifs laser et des contrôles (partie II.1.d), une expérience pompe-sonde complète se déroulera comme suit :

Après sélection et piégeage du complexe, illustré par le spectre de masse présenté en haut à gauche sur la figure II.14, les deux impulsions pompe et sonde sont déclenchées, séparées temporel-

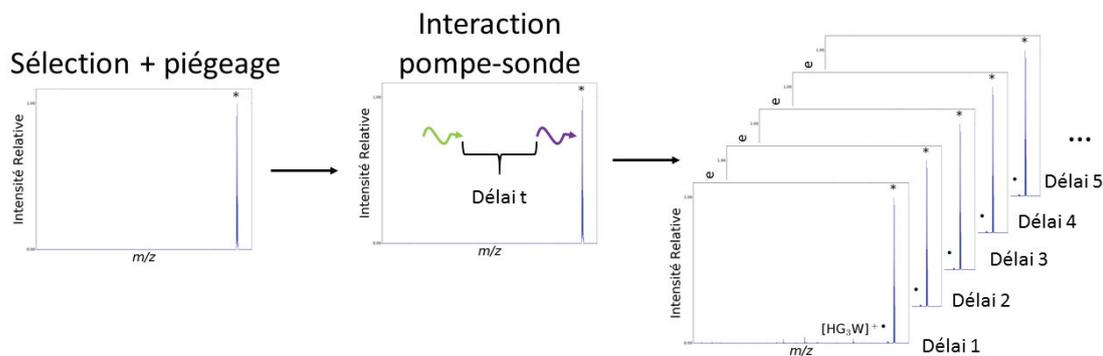


FIGURE II.14 – Schéma de l’opération des différents événements menant à la réalisation d’une expérience pompe-sonde.

lement par le premier délai de la liste. Un scan est mesuré à chaque fois qu’un couple d’impulsions toujours séparées du même délai interagit avec les ions piégés (*cf.* chapitre 1, partie LTQ-Laser). Après 2 minutes d’acquisition, on obtient ~ 400 spectres par délai. Les spectres moyennés pour chaque délai sont représentés à droite sur la figure II.14. A l’issue de ces mesures on pourra calculer le rapport de fragmentation à partir de chaque spectre et en tracer la moyenne en fonction du délai pompe-sonde.

II.2.c HPC vs LPC et instabilité du signal (chromatogramme)

Nous avons fait ces mesures en procédant au piégeage et à l’interaction avec les lasers dans les pièges HPC et LPC. N’ayant observé aucune différence majeure sur la dynamique de transfert de proton selon le type de piège, les données en HPC ou LPC ont été assemblées lors du traitement de données.

Nous avons observé une instabilité du signal, due à l’appareil et à la solution utilisée. En effet, le nitrate d’argent forme de l’argent métallique au contact de la lumière. La seringue a donc été protégée de la lumière pour limiter la formation d’argent métallique. Malgré cela, le capillaire se situant avant la source ESI était régulièrement bouché vraisemblablement par des agrégations d’argent pendant l’expérience. En conséquence de quoi, l’intensité du signal diminuait sensiblement au cours d’un scan (0,55 min, 0,94 min et 1,2 min, figure II.15). Pour parer à ces baisses de signal lors de l’analyse des résultats et surtout du calcul de FR_R^{Vis} , les scans dont le chromatogramme total des ions (TIC) est très faible ont été retirés du calcul. Autrement dit, les scans dont le TIC est

inférieur à la valeur seuil choisie (exemple, ligne rouge figure II.15) seront exclues du traitement de données et ce pour chaque spectre de chaque jeu de donnée acquis. Cela permet de supprimer les points aberrants, qui ne feront que fausser les traitements de données.

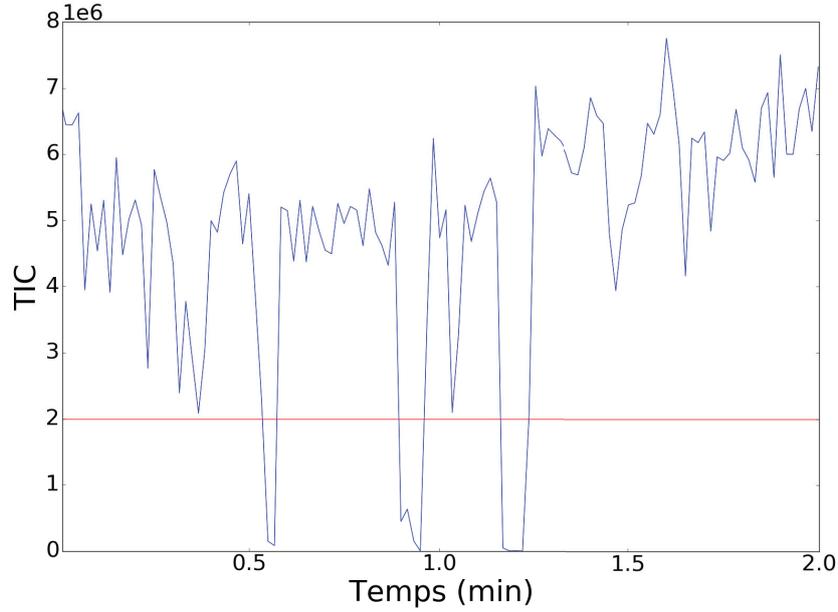


FIGURE II.15 – Évolution du TIC au cours de l'acquisition d'un spectre du HG₅W.

Les acquisitions qui comptent 200 pts ont également subit un traitement particulier. Nous avons veillé à ce que les données soient rassemblées par "familles" de points dont le FR est relativement stable. On peut voir, par exemple, sur la figure II.13, 4 familles de points. Ainsi pour un jeu de donnée on a éventuellement dû tracer 2 voir 3 déclinés et extraire un temps caractéristique pour chacun. Certaines "familles" peuvent également être exclues du traitement de données si le signal apparaît trop instable (par exemple, spectre 0 à 50 figure II.13).

III Mesure de dynamique de transfert de proton par pompe-sonde laser

III.1 Contrôle

L'expérience pompe-sonde a été réalisée dans les même conditions que les peptides modèles, sur une série de peptides contrôle sans histidine. La mesure nous permet de nous convaincre que la variation dynamique de signal observé sur les peptides modèle n'est pas le fruit fortuit d'un processus de relaxation non pris en compte du type thermalisation des ions. Le PT a donc été mesuré sur les deux peptides contrôle [GGW] et [GGGW]. Le peptide GGGW est montré figure III.16.

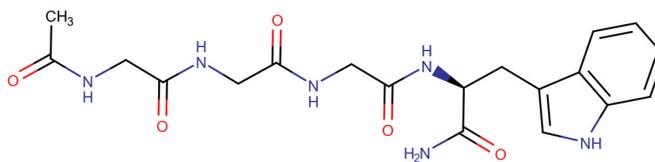


FIGURE III.16 – Schéma du peptide "contrôle" G₃W

Les fragments observés pour tracer l'évolution de FR_R^{Vis} en fonction du délai pompe-sonde sont m/z 130 et m/z 186. On obtient alors le FR_R^{Vis} en fonction du délai, figure III.17. On n'observe pas de déclin sur cette figure, FR_R^{Vis} ne varie pas au cours du temps. Il semble ne se produire aucun changement de signature optique, aucun phénomène dynamique ne semble être observable sur ces systèmes.

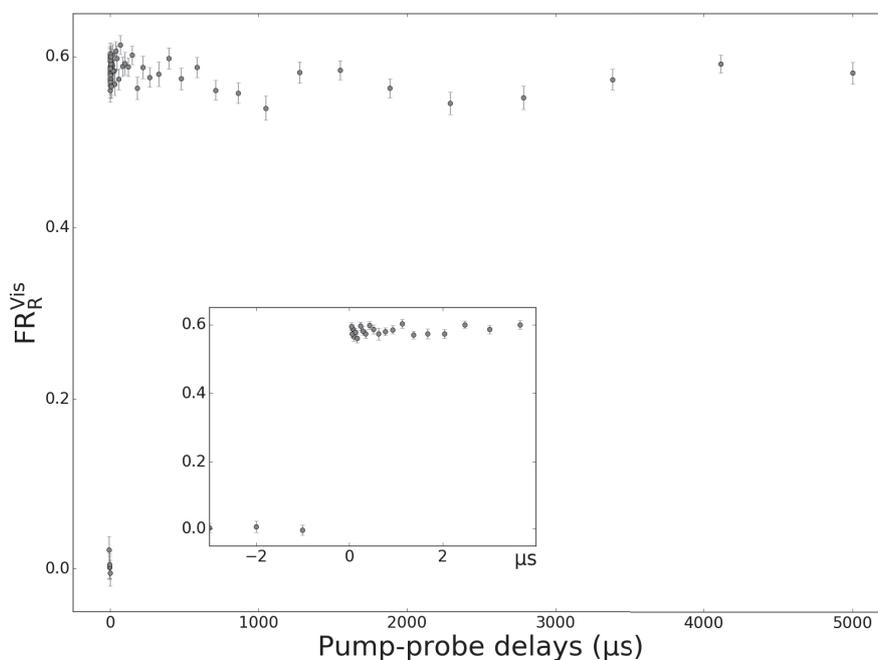


FIGURE III.17 – Représentation de FR_R^{Vis} en fonction du délai pompe-sonde du peptide G₃W

III.2 Dynamique conformationnelle

Le peptide "modèle" précédemment étudié est composé de trois glycines, une histidine et un tryptophane. Les glycines sont des acides aminés très simples puisqu'elles ne contiennent sur leur chaîne latérale qu'un hydrogène. C'est le plus petit acide aminé existant dans la nature. La dynamique de transfert de proton étant limitée, selon l'hypothèse énoncée par MacAleese *et al.*, par la dynamique conformationnelle du peptide, nous avons cherché à observer des tendances en sélectionnant une série de peptides de taille et de composition variable, incluant notamment des acides aminés jouant un rôle important en terme de structuration secondaire des protéines, comme par exemple l'alanine

ou la proline.[126] Plusieurs "familles" de peptides ont été adoptées et mises sous la forme du modèle adéquat pour l'expérience pompe-sonde : histidine au début et tryptophane à la fin de la chaîne. Comme mentionné précédemment, les acides aminés choisis dans la séquence peptidique ne doivent être ni donneurs, ni accepteurs de proton et électron. De plus, la chaîne latérale de ces acides aminés ne doit pas être en mesure d'absorber les photons de la pompe (266 nm) ou bien de la sonde (545 nm) afin que les photons soient uniquement absorbés par le tryptophane. Dans le cas contraire, on ne pourrait pas déclencher le transfert de proton, ni le sonder.

Pour l'étude du transfert de proton lié à la structure du peptide nous avons tout d'abord souhaité sonder l'influence de la chaîne latérale des acides aminés constitutifs du peptide en changeant l'acide aminé central en acides aminés plus volumineux tels que l'alanine, la leucine et l'isoleucine (colonne 1 du tableau 3.1). La question était en fait de savoir si l'encombrement stérique avait une influence sur le temps de transfert mesuré.

Puis, une série de 4 peptides de tailles différentes composés uniquement de glycines a été choisi. Le nombre de glycine varie entre une et huit, colonne 2 du tableau 3.1. Le but étant de comprendre l'influence de la taille (longueur) du peptide sur le PT et donc sur sa dynamique conformationnelle.

Ensuite, des séries de poly-alanines et poly-prolines ont été ajoutées aux molécules à analyser (respectivement les troisièmes et quatrièmes colonnes sur le tableau 3.1), car les propriétés de ces acides aminés sur la structure de peptides sont largement étudiées dans le domaine de la biologie structurale. Le nombre de ces acides aminés composant la chaîne peptidique va de trois à six et huit, respectivement. Les prolines quant à elles sont plutôt jugées comme étant des acides aminés qui rigidifient la chaîne peptidique tout en défavorisant la structuration en hélice - α .

Nous avons par la suite tenté d'étudier des peptides cycliques, voir l'avant dernière colonne du tableau 3.1. Une cystéine a été placée de part et d'autre du peptide de manière à ce que des ponts disulfures se forment en solution entre ces deux dernières. L'objectif était de mesurer le PT de ces peptides puis de réduire les ponts disulfures et de mesurer de nouveau le PT. Ainsi, nous aurions pu comparer la différence de temps pour deux structures différentes d'un même peptide. Malheureusement avec du TCEP pour réduire les ponts disulfure, il n'a pas été possible d'observer de complexes [peptide, Ag].

Enfin, la dernière famille sont des peptides dont le tryptophane et l'histidine ont été échangés sur la chaîne, ce qui donne l'histidine en C_{term} et le tryptophane en N_{term} . Les peptides qui ont été étudiés sont trois peptides contenant huit glycines, six alanines et cinq prolines (dernière ligne des colonnes 2, 3, 4 du tableau 3.1). L'objectif étant de mesurer si la position de His et Trp ont une influence sur la dynamique conformationnelle du peptide.

III.2.a Évolution de la fragmentation en fonction du délai pompe-sonde

En traçant le rapport FR_R^{Vis} en fonction du délai pompe-sonde on obtient typiquement la figure III.18 (mesuré dans le cas du peptide HA₃W).

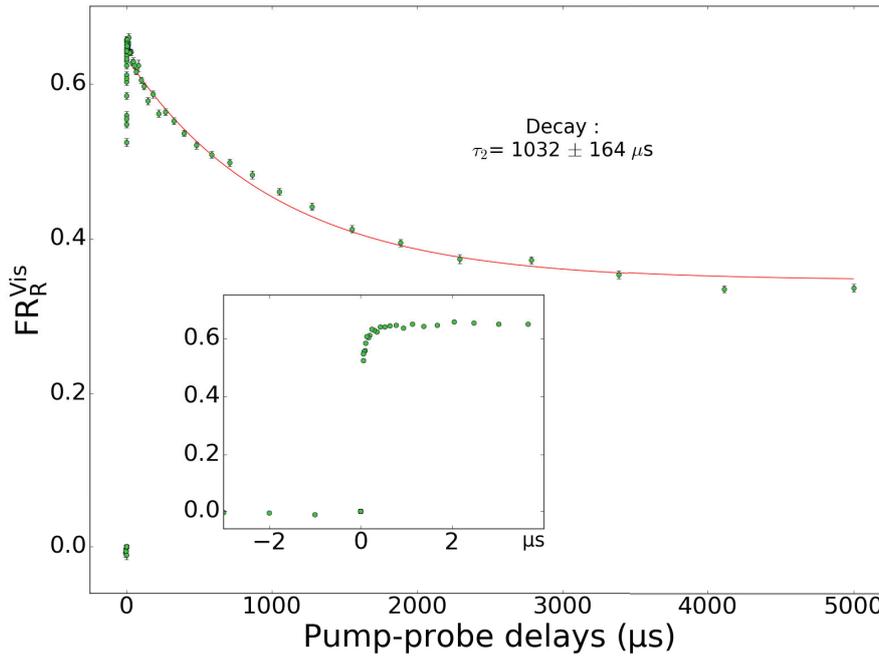


FIGURE III.18 – Rapport de fragmentation en fonction du délai pompe-sonde de HA₃W

Sur cette figure on observe une augmentation de FR_R^{Vis} puis une diminution suivant un déclin. Le rapport de fragmentation atteint un plateau aux temps longs ($> 4000 \mu s$). L'encart en bas à gauche de la figure montre l'évolution de FR_R^{Vis} en fonction du délai pour des temps allant de $-2 \mu s$ à $2,5 \mu s$. On voit qu'aux délais négatifs le rapport est nul et constant. Au delà de $0 \mu s$, ce rapport augmente jusqu'à atteindre un maximum.

Aux délais supérieurs au temps caractéristique du transfert de proton ($> 3 \text{ ms}$ dans ce cas particulier), la fragmentation du peptide n'atteint pas 0. C'est à dire que même lorsque le proton a été transféré sur l'histidine, on observe toujours des fragments. La raison est que le peptide dystonique, même s'il absorbe très peu à 545 nm forme suffisamment de fragments pour qu'ils soient mesurables. La rémanence de ces fragments est en fait la signature optique du tryptophane radicalaire neutre.

III.3 Interprétation des résultats

III.3.a Choix de la fonction modèle

Pour chaque délai, la moyenne $FR_R^{Vis}(t)$ et la déviation standard de la moyenne associée sont calculées à partir de l'ensemble des spectres de masse mesurés. Nous avons considéré une réaction à 3 étapes pour décrire les évènements qui mènent au transfert de proton.



Dans l'équation de la réaction 3.6, \mathbb{C} est le complexe [peptide, Ag]⁺, $R^{\bullet+}$ est l'espèce dont le radical et la charge sont situées sur le Trp et $+R^{\bullet}$ est l'espèce dont le tryptophane est radicalaire et neutre. k_1 est la constante de temps de la réaction de transfert d'électron et k_2 celle de la réaction de transfert de proton. k_1 est très petit devant k_2 car la vitesse de transfert d'électron a été mesurée et est 10⁶ fois plus rapide que le transfert de proton. A partir de cette hypothèse de réaction, nous avons construit la fonction modèle associée. Cette fonction décrit une décroissance mono-exponentielle. L'ensemble des rapports de fragmentation calculés pour chaque délai est fitté à partir d'un délai de 30 μ s. Ce délai a été choisi de manière à s'extraire complètement de la dynamique aux temps courts qui semble intervenir entre 0 et 10 μ s.

$$FR_R(t > 30\mu s) = \alpha - \beta(1 - e^{-\frac{t}{\tau_2}}) \quad (3.7)$$

α , β et τ_2 sont des paramètres ajustables correspondant respectivement à l'ordonnée à l'origine, qui correspond à la dissociation du tryptophane radicalaire cationique, le facteur d'amplitude, qui traduit la différence d'absorption entre le radical cation et le neutre, ($\beta < \alpha$), et la constante de temps représentative du temps caractéristique de transfert de proton. Les constantes de temps obtenues pour chaque jeu de données comprennent la moyenne et la déviation standard associée résultant de l'optimisation de 10⁴ constantes de temps calculées en utilisant une approche bootstrap. On peut voir sur la figure III.18 la fonction issue du fit tracée en rouge, ajustée aux données de HA₃W.

De plus, les déclin ont été mesurés plusieurs fois par peptide sur différents jours. La moyenne sera donc calculée avec l'équation eq-weight-mean.

$$\bar{\tau} = \frac{\sum \frac{x_i}{\sigma_i^2}}{\sum \frac{1}{\sigma_i^2}} \quad (3.8)$$

La déviation standard de cette moyenne est l'équation eq-weight-stdev.

$$\sigma_{\tau} = \frac{1}{\sqrt{\sum (1/\sigma_i)^2}} \quad (3.9)$$

Les barres d'erreur appliquées sur chaque FR_R^{Vis} en fonction du délai prennent en compte une erreur de 2σ , soit une fenêtre d'incertitude de 95.4%.

III.4 Temps courts

En dessous de 30 μs , sur les déclinés de la plupart des peptides étudiés, on observe de façon inattendue un effet dynamique, le plus souvent une croissance de FR_R^{Vis} . D'autant plus que cette croissance n'est pas observée sur le peptide "modèle" précédemment étudié. Le temps caractéristique est de l'ordre de la μs . Il est bien plus grand que le jitter des laser (< 1 ns) et que la largeur de convolution des deux lasers (< 15 ns). Le radical étant formé au bout de 3,5 ps maximum, on peut en déduire que l'on observe ici un processus dynamique intermédiaire ayant une influence sur le FR_R^{Vis} . Ce processus pourrait soit affecter les propriétés optiques du système, soit quencher la fragmentation.

L'histidine et le tryptophane ont tous deux une très forte affinité de liaison avec Ag^+ . Leur énergie de liaison respectives sont 18 kcal.mol⁻¹ et 14.5 kcal.mol⁻¹ (valeurs tabulées).[133] On peut penser, à partir de ces données, que l'argent se lie préférentiellement à l'histidine. Or, une étude par mobilité ionique, de Bellina *et. al*, a montré que l'argent pouvait être lié au tryptophane et à l'histidine simultanément.[134] Pour tenter d'expliquer cette croissance aux temps courts, une hypothèse vraisemblable est qu'après le transfert de l'électron sur l'argent, celui-ci reste lié au tryptophane. On obtient alors un complexe provisoire, métastable car l'énergie de liaison de l'histidine et du tryptophane à l'argent neutre (Ag^0) est bien inférieur à celle de Ag^+ . [135] Donc l'argent peut avoir un temps de vie de liaison avec le tryptophane en phase gazeuse. La détection en masse ayant lieu environ 130 ms après le transfert d'électron, on ne pourra donc pas détecter ce complexe.

Plusieurs mécanismes peuvent alors expliquer l'évolution de FR_R^{Vis} (croissance) envers la fragmentation du peptide radicalaire : libération d'énergie cinétique *via* la perte de l'argent neutre, retour de l'électron de l'argent vers le peptide radicalaire, *etc.*

III.5 Temps longs

Pour la plupart des peptides, après quelques microsecondes (évolution aux temps courts) FR_R^{Vis} suit un déclin lent de l'ordre de la milliseconde. Ce déclin, associé a un changement de signature optique, est attribué au transfert de proton du tryptophane vers l'histidine. Cette affirmation est confirmée par l'absence de déclin pour les peptides "contrôle" étudiés, en absence d'histidine, voir figure III.17.

Le tableau 3.2 rassemble l'ensemble des constantes de temps déterminées par le fit des déclinés à partir de 30 μs . Ces valeurs ont été rassemblées et analysées par catégories de peptides afin de mieux observer les tendances.

Famille	Système	Valeurs moyennes		Réplicats individuels		
		τ_2 (μs)	σ (μs)	τ_2 (μs)	σ (μs)	
H Contrôls	G ₂ W	> 5000	-	-	-	
				-	-	
	G ₃ W	> 5000	-	-	-	
				-	-	
Penta-peptides	HGAGW	704	27	1041	215	
				699	27	
	HGIGW	634	24	634	24	
				HGLGW	615	25
Poly-glycines	HG ₁ W	356	295	356	295	
				563	38	
	HG ₃ W	487	21	482	74	
				448	35	
				478	56	
				411	64	
				513	26	
	HG ₅ W	591	17	674	40	
				628	46	
				723	59	
				521	56	
				673	53	
				1139	348	
	HG ₈ W	763	53	775	71	
				726	83	
				1336	539	
				1199	707	
	WG ₈ H	942	147	853	228	
				990	200	
				662	106	
	Poly-alanines	HA ₃ W	825	52	700	88
					1032	82
					1184	339
		HA ₅ W	1438	58	1744	190
1604					94	
1262					84	
-					-	
HA ₆ W		> 5000	-	-	-	
				-	-	
				-	-	

Suite sur la page suivante

<i>Suite de la page précédente</i>					
Famille	Système	Valeurs moyennes		Réplicats individuels	
		τ_2 (μs)	σ (μs)	τ_2 (μs)	σ (μs)
				-	-
Poly-prolines	HP ₃ W	657	31	449	52
				570	100
				770	43
				1266	159
	HP ₅ W	690	212	646	589
				588	236
				1921	896
				2371	2001
	WP ₅ H	1383	133	1374	158
				1575	411
1313				303	

TABLE 3.2 – Listes des temps caractéristiques moyens et individuels de tous les "contrôles", penta-peptides et poly-glycines étudiés. τ_2 est le temps caractéristique de transfert de proton issu du fit mono-exponentiel, σ est la déviation standard issue également du fit (calculée plus haut). Les valeurs moyennes et individuelle de chaque jeu de données sont rassemblées.

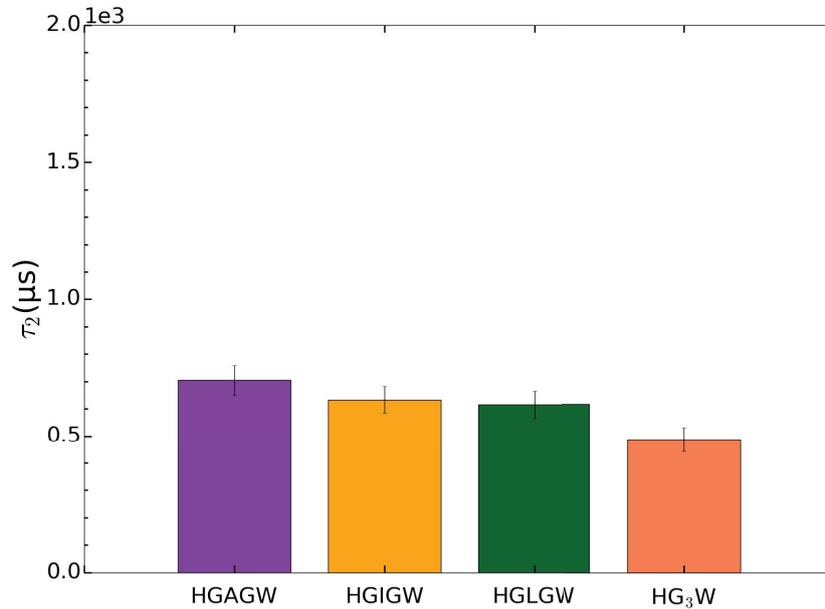


FIGURE III.19 – Diagramme en barre des temps caractéristiques calculés pour les penta-peptides. Les barres d'erreur sont les valeurs de sigma moyennes notées dans le tableau.

La figure III.19 présente les temps caractéristiques des déclins sur une série de quatre peptides dans le but de comprendre et évaluer l'effet de l'encombrement stérique des chaînes latérales des

acides aminés sur leur dynamique conformationnelle. Seul l'acide aminé central diffère selon le peptide. On remarque que cet acide aminé influence très peu la dynamique de transfert de proton.

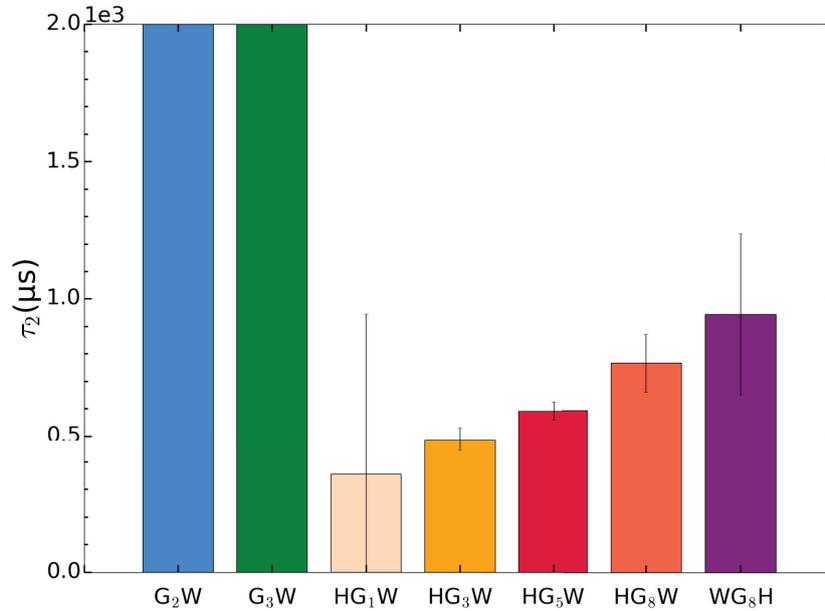


FIGURE III.20 – Diagramme en barre des temps caractéristiques calculés pour les poly-glycines. Les barres d'erreur sont les valeurs de sigma moyennes notées dans le tableau.

Les temps caractéristiques de la série de poly-glycines sont rassemblés figure III.20. On note que τ_2 augmente avec le nombre de glycines. Les barres associées aux peptides contrôles montrent qu'on n'observe pas de déclin pour ces peptides, le temps caractéristique est "infini". Ainsi, il semble que plus le peptide est grand, moins le transfert de proton est favorable. On peut interpréter cette tendance d'un point de vue purement statistique : lorsque le nombre de résidus augmente, la probabilité que l'histidine et le tryptophane se trouvent suffisamment proches l'un de l'autre et dans une orientation favorable au transfert de proton diminue. L'augmentation de la taille des poly-glycines semble surtout imposer des effets entropiques: la dimension du paysage conformationnel augmente avec la taille, ce qui réduit sensiblement la cinétique de transfert de proton. Ceci est particulièrement vrai pour les poly-glycines, puisque ces dernières sont flexibles : aucune conformation spécifique n'est énergétiquement favorisée. Ainsi, le sens de la séquence HG₈W *vs* WG₈H ne semble pas jouer de rôle notable sur le transfert de proton, au vu de la largeur de la fenêtre d'incertitude. La même tendance, liée à la taille du peptide, est également observée sur les poly-prolines de petite taille (figure III.21, même tendance que les poly-glycines). De même pour les poly-alanines, jusqu'à 5 alanines (figure III.22).

En revanche, les temps caractéristiques associés aux alanines et prolines sont bien plus grands, comparés aux poly-glycines de même taille (même nombre de résidus). Ceci peut être dû au fait

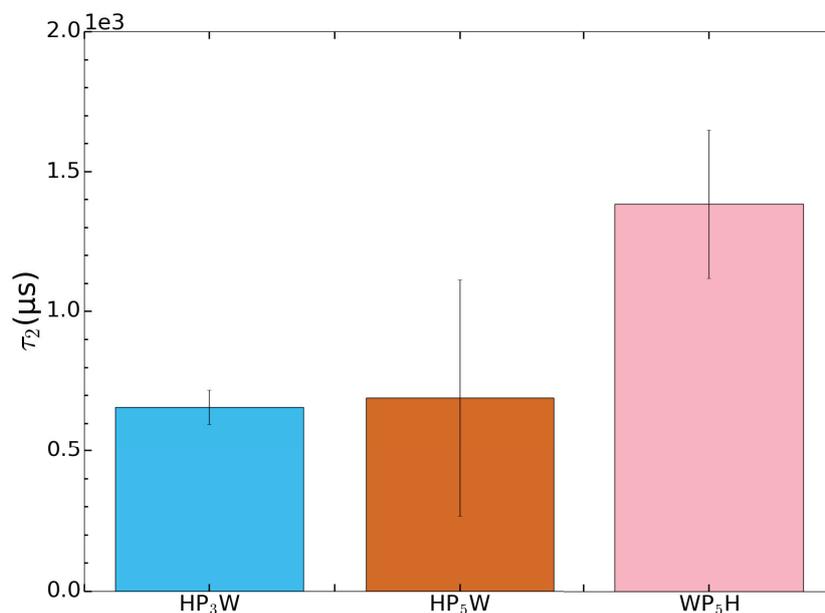


FIGURE III.21 – Diagramme en barre des temps caractéristiques calculés pour les poly-prolines. Les barres d’erreur sont les valeurs de sigma moyennes notées dans le tableau.

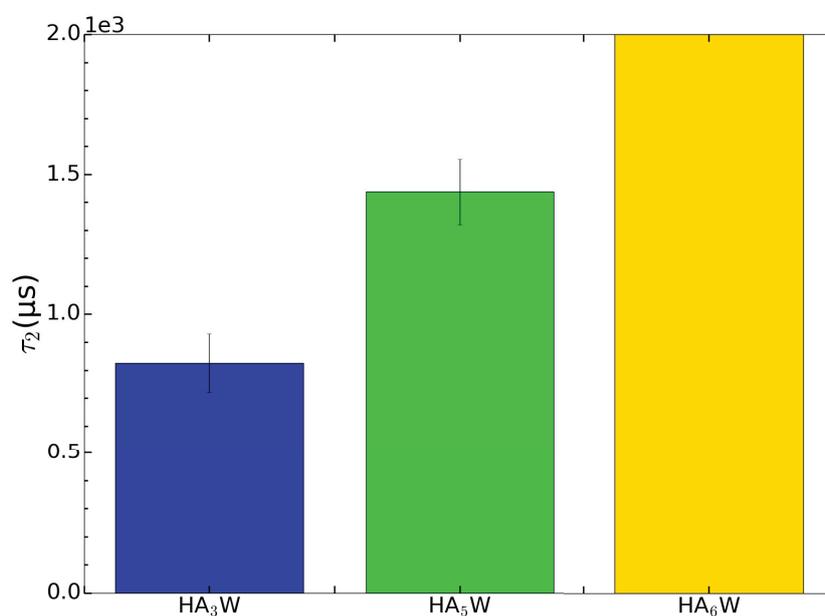


FIGURE III.22 – Diagramme en barre des temps caractéristiques calculés pour les poly-alanines. Les barres d’erreur sont les valeurs de sigma moyennes notées dans le tableau.

que les poly-alanines et poly-prolines sont bien moins flexibles que les glycines. Les effets collectifs semblent affecter de manière importante la flexibilité du peptide plus que la présence d’un acide aminé particulier.

Concernant les poly-alanines, on remarque que l'ajout d'une seule alanine pour former HA₆W a pour conséquence de ralentir très significativement le transfert de proton. La valeur numérique de la constante de temps associée n'a pu être mesurée du fait des limites expérimentales, voir figure III.23, le délai maximum (5 ms) est certainement trop court par rapport au temps caractéristique de transfert de proton de ce système.

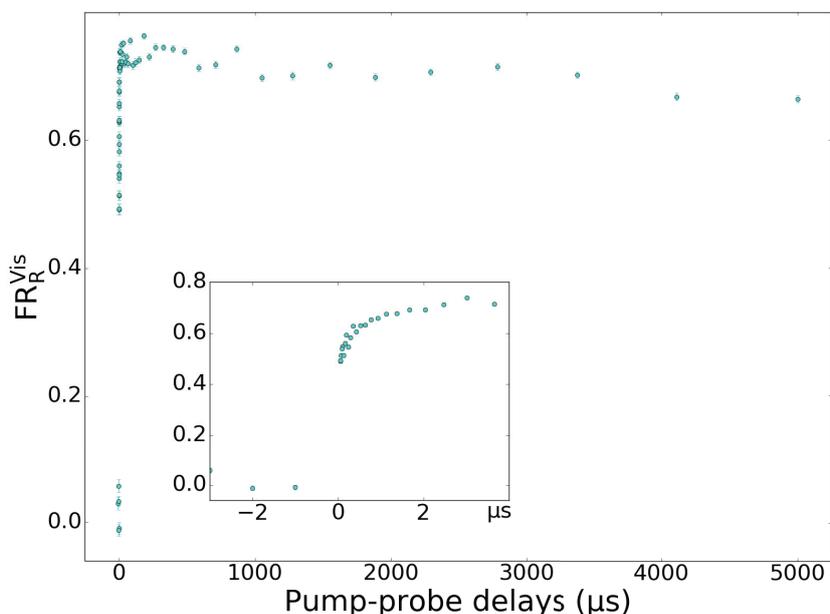


FIGURE III.23 – Rapport de fragmentation de HA₆W en fonction du délai pompe-sonde.

L'augmentation du temps de PT au-delà des temps mesurés (> 5 ms) ne peut pas seulement s'expliquer par le facteur d'entropie. Un autre paramètre important a pu entrer en jeu dans la dynamique conformationnelle du peptide et en défaveur du transfert de proton. L'hypothèse que nous formons concernant ce paramètre est la compétition entre le transfert de proton et la formation d'une structure secondaire rigide empêchant le transfert de proton. En effet, les alanines sont les résidus les plus disposés à former des hélices - α en solution.[136] De plus, Jarrold *et al.* ont rapporté la propension des poly-alanines de plus de 7 résidus à former des α -/ π -hélices en phase gazeuse.[137, 138] Ce qui correspond à la taille des poly-alanines dont nous avons observé un temps de transfert de proton plus long. On s'attend également à ce que l'histidine et le tryptophane ne perturbent pas la structuration du peptide. Il en est de même pour d'autres acides aminés dont la susceptibilité à former une hélice est faible, la glycine par exemple. HA₆W peut ainsi adopter une structure secondaire en hélice - α stable. Cela correspondrait à un puits de potentiel autour de cette conformation stable, qui ralentit l'exploration de la surface de potentiel jusqu'à la zone où le transfert de proton est possible. Par conséquent, la structure du peptide serait rigidifiée et tout contact entre l'histidine et le tryptophane serait désavantagé. Cette structure existe-t-elle déjà

lorsque le complexe [peptide-Ag]⁺ est ionisé? Des mesures de mobilité ionique ont montré que le peptide HA₆W protoné et le complexe avec l'argent ont une section efficace de collision très semblable, 208 Å² et 211 Å², ce qui dénote une structure très proche. Deux types de structures sont alors envisageables pour ce système. Il est connu que HA₆W adopte une forme globulaire en solution et que la charge (proton) située sur l'histidine est ainsi mieux solvatée. Ce système est similaire au système étudié par Jarrold *et al.*, où une lysine est localisée en N_{term} des poly-alanines.[139] Donc, si le peptide protoné et le complexe ont des structures similaires, on peut en conclure que le complexe a adopté également une structure globulaire, non-hélicoïdale. Le radical formé après le transfert d'électron sur l'argent est par conséquent initialement non-structuré. D'après Jarrold *et al.* on peut calculer une section efficace relative (équation eq-weight-stdev), indépendante du nombre de résidus d'alanines, n.

$$\Omega_{rel} = \Omega_{exp} - 14.5 \times n \quad (3.10)$$

Pour $n \geq 7$ les valeurs de Ω_{rel} apparaissent constantes et dénotent d'une structure hélicoïdale des poly-alanines étudiées. Dans notre cas, où $n = 6$, la valeur de Ω_{rel} est de 121 Å². Ce qui, au vu de la présence de l'histidine et du tryptophane qui augmente la section efficace de collision, peut être également associé à une structure hélicoïdale. Cette structure étant stabilisée par la présence d'une charge en C_{term} car la charge interagit favorablement avec le dipôle de l'hélice, on peut également supposer que dans ce cas, la charge soit portée par le tryptophane.[139] Il pourrait donc y avoir compétition entre l'affinité protonique de l'histidine qui porterait donc la charge en N_{term} (défavoriserait l'hélice au profit d'une structure globulaire), et la formation d'une hélice énergétiquement stabilisée par la présence de la charge sur le tryptophane. Néanmoins, la charge qui est localisée sur le tryptophane à l'issue du transfert d'électron, en C_{term} de la chaîne, est un facteur stabilisant la structure hélicoïdale. Une fois cette structure adoptée, elle ralentit la formation d'une conformation favorable au transfert de proton. Il y a donc une compétition entre le transfert de proton et la formation d'une structure en hélice stable. Ce type de compétition a déjà été observé par Jarrold *et al.* sur les poly-valines.[140] Dans ces poly-valines, l'énergie acquise en stabilisant une hélice sur-compense l'énergie perdue associée à la localisation du proton sur un site moins basique (C_{term}). De même, il semble que l'apparition d'une structure secondaire en compétition avec le transfert de proton soit le facteur principal qui affecte la dynamique conformationnelle de HA₆W, ralentissant ainsi le transfert de proton loin du tryptophane. L'observation exclusive des fragments du tryptophane radicalaire déprotoné (M-129 et M-185) suggère néanmoins que, s'il y a compétition avec la formation d'une hélice (même si celle-ci n'est énergétiquement pas favorisée), c'est le transfert de proton qui est énergétiquement favorisé.

Nous avons également étudié la dynamique de transfert de proton de peptides à cystéines, dont les groupements SH forment un pont disulfure intramoléculaire (figure III.24). Les peptides ont alors une forme "circulaire" ou cyclique. Dans ce cas nous supposons que la chaîne est plus rigide. Les temps caractéristiques montrent des dynamiques lentes comparées aux temps mesurés de peptides

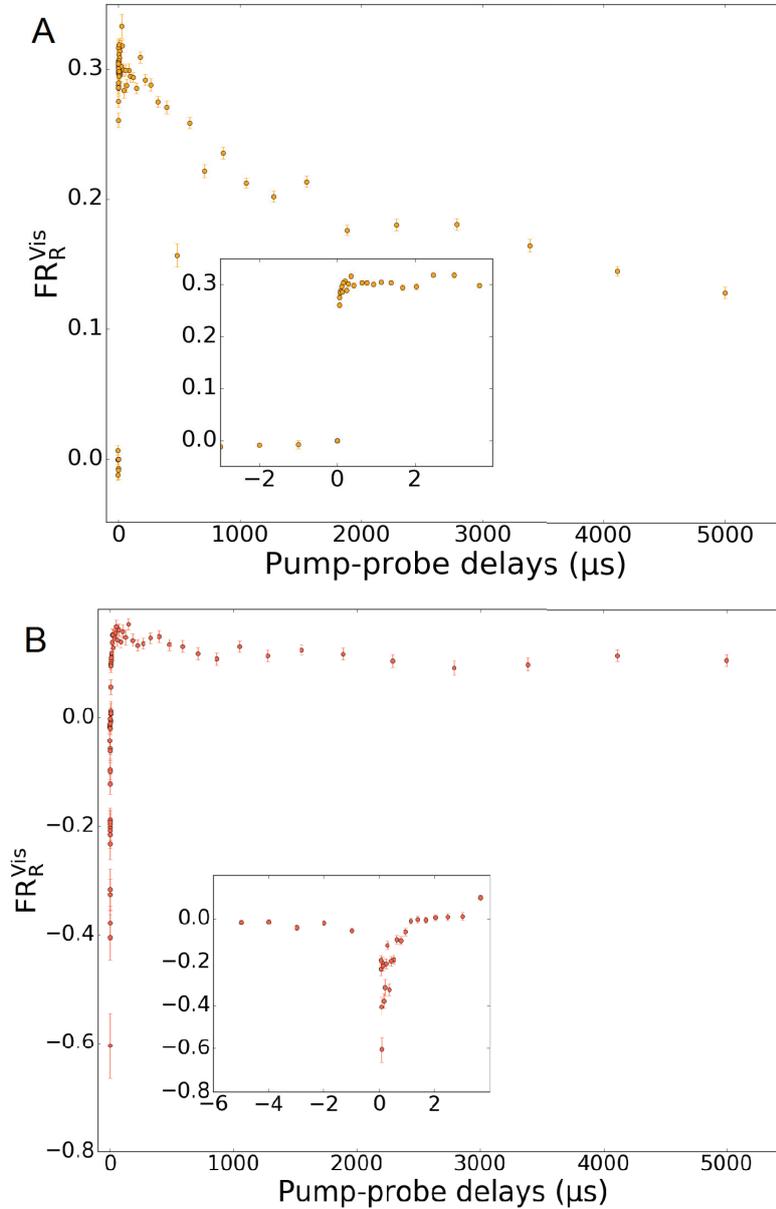


FIGURE III.24 – Rapport de fragmentation de CHG_2WC (A), CHP_2WC (B) en fonction du délai pompe-sonde. Les encarts présentes les points à délai négatifs et aux temps courts.

de taille similaire. On peut en revanche remarquer une différence entre le peptide composé de prolines et celui composé de glycines. En effet, il apparaît que le FR de CHP_2WC (figure III.24 B) en fonction du délai diminue très peu, le transfert de proton semble être défavorisé. Le déclin s'apparente à celui de HA_6W . Le déclin de CHG_2WC (figure III.24 A) est beaucoup plus prononcé. Le transfert de proton est plus favorisé dans ce cas. On peut ainsi déduire de ces observations que, malgré la rigidification de la chaîne *via* la liaison entre les souffres des cystéines, la composition en acide aminé reste un facteur majeur de rigidité de la chaîne. Mesurer la différence de dynamique

avec les peptides dont le pont disulfure est réduit aurait donné beaucoup plus d'information sur la nécessité du peptide d'adopter une conformation favorable au transfert de proton pour que celui-ci ait lieu de manière rapide et efficace. Malheureusement il n'a pas été possible d'observer le complexe argenté du peptide avec les cystéines réduites.

On peut noter, sur le spectre de CHP_2WC (figure III.24 B), que FR_R^{Vis} aux temps courts est négatif. Le facteur alpha apparaît juste car à délai négatif $\text{FR}_R^{Vis} = 0$. On peut émettre deux hypothèses quand à l'origine de ces valeurs. La première serait que l'intensité du fragment issu de la sonde diminuerait éventuellement au profit d'autres fragments non pris en compte lorsque le délai augmente (cela ne concerne que les temps courts). La deuxième hypothèse serait que la quantité de fragments avec argent augmente avec la sonde. Cet effet semble, en revanche, indubitablement lié à la présence de prolines sur la chaîne car ce phénomène n'est pas observé sur le profil de CHG_2WC .

IV Conclusion

Une expérience pompe-sonde a été mise en place afin de mesurer l'évolution du taux de transfert de proton intra-moléculaire d'une série de peptides. Ce transfert de proton s'est révélé être limité par la dynamique conformationnelle du peptide et il a été utilisé comme la signature de la dynamique conformationnelle de ce même peptide. Grâce à cet outil, de nombreux poly-peptides comme les poly-glycines, les poly-prolines, les poly-alanines, de tailles variables ont pu être étudiés et comparés. Les dynamiques pouvant atteindre la μs ont pu être mesurées et ont été attribuées à la cinétique de dissociation de l'argent neutre à partir du complexe métastable constitué du peptide radicalaire formé juste après le transfert d'électron. Au delà de cette étude particulière, l'interaction entre un atome métallique à l'état d'oxydation 0 et une biomolécule est un champ d'exploration ouvert et relativement peu étudié. Ce champ pourrait également concerner de manière plus générale l'étude de nanoparticules dans le domaine de l'imagerie et pour des applications bio-médicales.

Cependant, l'objectif premier de cette étude était d'identifier les tendances de dynamique conformationnelle selon deux facteurs : la longueur de la séquence et sa composition. En général, il a été observé que plus le peptide est grand, plus le paysage conformationnel est grand, plus le taux de transfert de proton est faible. Cela signifie que la dynamique conformationnelle est régie par l'entropie du système, lorsque celui-ci est petit et non-structuré. De plus, en prenant en compte la basicité des résidus en phase gazeuse, le transfert de proton du tryptophane radicalaire vers l'histidine est un phénomène spontané et véhiculé par la thermodynamique. Ainsi, il doit systématiquement avoir lieu même s'il est limité par la dynamique conformationnelle. En fait, il doit toujours avoir lieu, sauf si la présence d'une structure secondaire (hélice) surcompense l'énergie demandée pour que le proton reste sur le tryptophane. Puisque le taux de transfert de proton du HA_6W est ralenti en dessous des temps mesurables par le dispositif en place, peut-on en conclure que le transfert de proton est défavorisé par la formation d'une hélice? La présence d'une histidine dans la séquence du peptide

est révélée par la présence exclusive de photo-fragments issus de la déprotonation du tryptophane pour l'ensemble des peptides étudiés. C'est également le cas pour HA₆W. Il apparaît en revanche que pour ce peptide, le gain d'énergie dû à la formation de l'hélice est suffisamment important pour biaiser l'exploration de l'espace conformationnel et induit une importante compétition entre le transfert de proton et la formation de l'hélice. Ce n'est cependant pas suffisant pour entièrement compenser la différence de basicité en phase gazeuse entre l'histidine et le tryptophane. Cela est cohérent avec ce qu'a montré Jarrold sur le fait que les poly-alanines ne commencent à adopter une structure hélicoïdale qu'à partir de 7 résidus successifs.[137] Nos résultats concordent avec le début de la formation d'une structure secondaire entre 6 et 7 alanines.

Ces résultats soulignent le rôle fonctionnel de la dynamique structurale dans des systèmes biologiques où les mécanismes de transfert de charge peuvent être contrôlés par une reconfiguration de la structure secondaire. Ces questions sont fondamentales dans le domaine de la biologie, mais trouvent aussi des applications directes grâce au développement rapide d'outils opto-génétiques, inspirés par des photo-récepteurs naturels, qui nécessite une grande maîtrise des mécanismes de photo-activation. Le couplage de la spectroscopie résolue en temps et de la mobilité ionique est la perspective logique pour cette étude afin de corroborer les hypothèses structurales formulées.

Chapitre 4

Dynamique conformationnelle de peptides intrinsèquement désordonnés

I Introduction

Protéines intrinsèquement désordonnées

Les protéines sont caractérisées par différentes échelles de structures. La structure primaire constitue la séquence d'acides aminés codée par une séquence d'ADN. Le repliement en deux dimensions d'une partie de la structure primaire (pouvant impliquer plusieurs dizaines de résidus consécutifs) compose la structure secondaire, principalement l'hélice- α et le feuillet- β . La structure tertiaire correspond à l'assemblage et à l'organisation de l'ensemble des structures secondaires d'une chaîne. De nombreuses protéines fonctionnent sous forme d'oligomères ou de complexes protéiques : l'assemblage tridimensionnel des éléments de ces complexes correspond à la structure quaternaire. Il existe un lien extrêmement étroit et fort entre structure et fonction biologique des protéines et complexes protéiques.[1, 141, 142]

Il existe également des protéines dites intrinsèquement désordonnées. Ces protéines ne possèdent pas de structure secondaire et tertiaire stable.[57, 143] La protéine peut être entièrement (protéine intrinsèquement désordonnée : IDP) ou partiellement (région intrinsèquement désordonnée : IDR) désordonnée. Par la suite nous utiliserons le terme IDPR pour parler plus généralement de ces deux types d'absence de structure préférentielle stable. A la fin du XX^{ème} siècle, des études sur les IDPRs ont montré le lien entre l'absence de structure et la fonction de ce type de protéines.[3, 144] Elles se sont finalement révélées présentes en grande quantité dans les cellules eucaryotes et impliquées dans de nombreux mécanismes du vivant comme la signalisation cellulaire et la régulation de la transcription.[145–147] L'altération ou la modification de ces protéines peut cependant induire des maladies telles que certains cancers et maladies neurodégénératives comme Alzheimer et Parkinson, *etc.*[148–150] La fonction des IDPRs se manifeste généralement par la complexation et le repliement

simultanés de la protéine avec une protéine partenaire.[151, 152] La protéine partenaire peut, elle, avoir une structure secondaire et tertiaire. L'étude des IDPRs est un domaine encore émergent dans le domaine de la biologie structurale, l'intérêt pour ces systèmes a commencé à augmenter dans les années 90 (découverte dans les années 50).[153] Elle présente un intérêt fort notamment pour la recherche en médecine : recherche de traitements contre le cancer, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, *etc.*[150, 153] Ces recherches portent sur l'influence de la structure primaire de ces molécules sur leur capacité à se lier à leur partenaire, de leur aptitude à se replier ou se déplier ainsi que sur les mécanismes qui donnent lieu à leur fonction.[2, 154, 155]

Deux types de protéines désordonnées ont été étudiées et présentées dans ce chapitre. Premièrement, les protéines PUMA et Mcl-1, des protéines mitochondriales impliquées dans le processus d'apoptose des cellules de mammifères. Le deuxième système étudié est le Syndecan. Les Syndecans sont des protéines transmembranaires intrinsèquement désordonnées.

II Etude du complexe PUMA-Mcl-1

Dans cette partie seront présentés les résultats obtenus lors de l'étude du complexe PUMA-Mcl-1. Chacun des deux ensembles du complexe est d'abord caractérisé indépendamment l'un de l'autre afin de mieux comprendre le phénomène de repliement de PUMA et de complexation. Dans un souci de caractériser la structure du complexe sans risquer de le dissocier au cours de l'analyse, nous avons adopté l'approche MS native qui vise à caractériser la structure et la stoechiométrie de protéines et de complexes intacts.

II.1 Complexe PUMA-Mcl-1

L'apoptose, mort programmée des cellules, est un processus déclenché par un stress appliqué par la cellule. Les protéines impliquées dans ce processus sont de la famille Bcl-2 chez le mammifère. Elles induisent la mort cellulaire, initiée par les mitochondries suite à un stress apoptotique intracellulaire.[156, 157] La famille des Bcl-2 est composée de trois types de protéines, dont deux espèces de protéines pro-apoptotiques (BH3-only et domaines BH multiples), qui entraînent la mort de la cellule, et les protéines anti-apoptotiques.[158] C'est l'interaction entre les protéines pro et anti-apoptotiques qui entraîne la mort des cellules.

La figure II.1 présente à gauche l'état de la mitochondrie d'une cellule en absence de signal apoptotique et à droite les mécanismes mis en place suite à un stimulus apoptotique. En absence de stress apoptotique, les protéines anti-apoptotiques (pro-survival) de la famille Bcl-2 ont pour rôle de veiller à l'intégrité de la membrane mitochondriale externe (ce rôle est peu étudié). En réponse au stress, les protéines pro-apoptotiques, sont activées afin d'inter-

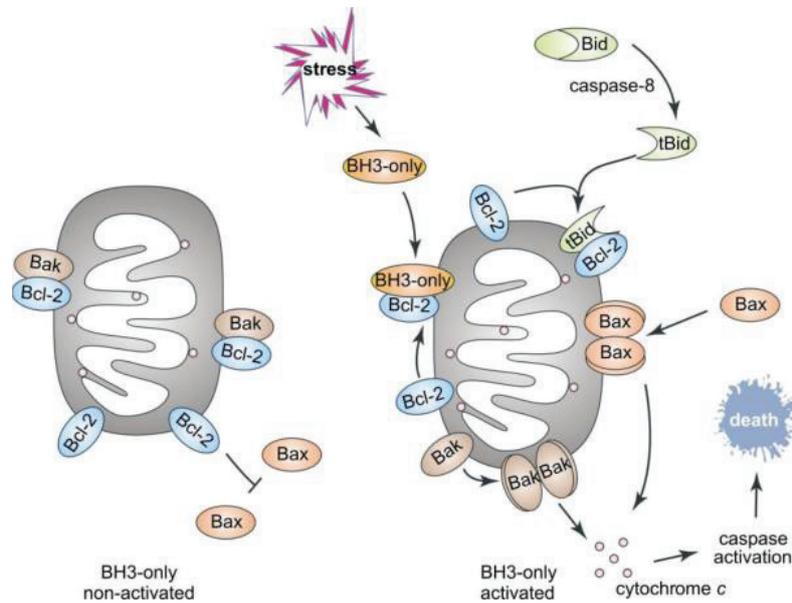


FIGURE II.1 – Schéma représentant une mitochondrie avec les différents acteurs et leurs actions régulant la mort de la cellule au sein de celle-ci. A gauche les protéines pro-apoptotiques ne sont pas libérées et les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bak) contribuent à l'intégrité de la membrane mitochondriale externe. À droite les protéines pro-apoptotiques (BH3 only) sont libérées suite à un stress dans la cellule et conduisent à l'apoptose. Source: [157]

agir avec les protéines anti-apoptotiques. La protéine pro-apoptotique se lie sur une rainure hydrophobe présente en surface de la protéine anti-apoptotique. Cette interaction permet de libérer les protéines "Bak-like" qui vont à leur tour libérer des vecteurs tels que le cytochrome *c*, se trouvant dans la mitochondrie, dans le cytosol. La cascade d'évènements qui suit détruit la cellule de l'intérieur par protéolyse et mène à sa mort.[157, 159] Ces deux types de protéines (pro et anti-apoptotiques) peuvent interagir grâce à des domaines appelés BH (Bcl-2 Homology). Ce sont les sites fonctionnels de ces protéines.

PUMA (p-53 upregulated modulator of apoptosis, uniprot : Q99ML1) est une protéine pro-apoptotique ne contenant qu'un seul domaine BH3 (BH3-only). Mcl-1 (Uniprot : P97287, PDB : 1WSX) est une protéine anti-apoptotique appartenant à la famille Bcl-2.[159, 160] Le binôme Mcl-1/PUMA, anti/pro-apoptotique, sera étudié dans ce chapitre.[161] Mcl-1 est une protéine globulaire constituée d'un site sous forme d'un sillon sur laquelle peut se complexer la protéine pro-apoptotique partenaire (PUMA dans ce cas) lorsqu'elle est à proximité. Ce sillon est composé de trois domaines BH entre les résidus 190 et 300. Le domaine BH3 de PUMA est situé entre les résidus 137 à 151 de sa chaîne peptidique.[162] On le retrouve sur la figure II.1 en réponse au stress apoptotique de la cellule : BH3-only. Cette protéine est non-structurée lorsqu'elle est isolée. Le domaine BH3 adopte une structure hélicoïdale

lorsqu'il est au contact du site d'interaction (le sillon) de Mcl-1.[163, 164]

De nombreuses recherches sont dédiées à l'étude de la liaison couplés au repliement de PUMA et Mcl-1(et de protéines similaires).[162, 165] En effet, ces protéines jouent un rôle majeur dans le recherche contre le cancer grâce à leurs fonctions pro- et anti-apoptotiques.[166, 167] La connaissance et le contrôle de la régulation de ces protéines semble être une voie envisagée pour réguler la prolifération des cellules cancéreuses. Ici nous nous intéresserons au phénomène dynamique de repliement de PUMA au contact de Mcl-1, figure II.2. La protéine PUMA est entièrement désordonnée lorsqu'elle est "libre". Le domaine BH3 de PUMA se repli en hélice lorsqu'il se lie au sillon hydrophobe de Mcl-1. Cette dernière, au contraire, ne voit pas sa structure modifiée par l'interaction.[161]

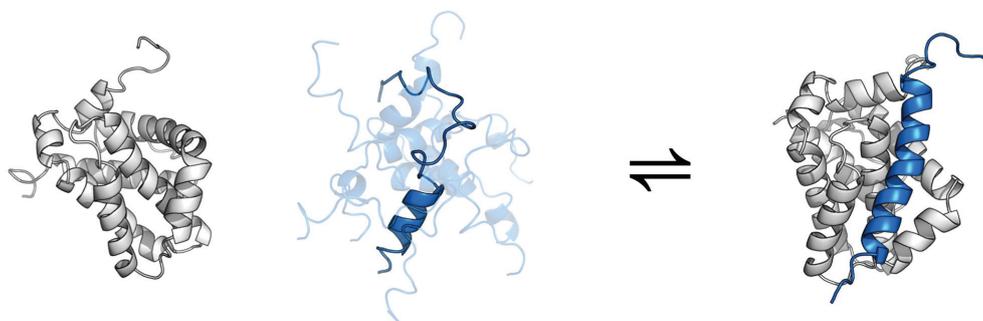


FIGURE II.2 – Schéma représentant la protéine Mcl-1 et le peptide PUMA avant (gauche) et après (droite) complexation. Figure adaptée à partir de [163].

La spectrométrie de mobilité ionique sera donc utilisée afin d'étudier la dynamique de repliement de PUMA conjointement à la complexation avec Mcl-1. En effet, la mobilité ionique s'est révélée être un outil robuste pour étudier les IDPR ainsi que des complexes similaires à PUMA/Mcl-1.[168–170] De plus, l'étude de la complexation et du repliement de PUMA en phase gazeuse donnerait des informations supplémentaires sur ce système jusqu'à présent seulement analysé en phase liquide par dichroïsme circulaire, par RMN, par stopped flow fluorescence, par microscopie ou par rayons-X. Par ailleurs, l'émergence de la spectrométrie de masse native et l'utilisation d'une source nano-electrospray permet de perturber au minimum les structures des protéines ainsi que les complexes non-covalents par rapport au milieu biologique.

II.2 Caractérisation de PUMA

PUMA est une protéine intrinsèquement désordonnée composée de 193 acides aminés. Seul le domaine BH3 de la protéine au contact de Mcl-1 peut se structurer en hélice. C'est seulement cette portion (résidus 127 à 161), formant le peptide PUMA, qui sera étudiée par

de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans une solution d'acétate d'ammonium à 20mmol.L^{-1} . Ces conditions de solution (20mmol.L^{-1} d'acétate d'ammonium) sont similaires à celles utilisées en spectrométrie de masse native de manière à ce que les données soient comparables au moment de l'étude du complexe. En effet, ce dernier sera étudié par native MS afin de nous assurer que le complexe soit stable en solution et pendant le processus ESI.

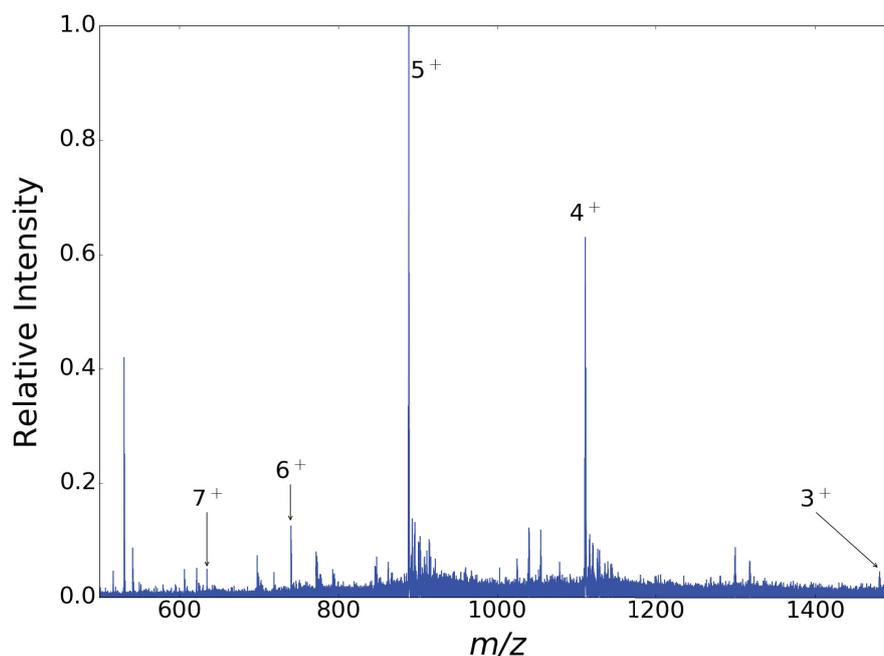


FIGURE II.3 – Spectre de masse de PUMA à $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans 20mmol.L^{-1} d'acétate d'ammonium

On peut observer sur le spectre II.6 la répartition des états de charges adoptés par PUMA après l'ionisation. Cette distribution s'étend de l'état de charge 3+ à 7+. Les plus abondants sont les 4+ et 5+.

Pour PUMP, les mêmes états de charge sont observés figure II.4. En effet, les alanines ne sont pas des sites basiques et les prolines sont assez basiques en phase gazeuse mais les charges sont réparties préférentiellement sur les lysines, les arginines et les histidines de la chaîne, qui sont les résidus les plus basiques et n'ont pas été modifiés sur le peptide artificiel PUMP.

Le spectre de fragmentation figure II.5 a permis de contrôler la séquence de hsPUMA synthétisé. Ce sont préférentiellement les fragments b/y qui sont formés lors de la dissociation induite par collision. Les fragments b et y annotés sur le spectre sont chargés de 1 à 5 fois.

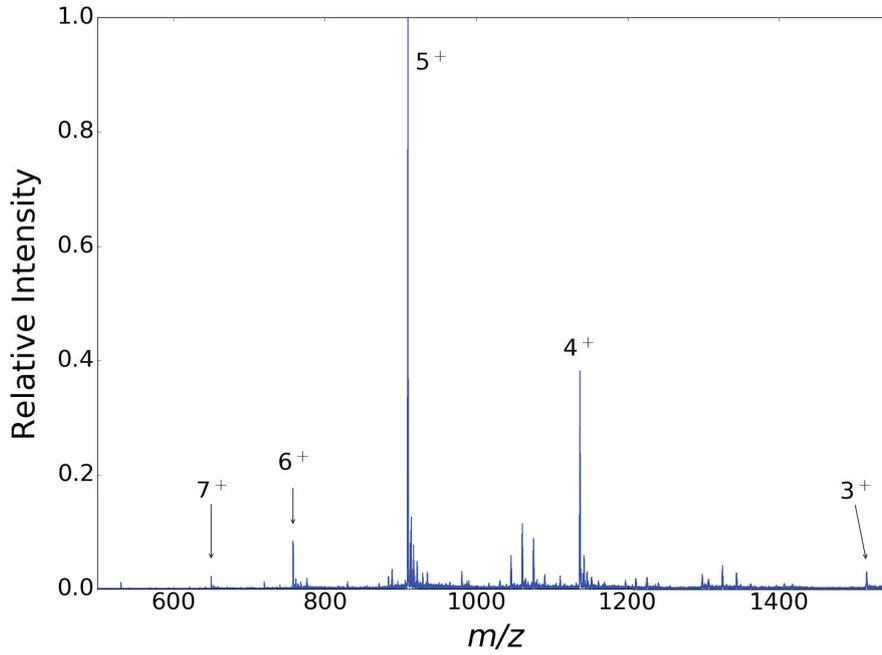


FIGURE II.4 – Spectre de masse de PUMP à $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans 20mmol.L^{-1} d'acétate d'ammonium.

TABLE 4.1 – Tableau de correspondance entre les masses m/z observées sur le spectre et les fragments b/y du peptide PUMA

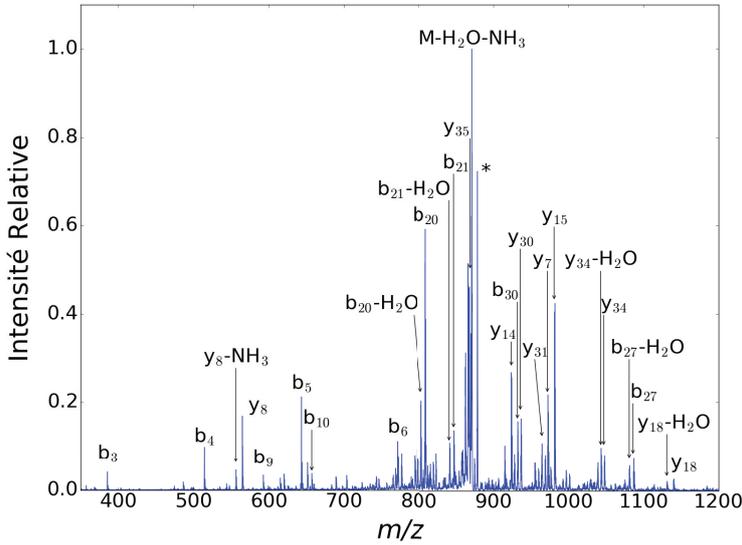


FIGURE II.5 – Spectre de masse MS/MS de PUMA chargé $5+$ dans une solution d'acide acétique. Une énergie de collision de $\text{NCE} = 20$ est appliquée. PUMA $5+$ (m/z 878) est marqué d'un astérisque, les fragments b/y sont indiqués sur le spectre.

m/z	Charge	Fragment
385.2	1	b_3
514.2	1	b_4
564.8	2	y_8
592.8	2	b_9
643.2	1	b_5
657.3	2	b_{10}
771.1	1	b_6
809.1	3	b_{20}
847.4	3	b_{21}
869.6	5	y_{35}
923.96	2	y_{14}
932.2	4	b_{30}
936.7	4	y_{30}
968.96	4	y_{31}
972.5	2	y_7
981.4	2	y_{15}
1047.7	4	y_{34}
1087.8	3	b_{27}
1140	2	y_{18}

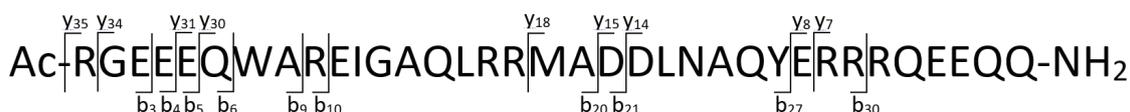


FIGURE II.6 – Séquence de hsPUMA avec localisation des fragments b/y observés.

II.2.b Caractérisation structurale de PUMA par Dichroïsme Circulaire

La spectroscopie par dichroïsme circulaire est une technique d'analyse optique très utilisée pour l'étude de la structure secondaire de peptides et de protéines dans le domaine UV de 180 à 260 nm (domaine d'absorption des liaisons peptidiques). En revanche entre 250 et 330 nm (zone d'absorption des acides aminés aromatiques), les données de dichroïsme donnent des informations sur la structure primaire de la molécule (autour des aromatiques). Cette technique permet de détecter les molécules optiquement actives (chirales) qui ont la capacité d'absorber différenciellement la lumière polarisée circulairement à droite ou à gauche. Les différentes structures secondaires des protéines (hélice, feuillet ...) notamment présentent des dichroïsmes circulaires particuliers permettant de caractériser la structure de ces molécules. L'absorption différentielle de la polarisation est tracée en fonction de la longueur d'onde pour tracer un spectre de dichroïsme circulaire. Grâce à cette technique, il est possible d'étudier les effets de l'environnement (solvant, pH, température, *etc.*) en phase liquide sur la structure secondaire de peptides et de protéines.[171, 172] Ces mesures sont rapides et sans destruction de l'échantillon. Il est possible de travailler avec des solutions à très faible concentration ($\sim \mu\text{g/mL}$), sans limite de taille de molécule.

Pour étudier les peptides et protéines en conditions non dénaturantes, il est important que le tampon utilisé n'absorbe pas dans le domaine 180-260 nm. Ici, c'est un tampon de phosphate de potassium ($\text{K}_2\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) à une concentration de 10 mmol.L^{-1} et un pH de 7.4 qui a été utilisé.

Les différents types de structures que peut adopter un peptide sont : hélice- α , feuillet- β , coude et structure aléatoire ou "random coil" (pas de structure). Le spectre de dichroïsme circulaire de chacune des ces structures est caractéristique (voir figure II.7). L'hélice- α présente un maximum à 190 nm et deux minima à 210 nm et 222 nm. Le feuillet- β ne présente qu'un seul minimum autour de 220 nm et le signal de la structure aléatoire (random coil) est toujours négatif avec un minimum à 200 nm.

Pour comparer ensuite les différents signaux de dichroïsme entre différents échantillons, solvants ou molécules, l'ellipticité molaire moyenne par résidus est calculée à partir des données recueillies de dichroïsme circulaire de manière à s'affranchir de la concentration, de la masse et du nombre de résidus de la molécule. Elle s'exprime en $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$. [173] Cette normalisation est calculée à partir de l'équation 4.1.

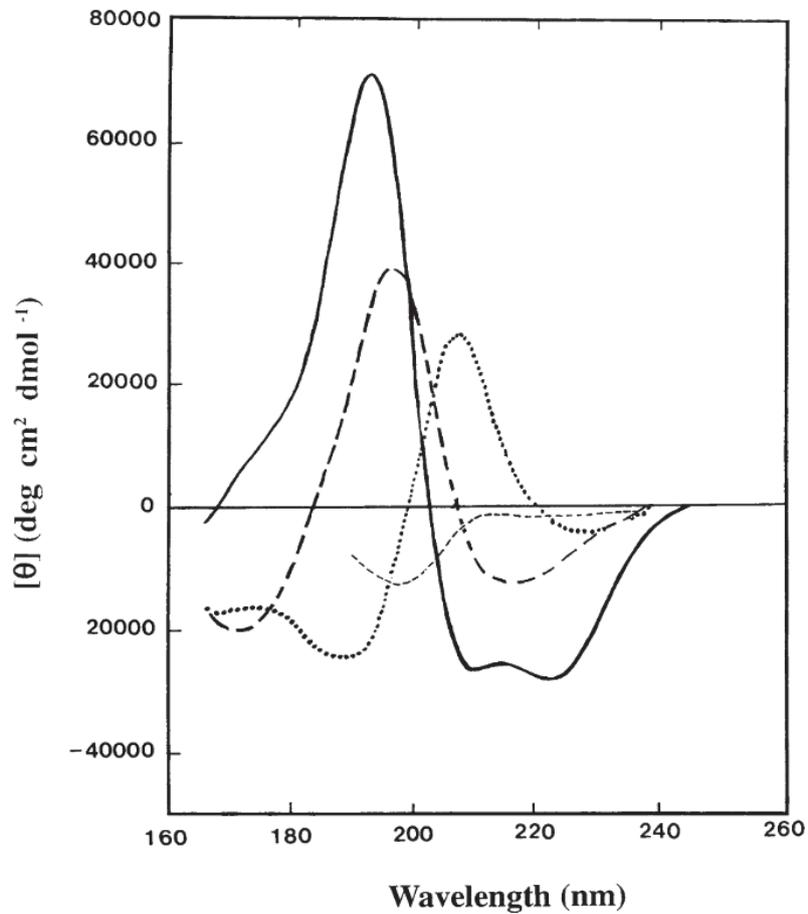


FIGURE II.7 – Spectre de dichroïsme circulaire présentant les différents types de structure secondaire: hélice- α (trait plein), feuillet- β anti-parallèle (tirets longs), tours (pointillés), désordre (petits tirets). Source : figure adaptée à partir de [171].

$$[\theta] = \frac{\theta \times 100 \times M}{C \times l \times n} \quad (4.1)$$

avec θ l'ellipticité mesurée en degrés, M la masse molaire du peptide, l la largeur de la cuvette en cm, C la concentration en mg/ml et n le nombre de résidus constituant le peptide.

Les spectres de dichroïsme de PUMA et PUMP ont été mesurés dans différentes conditions. 5 spectres ont été mesurés pour chaque condition de solution puis moyennés. En premier lieu, les peptides ont été dilués dans un tampon de phosphate de potassium afin d'avoir les structures de ces peptides en condition native ainsi que dans l'eau pure. Ensuite, différentes solutions à différents volumes de trifluoroéthanol (TFE) ont été analysées. En effet, le TFE favorise artificiellement la structuration en hélice des peptides.[174] Les différentes proportions de TFE ont permis de mesurer l'hélicité maximale que pouvait atteindre le peptide. Les

spectres des peptides dans un mélange 1 : 1 d'eau et de méthanol ont été mesurés, ce solvant étant généralement utilisé en spectrométrie de masse (non native) pour ioniser les molécules. Le méthanol est un solvant polaire qui détruit la structure tertiaire de protéines globulaires mais qui peut, au même titre que le TFE, aider au repliement en hélice de peptides.[175, 176] Cette action est induite plus généralement par les alcools et se limite à la structure secondaire de peptides. Le méthanol a cependant une action de moindre ampleur sur la structure que le TFE.[177] Enfin, deux solutions de PUMA diluées dans l'eau pure ont été placées à 70°C ou à 90°C au bain-marie pendant plusieurs minutes afin de mesurer les effets de la température sur la structure secondaire. Les spectres de dichroïsme des deux peptides dans ces conditions sont présentés figure II.8.

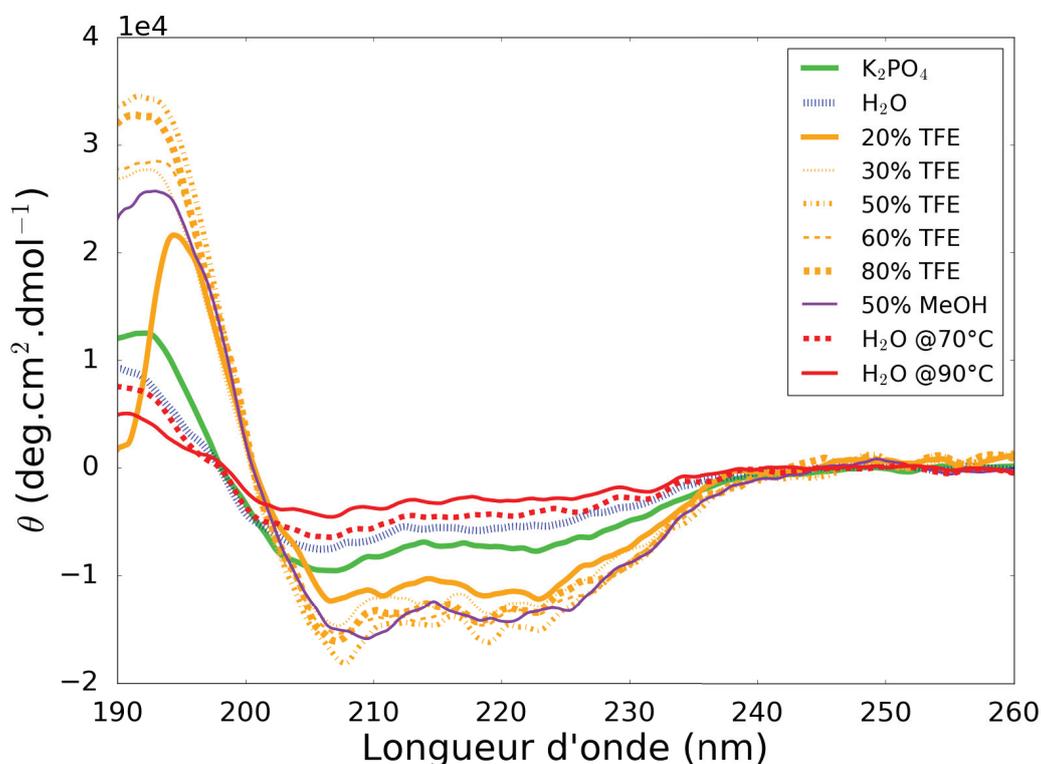


FIGURE II.8 – Spectre de dichroïsme circulaire de PUMA dans différentes conditions en phase liquide : PUMA à $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans le Tampon K_2PO_4 pH 7 (vert), $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans H_2O à pH7 (bleu), $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans différents % volumique de TFE (orange), $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ mélange 1:1 d' H_2O et de MeOH (violet), $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans H_2O à 70°C et H_2O à 90°C (rouge).

La courbe du peptide en conditions natives (tampon phosphate) en ligne continue épaisse verte, présente deux minima à 205 et 222 nm et un maximum autour de 192 nm est atteint. La forme de la courbe montre que le peptide a adopté une conformation hélicoïdale si on la compare au spectre de la figure II.7. La quantification relative de la structure de PUMA sera

présentée par ailleurs grâce à la déconvolution des spectres. On peut observer sur la figure une amplitude plus faible des minima des courbes bleu à larges pointillés, petits carrés rouges et ligne continue rouge associées respectivement au peptide dans l'eau pure à température ambiante, à 70°C et à 90°C par rapport au PUMA en tampon phosphate (structure native de PUMA). En revanche, on observe une augmentation de l'amplitude des minima avec la présence TFE et de MeOH dans la solution.

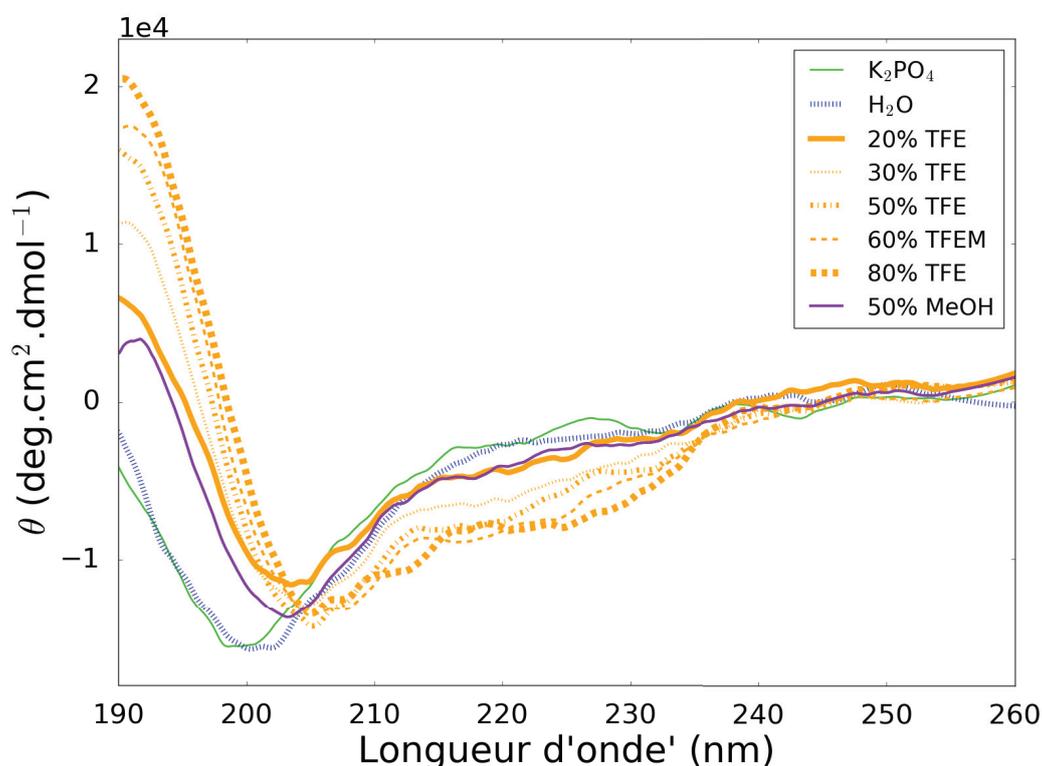


FIGURE II.9 – Spectre de dichroïsme circulaire de PUMP dans différentes conditions en phase liquide : PUMP à 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ dans Tampon K_2PO_4 pH 7 (vert), 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ dans H_2O à pH7 (bleu), 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ dans différents % volumique de TFE (orange), 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ mélange 1:1 d' H_2O et de MeOH (violet).

Le spectre de dichroïsme circulaire de PUMP est très différent de celui de PUMA. La présence de proline semble affecter la structure du peptide même en conditions natives. Dans ces conditions, la tendance de la courbe est assimilable à celle d'un peptide non structuré. En comparant avec la figure II.7 on peut effectivement voir que les courbes de PUMP (figure II.9 en tampon phosphate (ligne continues verte) et dans l'eau (épais pointillées bleus) présentent un minimum à 200 nm et atteint 0 $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ à 260 nm, tout comme la courbe en tirets de la figure II.7. Dès 20% de TFE (ligne continues épaisse orange) présent dans la solution, le minimum de la courbe de dichroïsme est déjà déplacé vers 205 nm. On peut également voir

émerger un deuxième minimum à 222 nm dont l'amplitude augmente avec la proportion de TFE. On peut ainsi assimiler cette tendance avec l'apparition d'une structure en hélice- α grâce à la présence de TFE en solution.

Afin de déterminer la quantité relative d'hélice- α , feuillet- β et random coil du peptide en solution, nous avons utilisé un logiciel de déconvolution de spectre de dichroïsme circulaire : *DichroWeb*. L'algorithme utilisé est CDSSTR [178] et nous avons choisi le jeu de données 7 à partir duquel l'algorithme va optimiser les valeurs d'hélicité et de feuillets *etc.* Ce jeu a été choisi car il a été construit à partir, en partie, de protéines dénaturées (structurellement proches d'un IDP). Ci-dessous figure un diagramme en barre comprenant les différentes proportions en hélice- α des deux peptides dans les différentes conditions d'échantillon après déconvolution des spectres de dichroïsme présentés précédemment.

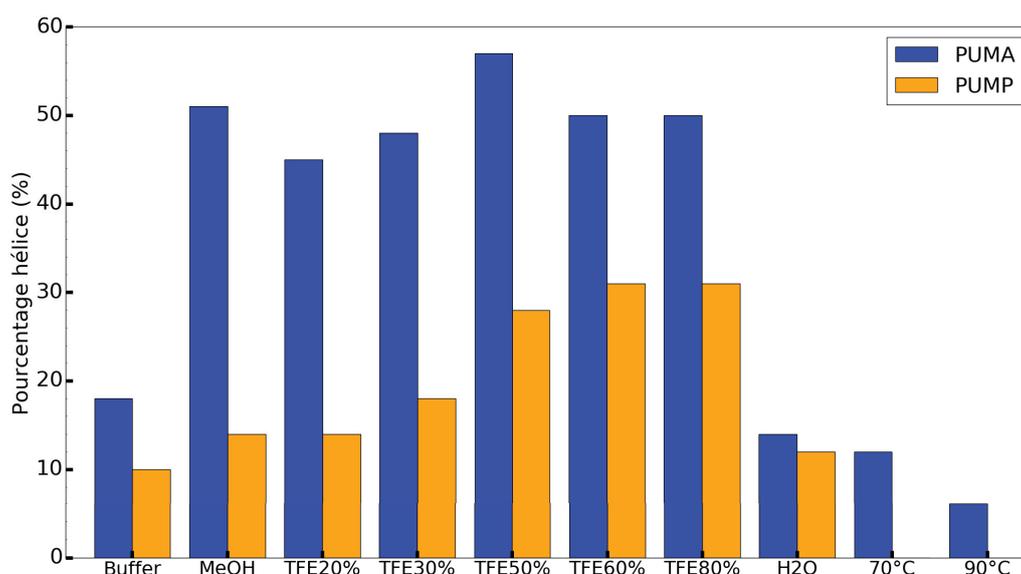


FIGURE II.10 – Diagramme en barre des proportions en hélice- α dans les échantillons de PUMA et PUMP après déconvolution des spectres DC avec l'algorithme CDSSTR [178]

La figure II.10 présente les résultats de déconvolution des spectres de dichroïsme circulaire de PUMA (bleu) et PUMP (jaune). Ce diagramme donne des valeurs de quantification relative en hélice- α en fonction des conditions en phase liquide : en conditions natives (tampon phosphate), PUMA présente 20% d'hélice- α . Cette proportion est tout à fait cohérente avec les résultats obtenus dans la littérature.[161, 165] Cette proportion d'hélice atteint un maximum de 55% dans la solution de 50% de TFE et un minimum de 5% lorsque la solution dans l'eau pure est chauffée à 90°C. Ce résultat montre bien que lorsqu'un peptide est chauffé sa structure secondaire est dégradée.

En ce qui concerne PUMP, la proportion en hélice apparaît plus faible en conditions natives (tampon) que le PUMA. Ce résultat coïncide également avec les résultats de Clarke *et al.*[165] L'hélicité augmente graduellement avec la proportion en TFE. D'après le diagramme, le peptide présente 10% d'hélicité en tampon phosphate et atteint un maximum de 30% avec un volume 60% et 80% de TFE. L'hélicité maximale atteinte par le peptide est globalement plus faible que pour PUMA. L'absence totale d'alanines au profit des prolines tout au long de la chaîne altère visiblement sa capacité à se replier. Que ce soit en conditions natives ou dans un milieu favorisant le repliement en hélice, ce peptide semble peu enclin à former une hélice- α en phase liquide. Ainsi, on peut espérer qu'en la présence de TFE dans la solution il sera possible d'observer différents temps d'arrivée en mobilité ionique des deux peptides. On pourra éventuellement déterminer le temps d'arrivée du PUMA avec une plus grande proportion en hélice- α . De plus, PUMP apparaît comme un bon peptide contrôle. Quelles que soient les conditions, son repliement en hélice est largement défavorisé en phase liquide. Cela nous permettra d'utiliser le spectre de PUMP comme point de comparaison avec les temps d'arrivées de PUMA en mobilité ionique et en déduire alors les temps d'arrivées correspondant à un gain ou une perte d'hélicité du peptide selon les conditions en solution ou les paramètres de mobilité ionique.

II.2.c Caractérisation structurale de PUMA par mobilité ionique

La spectroscopie par mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse permet d'observer et comparer la/les conformations de PUMA, PUMP et Mcl-1. Dans le cas de PUMA, son profil de mobilité ionique nous permet d'observer la diversité conformationnelle accessible d'un peptide intrinsèquement désordonné. On pourra également comparer ce paysage à celui de PUMP, qui a montré une rigidité plus importante par dichroïsme circulaire. Enfin, le profil de PUMA nous permettra par la suite de mesurer l'évolution de son paysage conformationnel lorsqu'il est au contact de Mcl-1. On espère pouvoir observer le repliement de PUMA en hélice grâce à cette technique.

La figure II.11 présente le profil de mobilité de PUMA dans une solution à 20 mM d'acétate d'ammonium (trait plein bleu) à l'état de charge 5+. On peut voir une diversité de temps d'arrivées peu étendue, entre 28 et 32 ms. Le pic étroit centré sur 28 ms correspond à la conformation la plus compacte, elle est également majoritaire car il s'agit du pic le plus intense. Les épaulements, entre 29 ms et 31 ms pourraient correspondre à des structures un peu moins compactes. Le pic le plus à droite, dont le maximum est centré sur 32,4 ms peut être associé à la structure la plus étendue de ce peptide.

Nous avons ensuite tenté d'observer le repliement en hélice de PUMA de manière artifi-

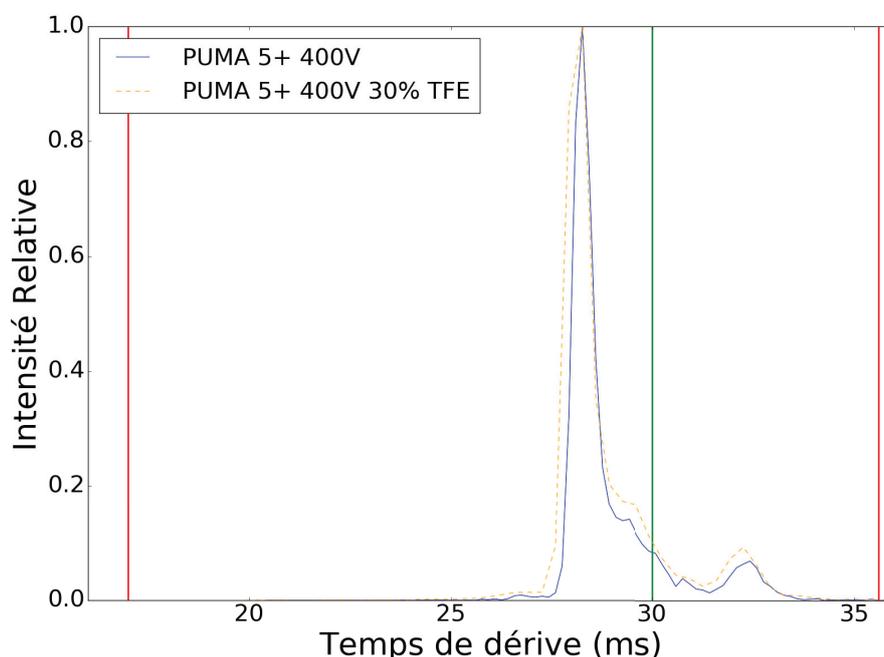


FIGURE II.11 – Spectre de mobilité de PUMA à l'état de charge 5+ et une tension de 400 V dans le tube 2. Les droites verticales rouges sont les temps d'arrivées associées à la formes théorique la plus compacte (gauche) et la plus étendue (droite) de PUMA.

cielle, sans interaction avec Mcl-1. Le TFE était déjà connu pour favoriser la structuration de peptides en hélice et avait été observé par dichroïsme circulaire (voir section II.2.b). Le profil de mobilité de PUMA dans 30% de TFE a ainsi été mesuré (figure II.11 tirets oranges) Les deux spectres (PUMA dans l'acétate d'ammonium et dans le TFE) ont été normalisés par rapport au maximum d'intensité de manière à pouvoir comparer la forme et la position du pic majoritaire ainsi que la forme et la position des pics et l'intensité du pic le plus à droite. Il apparaît que les deux spectres sont identiques. Les maxima sont localisés aux mêmes temps de dérive. La largeur des pics est semblable ainsi que l'intensité des pics les moins intenses. Le spectre de mobilité ionique de PUMA se montre indépendant du solvant dans lequel il est stocké.

Il semble donc que PUMA ne conserve pas la structure qu'il a adopté grâce au TFE en phase liquide. En effet, le TFE aide au repliement des peptides grâce à des interactions de type électrostatiques avec le peptide.[174] Ainsi, lorsque le TFE est retiré de l'entourage du peptide (processus electrospray), son action sur le peptide s'annule. Le peptide retrouve ainsi son paysage conformationnel spécifique à la phase gazeuse, après l'ionisation par electrospray.

Les traits verticaux rouges et jaunes sur les spectres de PUMA (figure II.11) et PUMP

(figure II.14) respectivement, correspondent aux calculs théoriques des sections efficaces de la forme la plus étendue (CCS_{max}) et la plus compacte (CCS_{min}) accessible par le peptide. Le modèle utilisé pour calculer la CCS de la forme la plus compacte est une sphère dont le volume est calculé à partir de la densité ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) de la protéine.[179, 180] Le modèle utilisé pour calculer la forme étendue du peptide est construit à partir d'un cylindre de rayon R présenté figure II.12 et a été implémenté par Aurélien Lefevre, doctorant à l'Institut des Sciences Analytiques de Lyon.[179] Chaque acide aminé de la chaîne est assimilé à un cube de longueur R . Chaque cube placé en quinconce compose le cylindre. La hauteur de ce cylindre est proportionnelle au nombre d'acides aminés sur la chaîne peptidique.

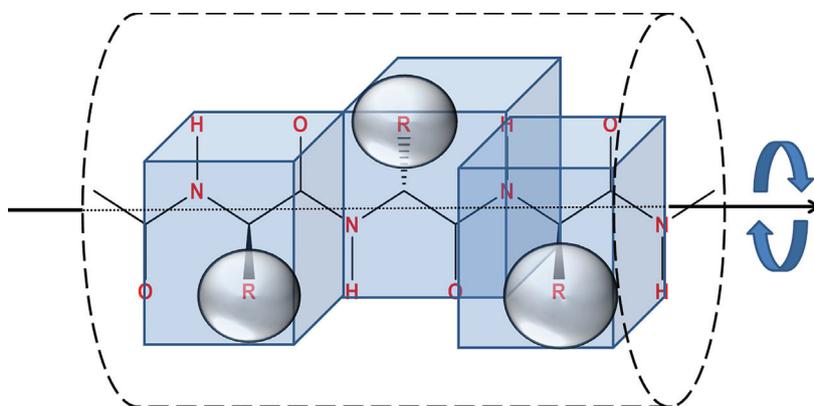


FIGURE II.12 – Schéma du modèle pour le calcul de CCS max. Figure extraite de la référence [179].

Il apparaît que les temps d'arrivée associés aux CCS des formes compactes et étendues théoriques de PUMA sont respectivement 17 ms (413 \AA^2) et 35.6 ms (1073 \AA^2). Les CCS ont été converties en temps d'arrivée à partir de l'équation 1.3 et de l'équation 1.6 présentées dans le chapitre 1. Les pics de mobilité ionique de PUMA semblent plus proches de la limite de la forme la plus étendue théorique de PUMA. On peut supposer que le peptide n'est pas totalement replié sur lui-même. Un peptide en phase gazeuse a plutôt tendance à s'effondrer, la chaîne s'enroule sur elle-même, sans structure définie ce qui tend à diminuer sa surface globale accessible. Ces résultats nous laissent donc penser qu'en phase gazeuse le peptide peut avoir une partie de la chaîne structurée, ou dépliée.

La droite verte sur le spectre de PUMA (figure II.11) présente le temps d'arrivée attendu pour la structure de PUMA présentée sur la figure II.13. Il s'agit de la structure modifiée, non optimisée, de PUMA (PDB 2ROC) lorsque le peptide est au contact de la protéine partenaire Mcl-1. PUMA est donc en forme d'hélice du résidu 131 à 154. La structure primaire de PUMA PDB 2ROC étant plus courte que celle du peptide étudié expérimentalement, nous avons manuellement ajouté les résidus manquants sur la chaîne. Les résidus ajoutés sont les résidus

127 à 129 (RVE) et 157 à 161 (QEEQQ). De plus le résidu 156, une arginine sur la structure PDB 2ROC, a été modifiée en méthionine sur la structure présentée figure II.13.

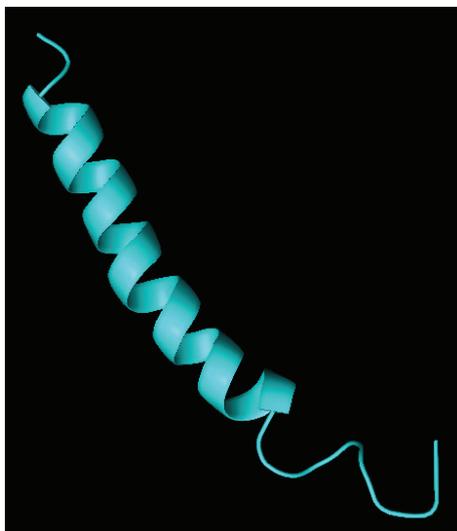


FIGURE II.13 – Structure PDB de PUMA modifiée à partir de la structure PDB 2ROC.

Ainsi le temps d'arrivée associé à la section efficace de collision calculée grâce au programme Imos a partir de la structure PDB (figure II.13) est de 30 ms (899 \AA^2). Cette valeur est proche des temps d'arrivée mesurés, on peut donc envisager qu'il serait possible que PUMA puisse être en partie replié en hélice en phase gazeuse. En tout cas, cette valeur calculée associée aux bornes de temps d'arrivée également calculés et aux résultats expérimentaux présumant d'une structure plutôt étendue du peptide et non collapsé (comme ce qui est attendu pour un peptide en phase gazeuse).

Le peptide PUMP quant à lui, à l'état de charge 5+, présente une distribution d'intensité relative au temps d'arrivée différente de PUMA. En effet, on peut noter que le pic de mobilité de PUMP dans 20 mmol.L^{-1} d'acétate d'ammonium (courbe bleue) est très large. Il s'étend de 25 ms à 35 ms.

Tout comme PUMA le profil de PUMP dans une solution de TFE ne montre aucune différence avec celui du peptide en milieu acétate. Cette observation suggère que le passage en phase gazeuse ne permet pas de conserver la structure adoptée en phase liquide. De plus, le profil de PUMP se trouve être plus proche du temps d'arrivée de la forme théorique la plus étendue. Il semble donc que ce peptide ne soit également pas entièrement effondré sur lui-même.

Les profils de PUMA et PUMP sont présentés conjointement figure II.15. Le profil de PUMA est tracé en ligne continue bleue, et celui de PUMP en pointillés verts.

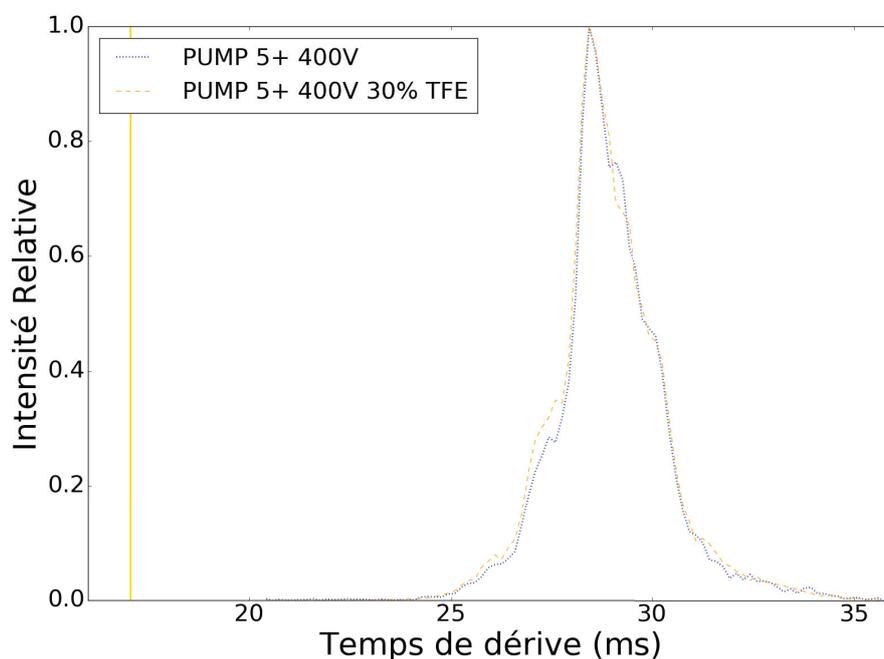


FIGURE II.14 – Spectre de mobilité de PUMP à l'état de charge 5+ et une tension de 400V dans le tube2

Le pic le plus intense de PUMA et celui de PUMP correspondent au même temps d'arrivée. Le paysage conformationnel des deux peptides s'étend sur la même plage de temps d'arrivée (environ 5 ms). La différence apparaît sur l'intensité des différents conformères. Nous espérons pouvoir observer des différences lors de la complexation du peptide avec Mcl-1 et mettre en avant la nécessité que le peptide ait une structure primaire favorisant le repliement en hélice (ce qui n'est pas le cas pour PUMP).

Les deux peptides en phase gazeuse présentent tous deux des structures indépendantes de la phase liquide. La comparaison entre les temps d'arrivée de structures théoriques nous permet de supposer que les deux peptides ont leur chaîne peptidique peu collapsée.

Les résultats obtenus par mobilité ionique ne nous permettent pas de conclure sur la présence d'une structure hélicoïdale sur les peptides PUMA et PUMP en phase gazeuse. On peut seulement dire que la phase gazeuse ne conserve pas la mémoire de la structure en phase liquide de PUMA et PUMP et que ces derniers ne sont pas complètement repliés sur eux-mêmes. PUMA semble adopter une structure préférentielle, peut-être la plus stable.

Pour aller plus loin dans la caractérisation structurale de PUMA, nous avons sondé la

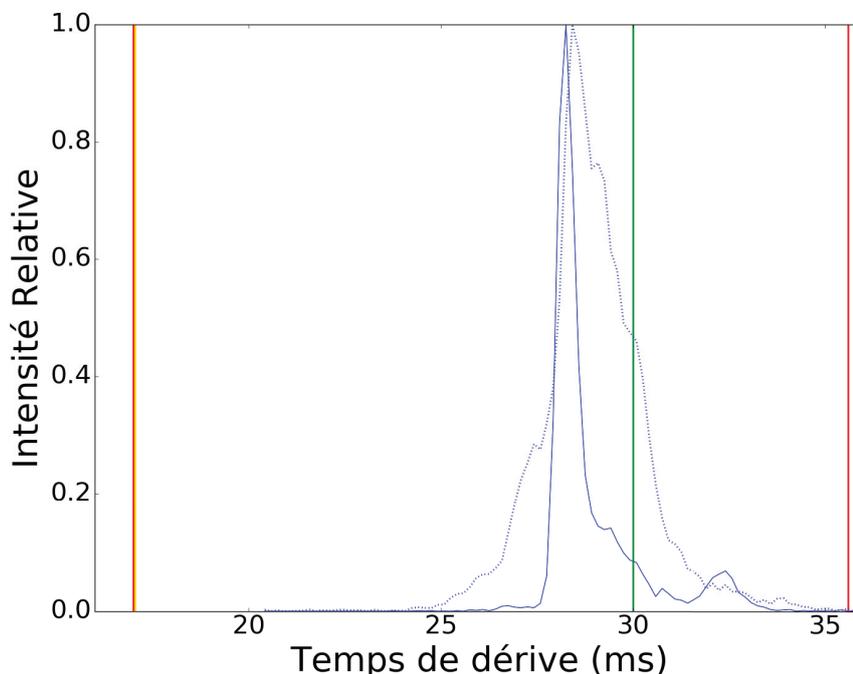


FIGURE II.15 – Spectre de mobilité de PUMA et PUMP à l'état de charge 5+

stabilité relative de deux conformères distincts présents sur le profil de mobilité de hsPUMA 6+ (Taxonomie : Homo Sapiens). La différence de taxonomie ne présente pas de différences fondamentales sur les études de structure 3D du peptide sachant que le domaine BH3 qui se replie en hélice est identique pour les deux espèces. Pour cela nous avons utilisé la mobilité ionique en tandem, présenté dans le chapitre 1, pour sélectionner l'une des deux conformations grâce à son temps d'arrivée au niveau du funnel B. Puis une tension de 0 à 120 V a été appliquée sur les électrodes afin d'accélérer le peptide sélectionné. L'énergie cinétique alors acquise par le peptide est en partie convertie en énergie interne grâce aux collisions de celui-ci avec le gaz du tube. Nous avons ensuite mesuré la mobilité des ions dans le second tube (également présenté dans le chapitre 1).

Sur la figure II.16, sont présentés les résultats de l'expérience de stabilité relative des deux conformères de hsPUMA à l'état de charge 6+ dans l'acétate d'ammonium. En effet, cet état de charge était le plus intense et le plus facile à sélectionner dans le funnel au moment de l'expérience. Tout en bas de la figure, le profil de mobilité du peptide est tracé, sans sélection aucune, ni activation ("No selection, a0"). On distingue les deux conformères. La fenêtre située juste au dessus (noté s1 a0), est le profil de mobilité du peptide lorsque le pic le plus à gauche est sélectionné dans le funnel sans activation. Après sélection, seul ce conformère

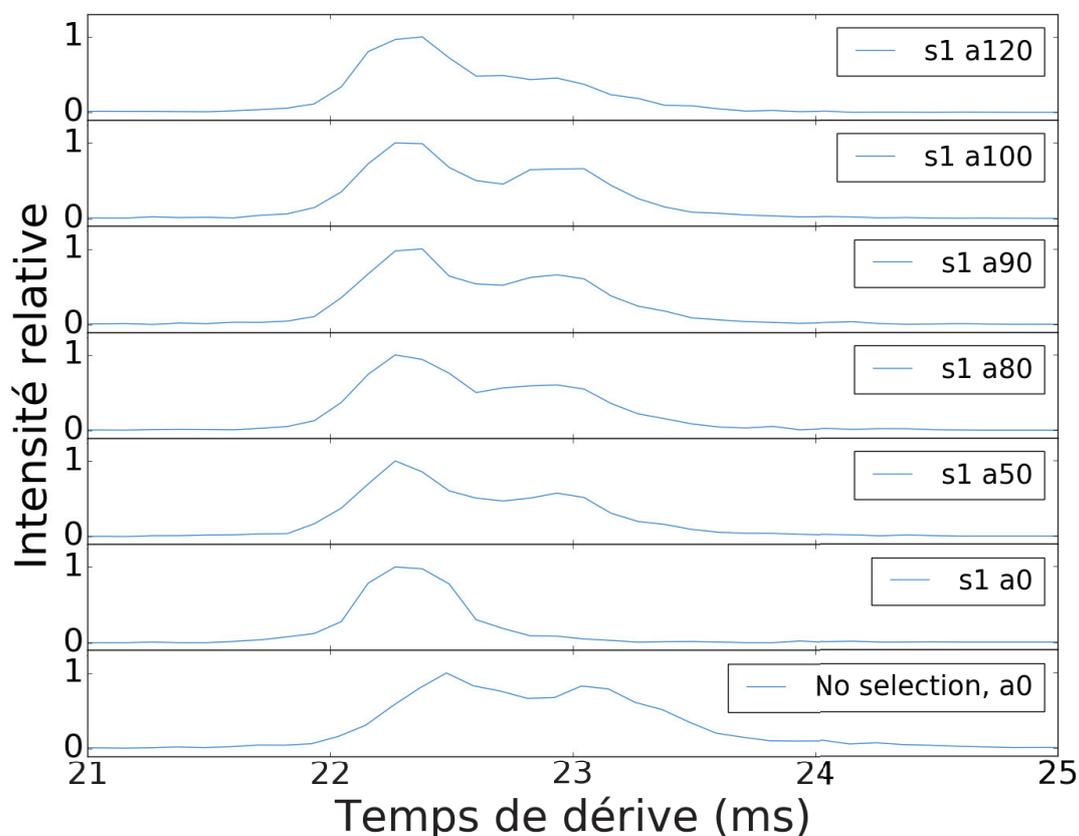


FIGURE II.16 – Spectre de mobilité de PUMA 6+ (No selection, a0) avec sélection du pic de gauche (s1, a0) et une tension appliquée de 50 V (s1, a50), 80 V (s1, a80), 90 V (s1, a90), 100 V (s1, a100) et (s1, a120)

poursuit sa route dans le tube 2. On n’observe pas l’apparition du deuxième conformère. On peut donc dire que ce conformère est stable, dans les conditions de température et de pression associée à l’expérience (soit la durée de dérive dans le tube 2). Dans la fenêtre immédiatement au dessus, le même pic est sélectionné et une tension d’activation de 50 V est appliquée. Un signal apparaît alors autour du temps de dérive du second conformère. La tension de 50 V semble apporter suffisamment d’énergie au peptide pour qu’il puisse adopter de nouveau la conformation la plus étendue. Le pic étant apparu est de plus faible intensité que celui présent sur le profil sans sélection, ce qui laisse penser que sans sélection le peptide est dans un état métastable non relaxé vers la distribution d’équilibre. On peut également constater sur la figure pour des valeurs de tension d’activation supérieures à 80 V, l’intensité du pic correspondant à la conformation ayant émergé après activation n’atteint pas l’intensité observé sur le même pic sans sélection ni activation. On peut donc supposer que la distribution obtenue après activation permet d’atteindre l’état de quasi-équilibre de la molécule. On peut supposer que la structure de PUMA après activation se rapproche de la structure en phase

liquide.

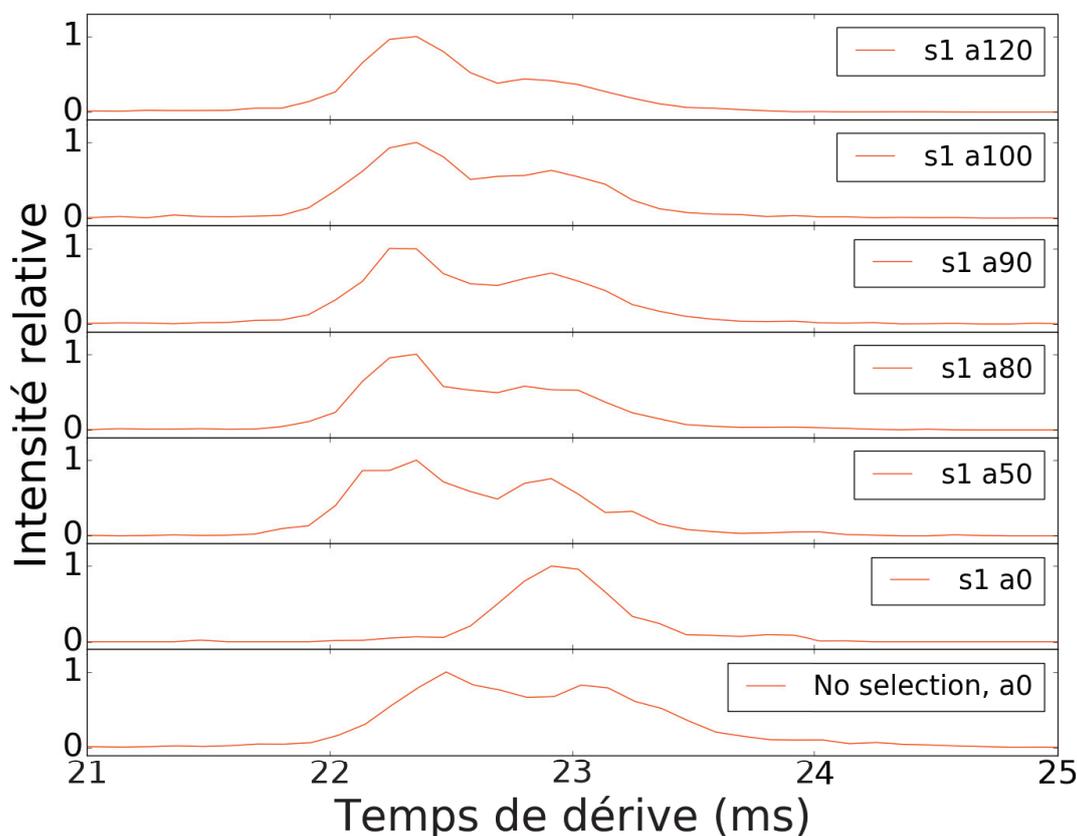


FIGURE II.17 – Spectre de mobilité de PUMA 6+ (No selection, a0) avec sélection du pic de droite (s1, a0) et une tension appliquée de 50 V (s1, a50), 80 V (s1, a80), 90 V (s1, a90), 100 V (s1, a100) et (s1, a120)

De la même manière, le deuxième pic présent à droite en bas de la figure II.17, a été sélectionné (deuxième fenêtre en partant du bas, légendé "s1 a0") sans activation. De la troisième fenêtre en partant du bas jusqu'à la fenêtre en haut de la figure, différentes énergies d'activation ont été appliquées, de 50 V à 120 V. Dès 50 V d'activation, on peut observer l'apparition d'un pic à gauche au temps d'arrivée du conformère non sélectionné. L'intensité de ce pic est déjà la plus grande et ne semble plus augmenter à des énergies plus importantes. On retrouve ici les mêmes proportions que sur la figure II.16, ce qui confirme l'état de quasi-équilibre atteint par PUMA après activation.

On peut conclure de ces observations que ces conformères ont une structure métastable en phase gazeuse ou bien que la dynamique d'inter-conversion sans activation est bien plus lente que la durée de la dérive dans le tube. L'apport d'énergie sous forme de collisions avec le

gaz permet alors de passer la barrière d'inter-conversion des deux états accessibles. L'énergie nécessaire pour atteindre l'état de quasi-équilibre de la bradykinin, étudiée par Clemmer *et al.*, est du même ordre que l'énergie nécessaire pour atteindre l'état de quasi équilibre de PUMA.[181]

II.3 Expression et caractérisation de Mcl-1

Après avoir caractérisé et étudié PUMA par spectrométrie de masse et mobilité ionique nous nous intéressons à présent à la caractérisation de Mcl-1. La protéine Mcl-1 est constituée de 331 acides aminés. La partie de protéine comprenant les domaines BH (Bcl-2 homology) commence du résidu 151 au résidu 308. Les domaines BH sont impliqués dans la fonction anti/pro-apoptotique de la protéine et donc dans la complexation avec le peptide PUMA. C'est également cette partie de la protéine qui est étudiée par Clarke *et al.*. Ce groupe a largement contribué à l'étude du repliement couplé à la complexation de PUMA et Mcl-1 et des systèmes similaires.[161, 163, 165]

II.3.a Expression de la protéine

Le vecteur pREST A codant pour la protéine Mcl-1 (des résidus 151 à 308, Code d'accession Uniprot : P97287) nous a été gracieusement fourni par le groupe du Pr. J. Clarke (University of Cambridge). Un vecteur est un plasmide modifié par génie génétique, c'est-à-dire une molécule d'ADN double brin circulaire retrouvée naturellement chez les bactéries. Le vecteur permet une production plus importante de protéines sous forme recombinante. Le vecteur utilisé est constitué d'une séquence d'ADN codant pour la protéine Mcl-1 attachée à une séquence codant pour une étiquette poly-histidine (6xHis) et une séquence codant pour 6 résidus d'acides aminés (LVPRGS) permettant le clivage de l'étiquette "His-tag" présente à son extrémité N-terminale. Un gène de résistance à l'antibiotique ampicilline permet, lors de la phase de transformation (inclusion du vecteur dans les cellules par choc thermique) de sélectionner les cellules ayant incorporé le vecteur (en tuant toutes les autres avec l'antibiotique).

Il est tout d'abord nécessaire d'amplifier le vecteur, c'est-à-dire en obtenir un nombre important de copies (phase 2. sur la figure II.18). Pour cela, les souches *E.Coli* DH5- α ont été transformées. La transformation permet l'incorporation du vecteur au sein de bactéries (phase 1. sur la figure II.18). Les bactéries l'ayant incorporé sont alors sélectionnées par l'ampicilline. La souche DH5- α est la plus à même de produire une très grande quantité de vecteurs. Ces vecteurs sont ensuite purifiés et stockés à -80°C (phase 3. sur la figure II.18). On procède de nouveau à la transformation de bactéries à partir des vecteurs précédemment produits dans les souches BL-21. Ces souches sont adaptées à la production massive de protéines. Une partie des clones ayant poussé (donc contenant le vecteur) ont été repiqués afin

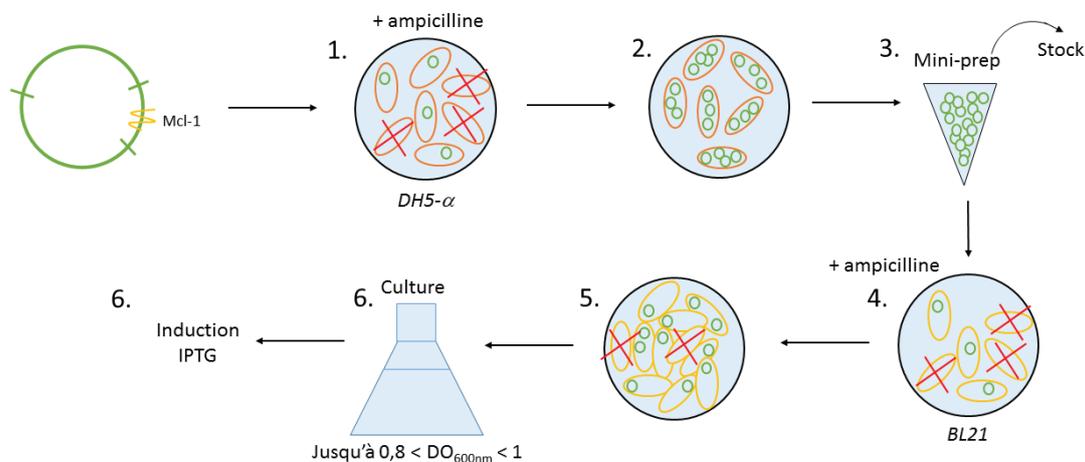


FIGURE II.18 – Schéma des différentes étapes de l'expression de Mcl1.

de les mettre en culture.

Ces cultures ont été réalisées dans un milieu nutritif de grand volume et en présence d'ampicilline jusqu'à atteindre une densité cellulaire suffisante (densité optique de la solution entre 0.8 et 1) pour induire la production de protéines (phases 6). L'induction a été réalisée en ajoutant de l'IPTG (Isopropyle β -D-1-thiogalactopyranoside). Les cellules ont ensuite été extraites du milieu par centrifugation puis le culot a été re-suspendu dans un tampon Tris salin contenant de l'imidazole. Les cellules ont été lysées par sonication (ultrason) en présence de lysozyme, qui est une enzyme dégradant la paroi bactérienne. Après l'étape de lyse, la solution est centrifugée. Le surnageant contient ainsi un mélange complexe issu notamment du cytoplasme des bactéries, dont fait partie la protéine recombinante Mcl-1.

Afin de séparer sélectivement les autres composants, le surnageant est purifié par chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA (acide nitrilotriacétique). L'ion Ni^{2+} possède une forte affinité pour les groupements imidazole portés par les résidus d'histidine, notamment ceux présents dans l'étiquette 6xHis de la protéine recombinante. Les protéines riches en résidus d'histidine dont le Mcl-1 sont ainsi retenues par la résine alors que les autres molécules seront éluées (c'est-à-dire non retenues sur la résine). Après plusieurs étapes de lavage, les protéines sont éluées par un gradient d'imidazole qui agit en tant que compétiteur pour les ions Ni^{2+} de la résine Ni-NTA. Le suivi de l'élué est réalisé par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 280 nm. En effet, les résidus aromatiques, notamment le tryptophane, absorbent la lumière dans l'ultra-violet, permettant leur détection mais aussi de manière quantitative (il est possible d'estimer la concentration en protéine sur la base de l'absorption). Des aliquots issus de chaque étapes de la purification sont récupérés afin de suivre la progression de la purification par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). La masse moléculaire

attendue sur gel est de 19,44 kDa mais une bande migrant à une masse apparente d'environ 40 kDa a été observée dans les fractions d'élution, soit une masse moléculaire d'environ le double de la masse attendue. Les fractions d'élution correspondantes ont été regroupées et dialysées contre un tampon acétate d'ammonium 10 mM pH 7.2 (compatible avec les expériences de spectrométrie de masse native) afin d'échanger le tampon. Trois dialyses consécutives ont été effectuées puis la protéine a été diluée puis analysée par spectrométrie de masse.

II.3.b Spectrométrie de masse de Mcl-1

Nous avons alors tenté de caractériser la protéine exprimée par spectrométrie de masse (ESI-Q-TOF).

Le spectre de masse (figure II.19) n'a pas révélé la présence de la protéine. Celui-ci montre un bruit de fond important. Il apparaît que la solution n'a pas été suffisamment purifiée. La présence de sel (provenant de l'expression) peut également être à l'origine de la quantité apparente de pic sur le spectre et du bruit de fond important. Les barres verticales rouges indiquent la position des pics des rapports m/z de Mcl-1 ($M = 19440$ Da) attendus aux états de charge allant de 10^+ à 19^+ . Ces barres ne correspondent à aucun pic du spectre de masse. Sans cette caractérisation par spectrométrie de masse nous ne pouvons aller plus avant et poursuivre l'étude par mobilité ionique. Il nous faudra par la suite procéder de nouveau à l'expression et la purification de la protéine. De plus la source nano-electrospray étant opérationnelle, établir le spectre de masse en utilisant cette source permettra de s'affranchir des sels présents en solution et obtenir un spectre de masse plus "propre". On pourra alors espérer distinguer les états de charge de Mcl-1 du bruit de fond.

II.4 Conclusion

Les études préliminaires en phase gazeuse de PUMA et du peptide mutant PUMP ont révélé la grande flexibilité et la diversité de leur paysage conformationnel. Les données de dichroïsme circulaire et de spectrométrie de masse ont permis de caractériser la structure du peptide et son comportement en phase gazeuse. Nous avons également pu observer la perte de la structure associée à la phase liquide lors du passage en phase gazeuse.

L'expression et la caractérisation de Mcl-1 n'ont pour l'instant rien donné. Cependant notre meilleure connaissance du système nous permettra lors d'une prochaine tentative de mieux maîtriser l'expression de la protéine et sa purification. La source nano-ESI aujourd'hui opérationnelle et notre maîtrise de cette technique nous permettra également de caractériser en masse et en mobilité ionique Mcl-1 tout en étant capable de s'affranchir du solvant et des sels qu'il contient à l'issue du processus d'expression et de purification de la protéine.

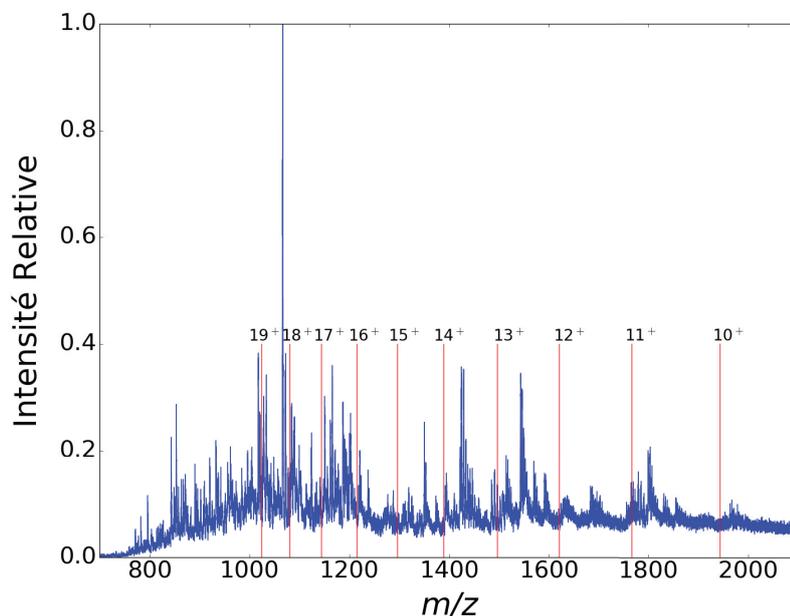


FIGURE II.19 – Evaluation par MS des fractions censées contenir Mcl-1 purifié. On ne distingue pas la présence de cette protéine dont les pic sont attendus au niveau des barres verticales rouges.

Dès que Mcl-1 aura été caractérisée par mobilité ionique et spectrométrie de masse nous pourrons tester la distribution de conformation de PUMA dans une solution de PUMA/Mcl-1 puis amorcer l'étude du repliement couplé à la liaison entre PUMA et Mcl-1. Nous espérons alors observer le repliement de PUMA en hélice, mesurer la force de la liaison du complexe et le dépliement éventuel de PUMA après séparation avec Mcl-1.

III Caractérisation structurale de protéines transmembranaires : les syndécans

Les syndécans sont des protéoglycanes dont la fonction est la régulation de la matrice extracellulaire, de la signalisation et de l'adhésion (avec la matrice ou une autre cellule). Cette famille de protéines est composée de 4 membres nommés SDC-1, -2, -3 et -4. Aucune donnée structurale de l'ectodomaine de ces protéines n'est accessible, ce domaine étant intrinsèquement déstructuré. C'est donc à la caractérisation de la structure de l'ectodomaine de ces quatre syndécans que s'est intéressé le groupe du Pr. Ricard-Blum de l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire et Supramoléculaire de Lyon.

III.1 Ectodomaines de syndécans

Dans le cadre de l'étude de protéines intrinsèquement désordonnées, nous avons travaillé en collaboration avec l'équipe de la Pr. Sylvie Ricard-Blum de l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire et Supramoléculaire à Lyon (ICBMS). Un de leurs axes de recherche porte sur la caractérisation des syndécans. Les syndécans sont des protéines membranaires de cellules de mammifères. Ils sont impliqués dans de nombreux processus biologiques tels que la signalisation cellulaire, l'interaction avec leur micro-environnement et peuvent également être à l'origine de maladies tels que certains cancers (poumon, rein, peau).[182–186] Ces protéines sont constitués de 3 domaines différents : une partie intracellulaire, une partie transmembranaire et une partie extracellulaire pouvant se détacher du reste de la molécule par rupture protéolytique pour la régulation de processus biologiques. C'est cette dernière partie qui est intrinsèquement désordonnée et qui sera étudiée par mobilité ionique. Il existe 4 membres différents (figure III.20) dans la famille des syndécans (numérotés de -1 à -4). La taille et la composition des différents syndécans varient. L'objectif est de caractériser la structure de ces protéines dans le but de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à leur fonctions et leur interactions avec d'autres protéines.[187] Cette étude a donné lieu à la rédaction d'un article en cours de soumission.

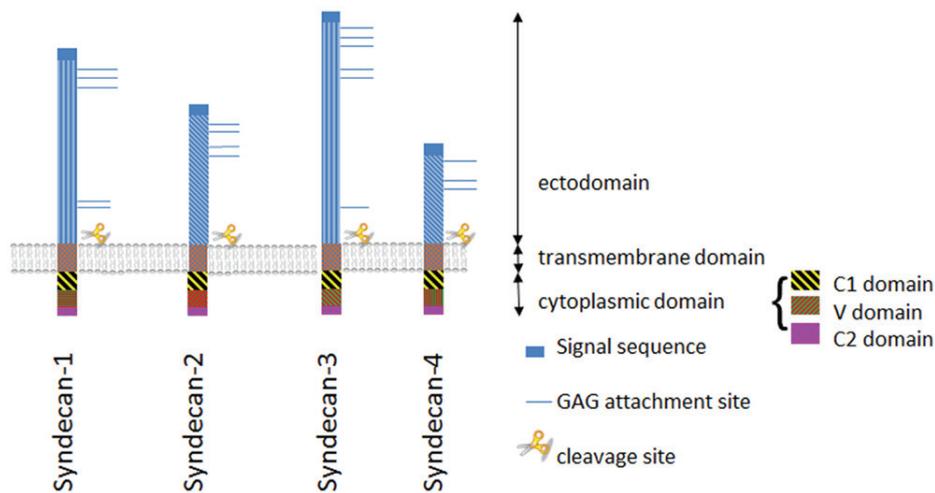


FIGURE III.20 – Schéma représentant les quatre types de syndécans et leur position sur la membrane cellulaire, l'ectodomaine étudié est situé dans le milieu extracellulaire (partie haute de la figure). Figure adaptée à partir de [184].

III.2 Hétérogénéité conformationnelle des ectodomaines des syndécans

Des expériences de mobilité ionique et de mobilité ionique en tandem couplé à la spectrométrie de masse a permis d'en apprendre plus sur la diversité conformationnelle des ecto-

domaines.

ED4 contient une cystéine à son extrémité C-terminal capable de former un pont disulfure avec un autre ED4. Ce peptide est donc très susceptible de former un dimère. Un peptide mutant ED4-C150A a été utilisé afin d'étudier ED4 sous sa forme monomérique. La cystéine est remplacée par une alanine de manière à ce que le peptide ne puisse pas former de ponts disulfures.

III.2.a Section efficace de collision des syndécans

Les différents ectodomaines étudiés ont montré une grande diversité d'états de charge par spectrométrie de masse. Cette diversité d'état de charge observés malgré l'utilisation de conditions natives reflètent une grande flexibilité des système en phase gazeuse comme en phase liquide. Ces observation vont dans le sens de la nature non-structurée des ectodomaines.

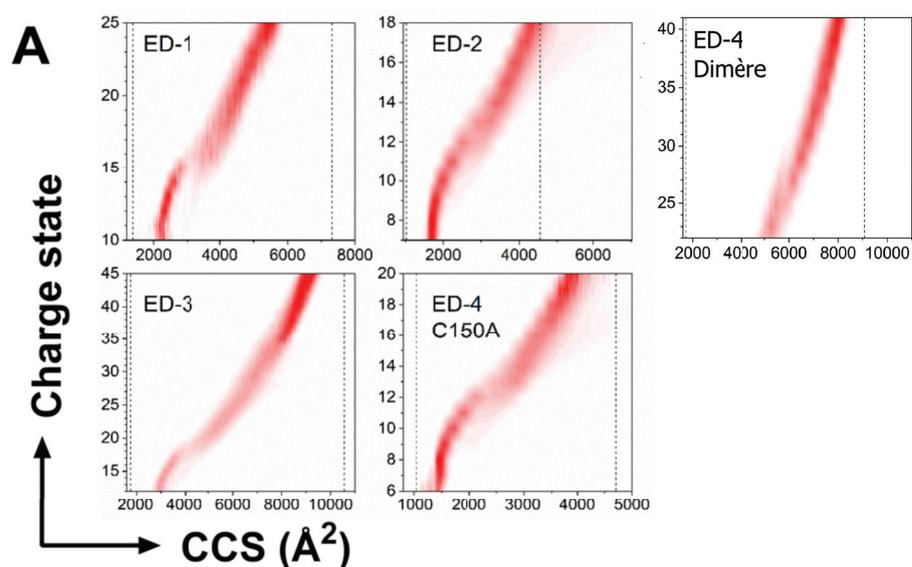


FIGURE III.21 – État de charge en fonction de la section efficace de collision des syndécans -1, -2, -3 et -4 monomère (C150A) et dimère.

Les bornes tracées en traits pointillés dans les encadrés de la figure III.21 limitent l'espace de sections efficaces accessibles des ectodomaines estimés grâce à la méthode précédemment utilisée pour PUMA.[179, 180] Ainsi on peut voir que ED1 explore seulement la moitié de l'espace accessible (54%) alors que ED-2, ED-3 et ED-4 (monomère) explorent respectivement 73%, 70% et 68% de l'espace des CCS. Ceci, en plus de la large distribution d'états de charge, concorde avec le fait que les ectodomaines sont des peptides flexibles avec une

structure allongée et non repliée (random coil).

Une transition entre une forme compacte et une plus étendue apparaît pour tous les ectodomaines avec l'augmentation de la charge menant à une distribution bimodale des CCS. Cette transition, d'après Beveridge *et al.*, serait liée aux conformations compactes et allongées adoptées par la molécule et qui détermineraient le mécanisme de désolvatation lors du processus electrospray (*cf.* Chapitre 1, partie I.1.c) et donneraient donc différents états de charge.[188] D'après ce modèle la transition a lieu lorsque le rayon d'un ion de charge z atteint la taille maximum d'une gouttelette de solvant portant une charge z , c'est la limite de Rayleigh. Cette transition se produit pour $z = 8-13$ pour ED-2 et ED-4, $z = 11-15$ pour ED-1 et $z = 16-18$ pour ED-3. L'état de charge dont la transition entre les distributions de CCS a lieu pour les 4 ectodomaines se rapporte à 80 à 85% de la limite de Rayleigh correspondante estimée d'après De La Mora *et al.*[189] Aucune transition n'est observée pour le dimère de ED-4. Une telle transition devrait avoir lieu autour de l'état de charge 15+, mais cet état de charge était hors de la fenêtre de détection en masse lors de l'expérience. Ces résultats corroborent avec l'existence de deux familles de conformations des ectodomaines. On peut également envisager la contribution de différents mécanismes de désolvatation sur la transition observable entre ces familles.[188]

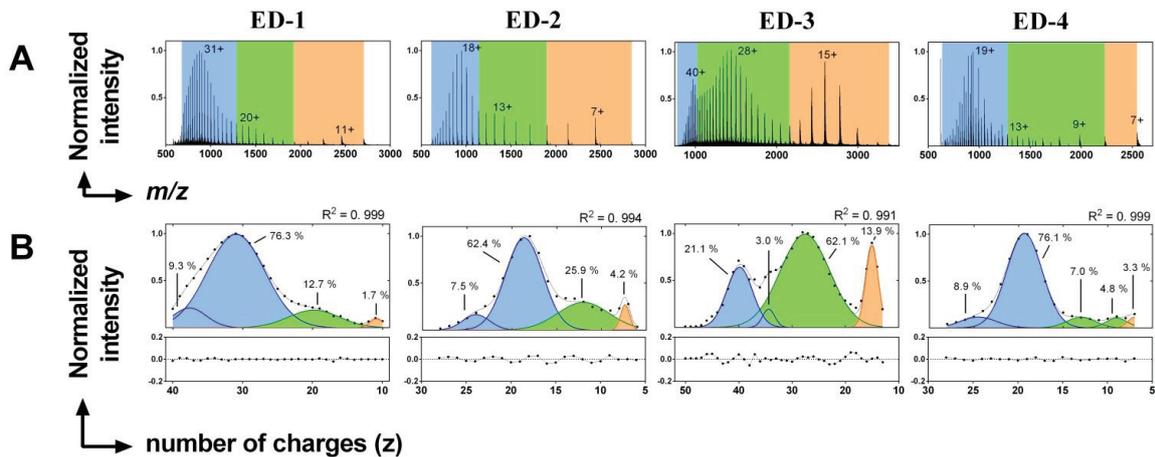


FIGURE III.22 – Spectres de masse des ectodomaines ED des 4 syndécans dont les familles de distribution d'état de charge sont représentés en bleu pour les états de charge les plus grands donc les conformations les plus étendues, en vert pour les états de charge intermédiaires et en orange les faibles états de charges correspondant aux conformations les moins étendues.

Les syndécans semblent adopter trois ensembles de conformation distinctes de différents degrés de compacité par spectrométrie de masse (figure III.22 A). Les conformations les plus

compactes de tous les ectodomains étudiés des syndécans ont la plus faible intensité relative (figure III.22 B). En revanche les conformations les plus étendues de ED-1, ED-2 et ED-4 (monomère) représentent 70 à 85% de l'espace des CCS mesurés.

III.2.b Le cas de ED-4

Ed-4 est capable de former un dimère *via* un pont disulfure entre deux cystéines. Deux configurations sont envisagées pour ce dimère. Une configuration dite "head-to-tail" (tête à queue) qui formerait un édifice de deux fois la longueur du peptide ou bien en configuration "face à face".

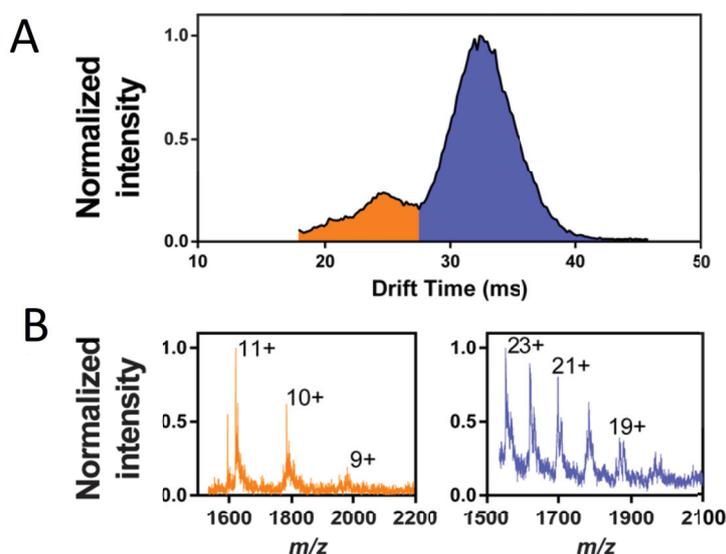


FIGURE III.23 – Profil de mobilité ionique de ED-4 "wild type" (A), Spectre de masse extraits des pics de mobilité (B)

Deux pics de mobilité ionique ont pu être observés pour ED-4 "wild type" figure III.23. Le spectre de masse extrait à partir du pic coloré en orange, à 25 ms montre une distribution d'états de charge allant de 9 à 11. Ce spectre correspond à ED-4 monomérique. Le pic coloré en bleu sur la figure, à 32 ms correspond a un spectre de masse dont les charges vont de 18 à 23. Ce pic est alors associé au dimère de ED-4. Le temps de dérive d'un ion est proportionnel au rapport de la CCS avec la charge z . Il est étonnant de voir que le temps de dérive du dimère est plus grand que celui du monomère contenant la moitié des charges. En effet, en mobilité ionique, l'effet de la charge est beaucoup plus importante que l'effet de la masse. Ces données laissent donc supposer que l'effet qui prime dans cette expérience est la CCS. On peut donc présumer que soit le dimère à une CCS d'environ deux fois celle du monomère

ce qui permet d'envisager que le dimère de deux ED-4 est en configuration "head-to-tail", soit la dimérisation à un effet structurant sur la chaîne des deux ED-4.

Le dimère de ED-4 reste malgré tout désordonné et flexible car la distribution d'état de charges en MS native est très grande (figure III.21). La configuration "tête à queue" observée par mobilité ionique est cohérente avec le rayon de gyration (SAXS) et le rayon hydrodynamique (DLS) calculé lors de précédentes études des syndécans par le groupe du Pr. Ricard-Blum.

III.3 Conclusion

L'étude des ectodomains des syndécans est un challenge dans le domaine de la biologie structurale et notamment pour identifier la relation entre conformation et fonction. L'absence de structure secondaire de ces molécules synonyme d'une grande flexibilité est mise en évidence par la large distribution d'états de charge et de CCS associés. Les données de mobilité ionique associées à la spectrométrie de masse ont permis de mettre en évidence certains aspects conformationnels des ectodomains des syndécans étudiés. Cette étude s'ajoute aux différentes techniques utilisées par l'équipe du Pr. Ricard-Blum, permettant d'avoir accès à la structure des ectodomains et à leurs interactions avec l'environnement (SAXS, Dichroïsme circulaire).

Conclusion

Dans ce travail de thèse nous nous proposons de nous intéresser à divers aspects concernant l'étude de la conformation adoptée par des molécules biologiques. Parmi les méthodes dédiées à l'analyse conformationnelle, le FRET d'action a été développé dans le groupe et met en oeuvre la fragmentation de chromophores. L'utilisation du FRET suppose de bien comprendre les phénomènes photophysiques impliqués. Ainsi, la première partie de mes travaux de thèse a consisté, au delà de la preuve de concept, à caractériser les conditions et les mécanismes selon lesquels ces chromophores fragmentent de manière apparemment photo-spécifique. A la suite de travaux théoriques sur la fragmentation des rhodamines fluorescentes via des états excités d'ordre supérieur, nous avons ainsi mis en évidence le caractère multiphotonique séquentiel de l'absorption menant à la dissociation du quencher de fluorescence QSY7 utilisé pour le FRET d'action. À chaque photon absorbé succède une conversion interne de l'énergie et une redistribution interne de l'énergie vibrationnelle qui ramène le chromophore d'un état électronique excité à un état vibrationnel excité à l'état fondamental. Nous avons également pu identifier une voie alternative (quoique minoritaire) d'évolution de ces chromophores à base xanthène : la réaction à l'état excité. Nous avons ainsi caractérisé la durée de vie de la rhodamine 6G et sa réactivité avec le NO. Il est donc important de continuer d'étudier la photo-dissociation de ces chromophores greffés sur des peptides de taille plus importante. La complexité de ces mécanismes sur des systèmes plus complexes nous oblige à sonder progressivement des molécules de complexité croissante jusqu'à atteindre la taille et la complexité structurale d'une protéine.

Un aspect important que nous nous sommes attachés à étudier dans cette thèse est la dynamique conformationnelle des peptides. Sur la base de travaux préliminaires dans le groupe montrant l'interconnexion entre transfert de proton intramoléculaire et dynamique conformationnelle, nous avons amélioré le dispositif d'étude pompe-sonde et mené une étude de grande ampleur sur une série de peptides de taille et composition variées. Nous avons ainsi pu identifier quelques grandes tendances, et en particulier observer que la formation d'une structure secondaire de type hélice sur des polyalanines de taille supérieure à 7 ralentissait considérablement la cinétique de transfert de proton. Les dispositifs expérimentaux mis en place ont permis de mesurer des dynamiques de transfert de charge photo-induits de peptides

modèles ($\sim 100 \mu\text{s}$). Nous avons déterminé que le transfert de proton intramoléculaire était dépendant de la taille et de la composition en acides aminés du peptide. Enfin nous avons pu révéler que la dynamique de transfert de proton est limitée par la dynamique conformationnelle du peptide. Ces études mettent naturellement en évidence l'intérêt d'un montage pompe-sonde couplé optique/mobilité ionique (que les circonstances sanitaires n'auront pas permis de compléter avant la fin de ces travaux).

Un des objectifs que nous nous étions fixé était de dépasser l'étude de systèmes modèles pour appliquer nos méthodes de physico-chimie à la caractérisation structurale de système biologiques pertinents pour lesquels se posent toujours des questions de régulation et contrôle de la conformation. Nous nous sommes intéressés au couple PUMA/Mcl-1 impliqué dans le processus d'apoptose des cellules de mammifère grâce à l'initiation de collaboration avec l'ICBMS et à la mobilité ionique. Nous avons constaté que la diversité du paysage conformationnel de PUMA en phase liquide, révélant sa nature désordonnée. Un des principaux challenge associés à cet objectif était le maniement d'outils et techniques associés à l'analyse par spectrométrie de masse d'échantillons pour la biologie structurale aidés par le contact étroit avec Florence Guillières de l'ISA. Ces travaux ont été l'occasion de généraliser l'usage du nanospray dans le laboratoire et ont permis d'initier une transition vers la spectrométrie de masse native. Ces approches seront développées davantage à l'avenir dans le groupe.

Bibliographie

- [1] Oliver C. Redfern, Benoit Dessailly, and Christine A. Orengo. Exploring the structure and function paradigm. *Structural Biology*, 18:394–402, 2008.
- [2] Kenji Sugase, H Jane Dyson, and Peter E. Wright. Mechanism of coupled folding and binding of an intrinsically disordered protein. *Nature*, 447(7147):1021–1025, 2007.
- [3] Peter Tompa. Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap. *Cell Press*, 37(12):509–516, 2012.
- [4] Rieko Ishima and Dennis A. Torchia. Protein dynamics from NMR. *Nature Structural Biology*, 7(9):740–743, 2000.
- [5] J. A. McCammon. Protein dynamics. *Reports on Progress in Physics*, 47(1):1–46, 1984.
- [6] Ullas V Pedmale, R Brandon Celaya, and Emmanuel Liscum. Phototropism: mechanism and outcomes. *American Society of Plant Biology*, pages 1–26, 2010.
- [7] Sean Crosson and Keith Moffat. Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: Insights into light-mediated signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(6):2995–3000, 2001.
- [8] John M. Christie, Michael Salomon, Kazunari Nozue, Masamitsu Wada, and Winslow R. Briggs. LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): Binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(15):8779–8783, 1999.
- [9] John M. Christie, Trevor E. Swartz, Roberto A. Bogomolni, and Winslow R. Briggs. Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *Plant Journal*, 32(2):205–219, 2002.
- [10] Trevor E. Swartz, Stephanie B. Corchnoy, John M. Christie, James W. Lewis, Istvan Szundi, Winslow R. Briggs, and Roberto A. Bogomolni. The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin. *Journal of Biological Chemistry*, 276(39):36493–36500, 2001.

BIBLIOGRAPHIE

- [11] Trevor E. Swartz, Phillip J. Wenzel, Stephanie B. Corchnoy, Winslow R. Briggs, and Roberto A. Bogomolni. Vibration spectroscopy reveals light-induced chromophore and protein structural changes in the LOV2 domain of the plant blue-light receptor phototropin 1. *Biochemistry*, 41(23):7183–7189, 2002.
- [12] Patrick E. Konold, Tilo Mathes, Jörn Weienborn, Marie Louise Groot, Peter Hege-
mann, and John T.M. Kennis. Unfolding of the C-Terminal J α Helix in the LOV2
photoreceptor domain observed by time-resolved vibrational spectroscopy. *Journal of
Physical Chemistry Letters*, 7(17):3472–3476, 2016.
- [13] André Remy and Klaus Gerwert. Coupling of light-induced electron transfer to proton
uptake in photosynthesis. *Nature Structural Biology*, 10(8):637–644, 2003.
- [14] Sergej Vasil’ev and Doug Bruce. A protein dynamics study of photosystem II: The
effects of protein conformation on reaction center function. *Biophysical Journal*,
90(9):3062–3073, 2006.
- [15] B. Rabenstein, G. M. Ullmann, and E. W. Knapp. Electron transfer between the qui-
nones in the photosynthetic reaction center and its coupling to conformational changes.
Biochemistry, 39(34):10487–10496, 2000.
- [16] Haiyu Wang, Su Lin, James P Allen, JoAnn C Williams, Sean Blankert, Christa Laser,
and Neal W Woodbury. Protein dynamics control the kinetics of initial electron transfer
in photosynthesis. *Science magazine*, 316(May):747–751, 2007.
- [17] M. S. Graige, G. Feher, and M. Y. Okamura. Conformational gating of the electron
transfer reaction $Q \cdot \text{AQB} \rightarrow \text{QAQB} \cdot$ in bacterial reaction centers of *Rhodobacter
sphaeroides* determined by a driving force assay. *Proceedings of the National Academy
of Sciences of the United States of America*, 95(20):11679–11684, 1998.
- [18] Brian M. Hoffman and Mark A. Ratner. Gated electron transfer: when are observed
rates controlled by conformational interconversion? *Journal of the American Chemical
Society*, 109(21):6237–6243, 1987.
- [19] Sergio T. Ferreira, Mychael V. Lourenco, Mauricio M. Oliveira, and Fernanda G. De
Felice. Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment
in Alzheimer’s disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(MAY):1–17, 2015.
- [20] Leonid Breydo, Dmitry Kurouski, Suhail Rasool, Saskia Milton, Jessica W. Wu, Vla-
dimir N. Uversky, Igor K. Lednev, and Charles G. Glabe. Structural differences bet-
ween amyloid beta oligomers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,
477(4):700–705, 2016.

-
- [21] Fabiana A. Caetano, Flavio H. Beraldo, Glaucia N.M. Hajj, Andre L. Guimaraes, Sofia Jürgensen, Ana Paula Wasilewska-Sampaio, Pedro H.F. Hirata, Ivana Souza, Cleiton F. MacHado, Daisy Y.L. Wong, Fernanda G. De Felice, Sergio T. Ferreira, Vania F. Prado, R. Jane Rylett, Vilma R. Martins, and Marco A.M. Prado. Amyloid-beta oligomers increase the localization of prion protein at the cell surface. *Journal of Neurochemistry*, 117(3):538–553, 2011.
- [22] Liping Yu, Rohinton Edalji, John E. Harlan, Thomas F. Holzman, Ana Pereda Lopez, Boris Labkovsky, Heinz Hillen, Stefan Barghorn, Ulrich Ebert, Paul L. Richardson, Laura Miesbauer, Larry Solomon, Diane Bartley, Karl Walter, Robert W. Johnson, Philip J. Hajduk, and Edward T. Olejniczak. Structural characterization of a soluble amyloid β -peptide oligomer. *Biochemistry*, 48(9):1870–1877, 2009.
- [23] Steven Daly, Alexander Kulesza, Frederic Poussiguet, Anne-Laure Simon, Chang Min Choi, Geoffrey Knight, Fabien Chirot, Luke Macaleese, Rodolphe Antoine Ab, and Philippe Dugourd. Conformational changes in amyloid-beta (12-28) alloforms studied using action-FRET, IMS and molecular dynamics simulations †. *Chemical Reviews*, 6:5040–5047, 2015.
- [24] Alexander Kulesza, Steven Daly, Chang Min Choi, Anne-Laure Simon, Fabien Chirot, Luke MacAleese, Rodolphe Antoine, and Philippe Dugourd. The structure of chromophore-grafted amyloid- β 12–28 dimers in the gas-phase: FRET-experiment guided modelling. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18(13):9061–9069, 2016.
- [25] Erik Portelius, Nenad Bogdanovic, Mikael K. Gustavsson, Inga Volkman, Gunnar Brinkmalm, Henrik Zetterberg, Bengt Winblad, and Kaj Blennow. Mass spectrometric characterization of brain amyloid beta isoform signatures in familial and sporadic Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathologica*, 120(2):185–193, 2010.
- [26] Ying Zhang, Don L. Rempel, Jun Zhang, Anuj K. Sharma, Liviu M. Mirica, and Michael L. Gross. Pulsed hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry probes conformational changes in amyloid beta ($A\beta$) peptide aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(36):14604–14609, 2013.
- [27] H. Mori, K. Takio, M. Ogawara, and D. J. Selkoe. Mass spectrometry of purified amyloid β protein in Alzheimer’s disease. *Journal of Biological Chemistry*, 267(24):17082–17086, 1992.
- [28] Kenjiro Ono, Margaret M. Condron, and David B. Teplow. Structure-neurotoxicity relationships of amyloid β -protein oligomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(35):14745–14750, 2009.

BIBLIOGRAPHIE

- [29] Rakez Kayed, Elizabeth Head, Jennifer L. Thompson, Theresa M. McIntire, Saskia C. Milton, Carl W. Cotman, and Charles G. Glabe. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, 300(5618):486–489, 2003.
- [30] Kathrin Breuker and Fred W McLafferty. Stepwise evolution of protein native structure with electrospray into the gas phase, 10¹² to 10² s. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(47):18145–18152, 2008.
- [31] D. Lemaire, G. Marie, L. Serani, and O. Lapr evote. Stabilization of gas-phase non-covalent macromolecular complexes in electrospray mass spectrometry using aqueous triethylammonium bicarbonate buffer. *Analytical Chemistry*, 73(8):1699–1706, 2001.
- [32] Albert J.R. Heck. Native mass spectrometry: A bridge between interactomics and structural biology. *Nature Methods*, 5(11):927–933, 2008.
- [33] Jian Liu, Teng Yi Huang, and Scott A. McLuckey. Top-down protein identification/-characterization of a priori unknown proteins via ion trap collision-induced dissociation and ion/ion reactions in a quadrupole/time-of-flight tandem mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, 81(4):1433–1441, 2009.
- [34] Adam A. Stokes, David J. Clarke, Stefan Weidt, Pat Langridge-Smith, and C. Logan Mackay. Top-down protein sequencing by CID and ECD using desorption electrospray ionisation (DESI) and high-field FTICR mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 289(1):54–57, 2010.
- [35] Yehia Mechref. Use of CID/ETD mass spectrometry to analyze glycopeptides. *Current Protocols in Protein Science*, 1(SUPPL.68):1–11, 2012.
- [36] Helen J. Cooper, Kristina H akansson, and Alan G. Marshall. The role of electron capture dissociation in biomolecular analysis. *Mass Spectrometry Reviews*, 24(2):201–222, 2005.
- [37] Jennifer S. Brodbelt. Photodissociation mass spectrometry: New tools for characterization of biological molecules. *Chemical Society Reviews*, 43(8):2757–2783, 2014.
- [38] B. E. Winger, K. J. Light-Wahl, A. L. Rockwood, and R. D. Smith. Probing Qualitative Conformation Differences of Multiply Protonated Gas-Phase Proteins via H/D Isotopic Exchange with D₂O. *Journal of the American Chemical Society*, 114(14):5897–5898, 1992.
- [39] Jaap Willem Back, Luitzen De Jong, Anton O. Muijsers, and Chris G. De Koster. Chemical cross-linking and mass spectrometry for protein structural modeling. *Journal of Molecular Biology*, 331(2):303–313, 2003.

- [40] Anne-Laure Simon, Fabien Chirot, Chang Min Choi, Christian Clavier, Marc Barbaire, Jacques Maurelli, Xavier Dagany, Luke MacAleese, and Philippe Dugourd. Tandem ion mobility spectrometry coupled to laser excitation. *Review of Scientific Instruments*, 86(9):1–11, 2015.
- [41] Salomé Poyer, Clothilde Comby-Zerbino, Chang Min Choi, Luke MacAleese, Claire Deo, Nicolas Bogliotti, Juan Xie, Jean-Yves Salpin, Philippe Dugourd, and Fabien Chirot. Conformational dynamics in ion mobility data. *Analytical Chemistry*, 89(7):4230–4237, 2017.
- [42] Francesco Lanucara, Stephen W. Holman, Christopher J. Gray, and Claire E. Eyers. The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics. *Nature Chemistry*, 6(4):281–294, 2014.
- [43] Shibdas Banerjee and Shyamalava Mazumdar. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2012:1–40, 2012.
- [44] Paul Kebarle and Liang Tang. From ions in Solution to Ions in the Gas Phase. *Analytical Chemistry*, 65(22):972–986, 1993.
- [45] Lord Rayleigh. XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 14(87):184–186, sep 1882.
- [46] Tim Meyer, Valérie Gabelica, Helmut Grubmüller, and Modesto Orozco. Proteins in the gas phase. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 3(4):408–425, 2013.
- [47] Lars Konermann, Elias Ahadi, Antony D Rodriguez, and Siavash Vahidi. Unraveling the mechanism of electrospray ionization. 85:2–9, 2013.
- [48] Matthias S. Wilm and Matthias Mann. Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole’s beam of macromolecules at last? *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 136:167–180, 1994.
- [49] Matthias S Wilm and Matthias Mann. Analytical properties of the nanoelectrospray Ion Source. *Analytical Biochemistry*, 68(1):1–9, 1996.
- [50] M. Karas, U. Bahr, and T. Dülcks. Nano-electrospray ionization mass spectrometry: addressing analytical problems beyond routine. *Fresenius’ Journal of Analytical Chemistry*, 366(6-7):669–676, 2000.

BIBLIOGRAPHIE

- [51] Haidy Metwally, Robert G. McAllister, and Lars Konermann. Exploring the mechanism of salt-induced signal suppression in protein electrospray mass spectrometry using experiments and molecular dynamics simulations. *Analytical Chemistry*, 87(4):2434–2442, 2015.
- [52] Thomas Kenderdine, Zijie Xia, Evan R Williams, and Daniele Fabris. Submicrometer Nanospray Emitters Provide New Insights into the Mechanism of Cation Adduction to Anionic Oligonucleotides. *Anal. Chem.*, 90:13541–13548, 2018.
- [53] R. Juraschek, T. Dülcks, and M. Karas. Nanoelectrospray - More than just a minimized-flow electrospray ionization source. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 10(4):300–308, 1999.
- [54] Tonya Pekar Second, Justin D. Blethrow, Jae C. Schwartz, Gennifer E. Merrihew, Michael J. MacCoss, Danielle L. Swaney, Jason D. Russell, Joshua J. Coon, and Vlad Zabrouskov. Dual-pressure linear ion trap mass spectrometer improving the analysis of complex protein mixtures. *Analytical Chemistry*, 81(18):7757–7765, 2009.
- [55] Scott A. McLuckey and Douglas E. Goeringer. Slow heating methods in tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 32(5):461–474, 1997.
- [56] Béla Paizs and Sándor Suhai. Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrometry Reviews*, 24(4):508–548, 2005.
- [57] Garegin A Papoian. Proteins with weakly funneled energy landscapes challenge the classical structure-function paradigm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(38):14237–14238, 2008.
- [58] Peter G Wolynes, Jose N Onuchic, and D Thirumalai. Navigating the Folding Routes. *Science*, 267:1619–1620, 1995.
- [59] M. W. Parker. Protein Structure from X-Ray Diffraction. *Journal of Biological Physics*, 29(4):341–362, 2003.
- [60] Vitali Tugarinov, Peter M. Hwang, and Lewis E. Kay. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of High-Molecular-Weight Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1):107–146, 2004.
- [61] Lewis E. Kay. NMR studies of protein structure and dynamics. *Journal of Magnetic Resonance*, 173(2):193–207, 2005.
- [62] Ian R. Kleckner and Mark P. Foster. An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1814(8):942–968, 2011.

-
- [63] Ewen Callaway. Revolutionary cryo-EM is taking over structural biology. *Nature*, 578(7794):201, 2020.
- [64] Martijn W.H. Pinkse, Claudia S. Maier, Jung In Kim, Byung Ha Oh, and Albert J.R. Heck. Macromolecular assembly of *Helicobacter pylori* urease investigated by mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 38(3):315–320, 2003.
- [65] Andrey Dyachenko, Guanbo Wang, Mike Belov, Alexander Makarov, Rob N De Jong, Ewald T J Van Den Bremer, Paul W H I Parren, and Albert J R Heck. Tandem Native Mass-Spectrometry on Antibody-Drug Conjugates and Submillion Da Antibody-Antigen Protein Assemblies on an Orbitrap EMR Equipped with a High-Mass Quadrupole Mass Selector. *Anal Chem*, 87:6095–6102, 2015.
- [66] Nadja B. Cech and C. G. Enke. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews*, 20(6):362–387, 2001.
- [67] Carolyn Q. Burdette and R. Kenneth Marcus. In-line desalting of proteins from buffer and synthetic urine solution prior to ESI-MS analysis via a capillary-channeled polymer fiber microcolumn. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 24(6):975–978, 2013.
- [68] Santosh Karki, Fengjian Shi, Jieutonne J Archer, Habiballah Sistani, and Robert J Levis. Direct Analysis of Proteins from Solutions with High Salt Concentration Using Laser Electrospray Mass Spectrometry ESI LEMS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*, 29:1002–1011, 2018.
- [69] Paul Kebarle and Udo H Vervek. Electrospray: From Ions in Solution to Ions in the Gas Phase, What we know now. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*, 28:898–917, 2009.
- [70] Lars Konermann. Addressing a Common Misconception: Ammonium Acetate as Neutral pH “Buffer” for Native Electrospray Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 28(9):1827–1835, 2017.
- [71] Henry E Revercomb and Edward A Mason. Theory of Plasma Chromatography Gaseous Electrophoresis - Review. *Anal Chem*, 47(7):970–983, 1975.
- [72] Brian C. Bohrer, Samuel I. Merenbloom, Stormy L. Koeniger, Amy E. Hilderbrand, and David E. Clemmer. Biomolecule Analysis by Ion Mobility Spectrometry. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 1(1):293–327, 2008.
- [73] Jennifer S. Brodbelt. Infrared Multiphoton Dissociation in Quadrupole Ion Traps. *Mass Spectrometry Reviews*, 28:390–424, 2009.

BIBLIOGRAPHIE

- [74] Rodolphe Antoine and Philippe Dugourd. Visible and ultraviolet spectroscopy of gas phase protein ions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13(37):16494–16509, 2011.
- [75] Jennifer S. Brodbelt. Ion Activation Methods for Peptides and Proteins. *Analytical Chemistry*, 88(1):30–51, 2016.
- [76] Corey N. Stedwell, Johan F. Galindo, Adrian E. Roitberg, and Nicolas C. Polfer. Structures of Biomolecular Ions in the Gas Phase Probed by Infrared Light Sources. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 6(1):267–285, 2013.
- [77] Rebecca A. Jockusch, Kolja Paech, and Evan R. Williams. Energetics from slow infrared multiphoton dissociation of biomolecules. *Journal of Physical Chemistry A*, 104(14):3188–3196, 2000.
- [78] Jared B. Shaw, Wenzong Li, Dustin D. Holden, Yan Zhang, Jens Griep-Raming, Ryan T. Fellers, Bryan P. Early, Paul M. Thomas, Neil L. Kelleher, and Jennifer S. Brodbelt. Complete protein characterization using top-down mass spectrometry and ultraviolet photodissociation. *Journal of the American Chemical Society*, 135(34):12646–12651, 2013.
- [79] Jeffrey J. Wilson and Jennifer S. Brodbelt. MS/MS simplification by 355 nm ultraviolet photodissociation of chromophore-derivatized peptides in a quadrupole ion trap. *Analytical Chemistry*, 79(20):7883–7892, 2007.
- [80] Julia R. Aponte, Lisa Vasicek, Jagannath Swaminathan, Hua Xu, Myong Chul Koag, Seongmin Lee, and Jennifer S. Brodbelt. Streamlining bottom-up protein identification based on selective ultraviolet photodissociation (UVPD) of chromophore-tagged histidine-and tyrosine-containing peptides. *Analytical Chemistry*, 86(13):6237–6244, 2014.
- [81] Marion Girod. Increasing specificity of tandem mass spectrometry by laser-induced dissociation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 33(S3):64–71, 2019.
- [82] Lény Garcia, Jérôme Lemoine, Philippe Dugourd, and Marion Girod. Fragmentation patterns of chromophore-tagged peptides in visible laser induced dissociation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 31(23):1985–1992, 2017.
- [83] Quentin Enjalbert, Romain Simon, Arnaud Salvador, Rodolphe Antoine, Sébastien Redon, Mehmet Menaf Ayhan, Florence Darbour, Stéphane Chambert, Yann Bretonnière, Philippe Dugourd, and Jérôme Lemoine. Photo-SRM: Laser-induced dissociation improves detection selectivity of selected reaction monitoring mode. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(22):3375–3381, 2011.

-
- [84] Andrea Hahn and Jürgen Grotemeyer. Fragmentation of chromophore labelled oligosaccharides induced by photodissociation with visible light. *Analytical Methods*, 5(2):503–507, 2013.
- [85] Steven Daly, Frédéric Poussiguet, Anne-Laure Simon, Luke MacAleese, Franck Bertorelle, Fabien Chirot, Rodolphe Antoine, and Philippe Dugourd. Action-FRET: Probing the Molecular Conformation of Mass-Selected Gas-Phase Peptides with Förster Resonance Energy Transfer Detected by Acceptor-Specific Fragmentation. *Analytical Chemistry*, 86(17):8798–8804, 2014.
- [86] Shimon Weiss. Fluorescence spectroscopy of single biomolecules. *Science*, 283(5408):1676–1683, 1999.
- [87] Ben N.G. Giepmans, Stephen R. Adams, Mark H. Ellisman, and Roger Y. Tsien. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science*, 312(5771):217–224, 2006.
- [88] Vladimir Frankevich, Vitaliy Chagovets, Fanny Widjaja, Konstantin Barylyuk, Zhiyi Yang, and Renato Zenobi. Fluorescence resonance energy transfer of gas-phase ions under ultra high vacuum and ambient conditions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(19):8911–8920, 2014.
- [89] Martin F. Czar, Franziska Zosel, Iwo König, Daniel Nettels, Bengt Wunderlich, Benjamin Schuler, Arash Zarrine-Afsar, and Rebecca A. Jockusch. Gas-Phase FRET Efficiency Measurements to Probe the Conformation of Mass-Selected Proteins. *Analytical Chemistry*, 87(15):7559–7565, 2015.
- [90] Francis O. Talbot, Anthony Rullo, Huihui Yao, and Rebecca A. Jockusch. Fluorescence resonance energy transfer in gaseous, mass-selected polyproline peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 132(45):16156–16164, 2010.
- [91] J. Matthew Hutchison, Robert J. Holiday, Andreas Bach, Shizuka Hsieh, and F. Fleming Crim. Action spectroscopy and photodissociation of vibrationally excited methanol. *Journal of Physical Chemistry A*, 108(39):8115–8118, 2004.
- [92] Mariana Beija, Carlos A.M. Afonso, and José M.G. Martinho. Synthesis and applications of rhodamine derivatives as fluorescent probes. *Chemical Society Reviews*, 38(8):2410–2433, 2009.
- [93] Andrey S. Klymchenko. Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications. *Accounts of Chemical Research*, 50(2):366–375, 2017.

BIBLIOGRAPHIE

- [94] Alexander Kulesza, Evgenii Titov, Steven Daly, Radosław Włodarczyk, Jörg Megow, Peter Saalfrank, Chang Min Choi, Luke MacAleese, Rodolphe Antoine, and Philippe Dugourd. Excited States of Xanthene Analogues: Photofragmentation and Calculations by CC2 and Time-Dependent Density Functional Theory. *ChemPhysChem*, pages 3129–3138, 2016.
- [95] Matthew W. Forbes and Rebecca A. Jockusch. Gas-phase fluorescence excitation and emission spectroscopy of three xanthene dyes (rhodamine 575, rhodamine 590 and rhodamine 6G) in a quadrupole ion trap mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 22(1):93–109, 2011.
- [96] Mathilde Bouakil, Alexander Kulesza, Steven Daly, Luke MacAleese, Rodolphe Antoine, and Philippe Dugourd. Visible Multiphoton Dissociation of Chromophore-Tagged Peptides. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 28(10):2181–2188, oct 2017.
- [97] Quentin Enjalbert, Marion Girod, Romain Simon, Jérémy Jeudy, Fabien Chirot, Arnaud Salvador, Rodolphe Antoine, Philippe Dugourd, and Jérôme Lemoine. Improved detection specificity for plasma proteins by targeting cysteine-containing peptides with photo-SRM. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(7):2321–2331, 2013.
- [98] Scott A. Robotham, Christien Kluwe, Joe R. Cannon, Andrew Ellington, and Jennifer S. Brodbelt. De novo sequencing of peptides using selective 351 nm ultraviolet photodissociation mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 85(20):9832–9838, 2013.
- [99] Steven Daly, Chang Min Choi, Fabien Chirot, Luke MacAleese, Rodolphe Antoine, and Philippe Dugourd. Action-Self Quenching: Dimer-Induced Fluorescence Quenching of Chromophores as a Probe for Biomolecular Structure. 89:4604–4610, 2017.
- [100] Antony Memboeuf, Andreas Nasioudis, Sergio Indelicato, Ferenc Pollreisz, Ákos Kuki, Sándor Kéki, Oscar F. Van Den Brink, Károly Vé Key, and László Drahos. Size effect on fragmentation in tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 82(6):2294–2302, 2010.
- [101] Alexander D. Osborne. Internal conversion in the rhodamine Dye, fast acid violet 2R. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*, 76:1638–1645, 1980.
- [102] F. Useli-Bacchitta, A. Bonnamy, G. Mulas, G. Mallocci, D. Toublanc, and C. Joblin. Visible photodissociation spectroscopy of PAH cations and derivatives in the PIRENEA experiment. *Chemical Physics*, 371(1-3):16–23, 2010.

-
- [103] Alexander D. Osborne and Amanda C. Winkworth. Viscosity-dependent internal conversion in an aryl-substituted rhodamine dye. *Chemical Physics Letters*, 85(5-6):513–517, 1982.
- [104] Colin J. Tredwell and Alexander D. Osborne. Viscosity dependent internal conversion in the rhodamine dye, fast acid violet 2R. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*, 76:1627–1637, 1980.
- [105] Jeng Da Chai and Martin Head-Gordon. Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10(44):6615–6620, 2008.
- [106] Florian Weigend and Reinhart Ahlrichs. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 7(18):3297–3305, 2005.
- [107] Marco Caricato, Michael J Frisch, Aeleen Frisch, Joanne Hiscocks, and Michael J Frisch. *Gaussian 09 IOps reference manual*. 2009.
- [108] Jefferson Chan, Sheel C. Dodani, and Christopher J. Chang. Reaction-based small-molecule fluorescent probes for chemoselective bioimaging. *Nature Chemistry*, 4(12):973–984, 2012.
- [109] Kuljit Kaur, Rajnish Saini, Ashwani Kumar, Vijay Luxami, Navneet Kaur, Prabhpreet Singh, and Subodh Kumar. Chemodosimeters: An approach for detection and estimation of biologically and medically relevant metal ions, anions and thiols. *Coordination Chemistry Reviews*, 256(17-18):1992–2028, 2012.
- [110] Lin Yuan, Weiyang Lin, Kaibo Zheng, and Sasa Zhu. FRET-based small-molecule fluorescent probes: Rational design and bioimaging applications. *Accounts of Chemical Research*, 46(7):1462–1473, 2013.
- [111] Indrajit Ghosh, Leyre Marzo, Amrita Das, Rizwan Shaikh, and Burkhard König. Visible Light Mediated Photoredox Catalytic Arylation Reactions. *Accounts of Chemical Research*, 49(8):1566–1577, 2016.
- [112] St Becker, I. Gregor, and E. Thiel. Photoreactions of rhodamine dyes in basic solvents. *Chemical Physics Letters*, 283(5-6):350–356, 1998.
- [113] Jean François Greisch, Michael E. Harding, Mattias Kordel, Wim Klopper, Manfred M. Kappes, and Detlef Schooss. Intrinsic fluorescence properties of rhodamine cations in gas-phase: Triplet lifetimes and dispersed fluorescence spectra. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(21):8162–8170, 2013.

BIBLIOGRAPHIE

- [114] Mattias Kordel, Detlef Schooss, Christian Neiss, Lars Walter, and Manfred M. Kappes. Laser-induced fluorescence of rhodamine 6G cations in the gas phase: A lower bound to the lifetime of the first triplet state. *Journal of Physical Chemistry A*, 114(17):5509–5514, 2010.
- [115] A. K. Chibisov and T. D. Slavnova. The study of the photophysics and primary photochemistry of rhodamine 6G aggregates. *Journal of Photochemistry*, 8(4):285–297, 1978.
- [116] A. Dunne and M. F. Quinn. Triplet-triplet absorption spectra and the spectra of the photoreduced states of Rhodamine B and Rhodamine 110. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*, 73:1104–1110, 1977.
- [117] Jonathan Peters, Martin Clemen, and Jürgen Grotemeyer. Fragmentation of deuterated rhodamine B derivatives by laser and collisional activation in an FT-ICR mass spectrometer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(22):7061–7069, 2013.
- [118] Christopher K. Barlow, Adam Wright, Christopher J. Easton, and Richard A.J. O’Hair. Gas-phase ion-molecule reactions using regioselectively generated radical cations to model oxidative damage and probe radical sites in peptides. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 9(10):3733–3745, 2011.
- [119] R. G. Cooks, D. Zhang, K. J. Koch, F. C. Gozzo, and M. N. Eberlin. Chiroselective self-directed octamerization of serine: Implications for homochirogenesis. *Analytical Chemistry*, 73(15):3646–3655, 2001.
- [120] Timothy Su and Michael T. Bowers. Ion-polar molecule collisions: the effect of ion size on ion-polar molecule rate constants; the parameterization of the average-dipole-orientation theory. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, 12(4):347–356, 1973.
- [121] P. G. Ashmore, M. G. Burnett, and B. J. Tyler. Reaction of nitric oxide and oxygen. *Transactions of the Faraday Society*, 58(1):685–691, 1962.
- [122] Oleg B. Gadzhiev, Stanislav K. Ignatov, Shrubha Gangopadhyay, Artëm E. Masunov, and Alexander I. Petrov. Mechanism of nitric oxide oxidation reaction ($2\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{NO}_2$) revisited. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7(7):2021–2024, 2011.
- [123] Christopher J. Carrell, Huamin Zhang, William A. Cramer, and Janet L. Smith. Biological identity and diversity in photosynthesis and respiration: Structure of the lumen-side domain of the chloroplast Rieske protein. *Structure*, 5(12):1613–1625, 1997.

- [124] Friedhelm Schneider. Histidine in Enzyme Active Centers. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 17(8):583–592, 1978.
- [125] Sharon Hammes-Schiffer. Proton-Coupled Electron Transfer: Moving Together and Charging Forward. *Journal of the American Chemical Society*, 137:8860–8871, 2015.
- [126] Luke MacAleese, Sylvain Hermelin, Krystel El Hage, Pierre Chouzenoux, Alexander Kulesza, Rodolphe Antoine, Luigi Bonacina, Markus Meuwly, Jean Pierre Wolf, and Philippe Dugourd. Sequential Proton Coupled Electron Transfer (PCET): Dynamics Observed over 8 Orders of Magnitude in Time. *Journal of the American Chemical Society*, 138(13):4401–4407, 2016.
- [127] David R Weinberg, Christopher J Gagliardi, Jonathan F Hull, Christine Fecenko Murphy, Caleb A Kent, Brittany C Westlake, Amit Paul, Daniel H Ess, † Dewey, Granville Mccafferty, and Thomas J Meyer. Proton-Coupled Electron Transfer. *American Chemical Society*, 112:4016–4093, 2012.
- [128] Bruno Bellina, Isabelle Compagnon, Sarah Houver, Philippe Maître, Abdul Rahman Allouche, Rodolphe Antoine, and Philippe Dugourd. Spectroscopic signatures of peptides containing tryptophan radical cations. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50(48):11430–11432, 2011.
- [129] Martin Byrdin, Sandrine Villette, Agathe Espagne, Andre P M Eker, and Klaus Brettel. Polarized Transient Absorption To Resolve Electron Transfer between Tryptophans in DNA Photolyase. *Journal of Physical Chemistry B*, 112:6866–6871, 2008.
- [130] Chi-Kit Siu, Yuyong Ke, Galina Orlova, Alan C Hopkinson, and K W Michael Siu. Dissociation of the N-C Bond and Competitive Formation of the $[z\ n\text{-H}]^{\bullet+}$ and $[c\ n\ 2\text{H}]^+$ Product Ions in Radical Peptide Ions Containing Tyrosine and Tryptophan: The Influence of Proton Affinities on Product Formation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19:1799–1807, 2008.
- [131] Laure Joly, Rodolphe Antoine, Abdul-Rahman Allouche, and Philippe Dugourd. Formation and Spectroscopy of a Tryptophan Radical Containing Peptide in the Gas Phase. *J. AM. CHEM. SOC.*, 130:8, 2008.
- [132] Claire Brunet, Rodolphe Antoine, Abdul Rahman Allouche, Philippe Dugourd, Francis Canon, Alexandre Giuliani, and Laurent Nahon. Gas phase photo-formation and vacuum UV photofragmentation spectroscopy of tryptophan and tyrosine radical-containing peptides. *Journal of Physical Chemistry A*, 115(32):8933–8939, 2011.
- [133] Vicky W.M. Lee, Hongbo Li, Tai Chu Lau, Roger Guevremont, and K W Michael Siu. Relative silver(I) ion binding energies of α -amino acids: A determination by means of

BIBLIOGRAPHIE

- the kinetic method. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 9(8):760–766, 1998.
- [134] Bruno Bellina, Isabelle Compagnon, Luke Macaleese, Fabien Chirot, Jérôme Lemoine, Philippe Maître, Michel Broyer, Rodolphe Antoine, Alexander Kulesza, Roland Mitrić Mitrić, Vlasta Bonacić - Koutecký, and Philippe Dugourd. Binding motifs of silver in prion octarepeat model peptides: a joint ion mobility, IR and UV spectroscopies, and theoretical approach. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 14:11433–11440, 2012.
- [135] Andrey A. Buglak, Ruslan R. Ramazanov, and Alexei I. Kononov. Silver cluster–amino acid interactions: a quantum-chemical study. *Amino Acids*, 51(5):855–864, 2019.
- [136] C. Nick Pace and J. Martin Scholtz. A Helix Propensity Scale Based on Experimental Studies of Peptides and Proteins. *Biophysical Journal*, 75(1):422–427, 1998.
- [137] R. R. Hudgins, M. A. Ratner, and Martin F Jarrold. Design of helices that are stable in vacuo [10]. *Journal of the American Chemical Society*, 120(49):12974–12975, 1998.
- [138] David T Kaleta and Martin F Jarrold. Disrupting Helix Formation in Unsolvated Peptides. *Journal of Physical Chemistry B*, 105:4436–4440, 2001.
- [139] Robert R Hudgins and Martin F Jarrold. Helix Formation in Unsolvated Alanine-Based Peptides: Helical Monomers and Helical Dimers. *Journal of the American Chemical Society*, 121:3494–3501, 1999.
- [140] Brian S Kinnear, David T Kaleta, Motoya Kohtani, Robert R Hudgins, Martin F Jarrold, Ac-Val Lys, Val Gly-Gly-Val, Val -L Pro-Gly-Val, Val -D Pro-Gly-Val, and Ac-Val Gly-Lys-Val. Conformations of Unsolvated Valine-Based Peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 122:9243–9256, 2000.
- [141] S. M. Harper. Structural Basis of a Phototropin Light Switch. *Science*, 301(5639):1541–1544, 2003.
- [142] Jacquelyn S Fetrow and Jeffrey Skolnick. Method for Prediction of Protein Function from Sequence using the Sequence-to-Structure-to-Function Paradigm with Application to Glutaredoxins/ Thioredoxins and T 1 Ribonucleases. *Journal of Molecular Biology*, 281:949–968, 1998.
- [143] Vladimir N. Uversky and A. Keith Dunker. Understanding protein non-folding. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1804(6):1231–1264, 2010.
- [144] Vladimir N Uversky. Unusual biophysics of intrinsically disordered proteins. *biochimica et biophysica acta*, 1834:932–951, 2013.

-
- [145] Peter E Wright and H Jane Dyson. Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nature Reviews*, 16:18–29, 2015.
- [146] Lilia M. Iakoucheva, Celeste J. Brown, J. David Lawson, Zoran Obradović, and A. Keith Dunker. Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins. *Journal of Molecular Biology*, 323(3):573–584, 2002.
- [147] Agnes Tantos, Kyou Hoon Han, and Peter Tompa. Intrinsic disorder in cell signaling and gene transcription. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 348(2):457–465, 2012.
- [148] M. Madan Babu, Robin van der Lee, Natalia Sanchez de Groot, and Jörg Gsponer. Intrinsically disordered proteins: Regulation and disease. *Current Opinion in Structural Biology*, 21(3):432–440, 2011.
- [149] Vladimir N Uversky, Christopher J Oldfield, and A. Keith Dunker. Intrinsically Disordered Proteins in Human Diseases: Introducing the D 2 Concept. *Annual Review of Biophysics*, 37:215–246, 2008.
- [150] Vladimir N Uversky, Vrushank Dave, Lilia M Iakoucheva, Prerna Malaney, Steven J Metallo, Ravi Ramesh Pathak, and Andreas C Joerger. Pathological Unfoldomics of Uncontrolled Chaos: Intrinsically Disordered Proteins and Human Diseases. *Chemical Reviews*, 114:6844–6879, 2014.
- [151] Peter E Wright and H Jane Dyson. Intrinsically Unstructured Proteins: Re-assessing the Protein Structure-Function Paradigm. *Journal of Molecular Biology*, 293:321–331, 1999.
- [152] Peter E Wright, Jane Dyson, Alan Fersht, and Valerie Daggett. Linking folding and binding This review comes from a themed issue on Folding and Binding Edited. *Structural Biology*, 19:31–38, 2009.
- [153] Christopher J Oldfield and A. Keith Dunker. Intrinsically Disordered Proteins and Intrinsically Disordered Protein Regions. *Annual Review of Biochemistry*, 83:553–584, 2014.
- [154] L. Michel Espinoza-Fonseca. Reconciling binding mechanisms of intrinsically disordered proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 382(3):479–482, 2009.
- [155] Yongqi Huang and Zhirong Liu. Kinetic Advantage of Intrinsically Disordered Proteins in Coupled Folding-Binding Process: A Critical Assessment of the "Fly-Casting" Mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 393(5):1143–1159, 2009.

BIBLIOGRAPHIE

- [156] Mark F van Delft and David Huang. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Research*, 16(2):203–213, 2006.
- [157] Gilles J P Rautureau, Catherine L Day, and Mark G Hinds. Intrinsically Disordered Proteins in Bcl-2 Regulated Apoptosis. *Int. J. Mol. Sci*, 11:1808–1824, 2010.
- [158] Tomomi Kuwana, Lisa Bouchier-Hayes, Jerry E. Chipuk, Christine Bonzon, Barbara A. Sullivan, Douglas R. Green, and Donald D. Newmeyer. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Molecular Cell*, 17(4):525–535, 2005.
- [159] Luke W. Thomas, Connie Lam, and Steven W Edwards. Mcl-1; the molecular regulation of protein function, jul 2010.
- [160] Jorg Michels, Peter W.M. Johnson, and Graham Packham. Mcl-1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(2):267–271, 2005.
- [161] Joseph M. Rogers, V. Oleinikovas, S. L. Shamma, C. T. Wong, D. De Sancho, C. M. Baker, and Jane Clarke. Interplay between partner and ligand facilitates the folding and binding of an intrinsically disordered protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(43):15420–15425, 2014.
- [162] Catherine L Day, Callum Smits, F. Cindy Fan, Erinna F. Lee, W. Douglas Fairlie, and Mark G Hinds. Structure of the BH3 Domains from the p53-Inducible BH3-Only Proteins Noxa and Puma in Complex with Mcl-1. *Journal of Molecular Biology*, 380(5):958–971, 2008.
- [163] Joseph M. Rogers, Annette Steward, and Jane Clarke. Folding and binding of an intrinsically disordered protein: Fast, but not 'diffusion-limited'. *Journal of the American Chemical Society*, 135(4):1415–1422, 2013.
- [164] M. G. Hinds, C. Smits, R. Fredericks-Short, J. M. Risk, M. Bailey, D. C.S. Huang, and C. L. Day. Bim, Bad and Bmf: Intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets. *Cell Death and Differentiation*, 14(1):128–136, 2007.
- [165] Joseph M. Rogers, Chi T. Wong, and Jane Clarke. Coupled folding and binding of the disordered protein PUMA does not require particular residual structure. *Journal of the American Chemical Society*, 136(14):5197–5200, 2014.
- [166] L.Zhang J.Tong, P.Wang, S.Shuai, D.Chen, Z.Nikolovska-Coleska, F.Zou, J.Yu. Mcl-1 Degradation Is Required for Targeted Therapeutics to Eradicate Colon Cancer Cells. *American Association for Cancer*, 77:2512–2521, 2017.

-
- [167] Jiyuan Liu, Zhen Tian, Nan Zhou, Xueying Liu, Chenyi Liao, Beilei Lei, Jianing Li, Shengyong Zhang, and Hui Chen. Targeting the apoptotic Mcl-1-PUMA interface with a dual-acting compound. Technical Report 33, 2017.
- [168] Dale Stuchfield and Perdita E. Barran. Unique insights to intrinsically disordered proteins provided by ion mobility mass spectrometry. *Current Opinion in Chemical Biology*, 42:177–185, 2018.
- [169] T. W. Knapman, N. M. Valette, S. L. Warriner, and A. E. Ashcroft. Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry of Intrinsically Unfolded Proteins: Trying to Put Order into Disorder. *Current Analytical Chemistry*, 9(2):181–191, 2013.
- [170] Kazumi Saikusa, Naoyuki Kuwabara, Yuichi Kokabu, Yu Inoue, Mamoru Sato, Hiroshi Iwasaki, Toshiyuki Shimizu, Mitsunori Ikeguchi, and Satoko Akashi. Characterisation of an intrinsically disordered protein complex of Swi5-Sfr1 by ion mobility mass spectrometry and small-angle X-ray scattering. *Analyst*, 138(5):1441–1449, 2013.
- [171] Sharon M Kelly, Thomas J Jess, and Nicholas C Price. How to study proteins by circular dichroism. *biochimica et biophysica acta*, 1751:119–139, 2005.
- [172] W. Curtis Johnson. Protein secondary structure and circular dichroism: A practical guide. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 7(3):205–214, 1990.
- [173] Kannika Thongkhao, Frank D. Sönnichsen, Sunee Nitisinprasert, and Kiattawee Choo-wongkomon. Structural characterization and mode of action studies on Salvicin K and antimicrobial peptide-like bacteriocin β peptide isolated from *Lactobacillus salivarius* K4. *Chiang Mai Journal of Science*, 45(2):731–745, 2018.
- [174] Jeffrey K Myers, ', C Nick Pace, and J. M. Scholtz. Trifluoroethanol effects on helix propensity and electrostatic interactions in the helical peptide from ribonuclease T1. Technical report, 1998.
- [175] Theodore T Herskovits, Helen Jaillet, and Barbara Gadegbeku. MACROMOLECULES : On the Structural Stability Denaturation of Proteins and. *The Journal of Biological Chemistry*, 245(10):2588–2598, 1970.
- [176] Monica Sundd, Suman Kundu, and Medicherla V. Jagannadham. Alcohol-induced conformational transitions in ervatamin C. An α -helix to β -Sheet switchover. *Journal of Protein Chemistry*, 19(3):169–176, 2000.
- [177] Jonathan P.L. Cox, Philip A. Evans, Leonard C. Packman, Dudley H. Williams, and Derek N. Woolfson. Dissecting the structure of a partially folded protein: Circular dichroism and nuclear magnetic resonance studies of peptides from ubiquitin. *Journal of Molecular Biology*, 234(2):483–492, 1993.

BIBLIOGRAPHIE

- [178] Narasimha Sreerama and Robert W Woody. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. *Analytical Biochemistry*, 287:251–260, 2000.
- [179] Dale Stuchfield, Aidan P. France, Lukasz G. Migas, Anja Thalhammer, Anne Bremer, Bruno Bellina, and Perdita E. Barran. *The Use of Mass Spectrometry to Examine IDPs: Unique Insights and Caveats*, volume 611. Elsevier Inc., 1 edition, 2018.
- [180] Hannes Fischer, Igor Polikarpov, and Aldo F. Craievich. Average protein density is a molecular-weight-dependent function. *Protein Science*, 13(10):2825–2828, 2004.
- [181] Nicholas A. Pierson, Stephen J. Valentine, and David E. Clemmer. Evidence for a Quasi-Equilibrium Distribution of States for Bradykinin $[M + 3H]^{3+}$ Ions in the Gas Phase. *Journal of Physical Chemistry B*, 114(23):7777–7783, 2010.
- [182] John R. Couchman. Transmembrane Signaling Proteoglycans. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 26(1):89–114, 2010.
- [183] John R. Couchman. Syndecans: Proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(12):926–937, 2003.
- [184] Tünde Szatmári and Katalin Dobra. The role of syndecan-1 in cellular signaling and its effects on heparan sulfate biosynthesis in mesenchymal tumors. *Frontiers in Oncology*, 3 DEC(December):1–11, 2013.
- [185] Yvonne Hui Fang Teng, Rafael S. Aquino, and Pyong Woo Park. Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biology*, 31(1):3–16, 2012.
- [186] Tünde Szatmári, Rita Ötvös, Anders Hjerpe, and Katalin Dobra. Syndecan-1 in Cancer: Implications for Cell Signaling, Differentiation, and Prognostication. *Disease Markers*, 2015:13, 2015.
- [187] Frank Gondelaud and Sylvie Ricard-Blum. Structures and interactions of syndecans. *FEBS Journal*, 286(15):2994–3007, 2019.
- [188] Rebecca Beveridge, Lukasz G Migas, Rahul K Das, Rohit V Pappu, Richard W Kriwacki, and Perdita E. Barran. Ion Mobility Mass Spectrometry Uncovers the Impact of the Patterning of Oppositely Charged Residues on the Conformational Distributions of Intrinsically Disordered Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 141:4908–4918, 2019.
- [189] Juan Fernandez De La Mora, Gary J. Van Berkel, Christie G. Enke, Richard B. Cole, Manuel Martinez-Sanchez, and John B. Fenn. Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 35(8):939–952, 2000.

Liste des publications

1. **M. Bouakil**, A. Kulesza, S. Daly, L. MacAleese, R. Antoine, P. Dugourd, "Visible multiphoton dissociation of chromophore-tagged peptides", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2017**, 38, 2181-2188, doi: [10.1007/s13361-017-1733-9](https://doi.org/10.1007/s13361-017-1733-9).
2. M. Lalande, C. Comby-Zerbino, **M. Bouakil**, P. Dugourd, F. Chirot, J-C. Pouilly "Isolated collagen mimetic peptide assemblies have stable triple- helix structures", *Physical Review B, Chemistry a European Journal Communication*, **2018**, 24, 13728-13733, doi: [10.1002/chem.201802929](https://doi.org/10.1002/chem.201802929).
3. **M. Bouakil**, F. Chirot, M. Girod, P. Dugourd, L. MacAleese, "Secondary structure effects on internal proton transfer in poly-peptides", *Structural Dynamics*, **2020**, 7, doi: [10.1063/4.0000003](https://doi.org/10.1063/4.0000003).

Résumés

Étude de la conformation et de la dynamique conformationnelle de molécules biologiques en phase gazeuse.

Les protéines sont des molécules dont la structure est liée à leur fonction dans les organismes vivants. Cette thèse porte sur la caractérisation de ces structures et de leur dynamique et s'inscrit dans le développement de l'analyse par spectrométrie de masse en biologie structurale. La spectrométrie de masse couplée à des techniques de spectroscopie optique résolue en temps permet de mettre en lumière les mécanismes d'absorption, de relaxation et de transfert de charges photo-induits impliqués dans la dynamique conformationnelle et électronique de ces molécules biologiques. Ces approches expérimentales avec la combinaison de techniques de biologie moléculaire (expression, gel électrophorèse, dichroïsme circulaire, etc.) sont présentées en début de manuscrit. C'est par l'étude de l'activation photo-induite de chromophores utilisés pour l'analyse de la structure de protéines qu'a commencé ce travail de thèse. Les mécanismes d'absorption de photons et de relaxation non radiative de chromophores greffés sur des peptides ont été sondés. Nous avons ensuite sondé les mécanismes de transferts de charges photo-induits au sein de petits peptides afin de comprendre l'influence de la taille de ces systèmes et de la composition en acides aminés sur la dynamique conformationnelle de ces peptides. Ceci a nécessité le montage d'un dispositif pompe-sonde pour l'étude de la dynamique de transfert de charge. Enfin nous nous sommes intéressés à un processus de changement de conformation du peptide PUMA, présent dans les organismes de mammifères et impliqué dans la régulation de l'apoptose, en utilisant la spectrométrie de mobilité ionique comme sonde de conformation et de dynamique structurale.

Mots clés: Spectrométrie de masse, mobilité ionique, peptides, protéines, structure, conformation, couplage, laser.

Gaz phase Conformation and conformational dynamics of biological molecules

Protein functions in living organism are governed by their 3D structure. This thesis focuses on the characterization of protein conformation and conformational dynamics by means of mass spectrometry, and participates to the development of tools for structural biology. Mass spectrometry coupled to time resolved optical spectroscopy can set light on mechanisms associated with conformational dynamics: photon absorption, electronic relaxation, photo-induced charge transfer, etc. Experimental approaches combining mass spectrometry, optics and molecular biology (protein expression, gel electrophoresis, circular dichroism, etc.) will be presented in the first section of this manuscript. This thesis work was initiated by the study of the photo-induced activation of the chromophores which were used, at ILM, for action-FRET and more generally for the exploration of the proteins structure. The mechanisms of photon absorption and non-radiative relaxation were studied for chromophores grafted on multiple peptides. We then probed the photo-induced intramolecular charge transfer and associated conformational dynamics in series of small peptides in order to understand the influence of the system size and composition on its structural dynamics. The latter experiment required the implementation of a two-color pump-probe setup. Finally, we used ion mobility spectrometry to probe and investigate the conformational space and dynamics of the PUMA peptide, ubiquitous in mammalian organisms and associated to the regulation of apoptosis.

Keywords: Mass spectrometry, ion mobility, peptides, proteins, structure, conformation, coupling, laser.