



HAL
open science

Dynamique de relaxation des états excités de molécules d'intérêt biologiques

Jordan Dezalay

► **To cite this version:**

Jordan Dezalay. Dynamique de relaxation des états excités de molécules d'intérêt biologiques. Chimie théorique et/ou physique. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT: 2022UPASF010. tel-03643344

HAL Id: tel-03643344

<https://theses.hal.science/tel-03643344v1>

Submitted on 15 Apr 2022

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.

Dynamique de relaxation des états excités de molécules d'intérêt biologiques

*Excited States Relaxation dynamics of molecules of
biological interest*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

Ecole doctorale n°571 : sciences chimiques : molécules, matériaux,
instrumentation et biosystèmes (2MIB)

Spécialité de doctorat : Chimie

Graduate School : Chimie, Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **ISMO (Université Paris-Saclay,
CNRS)** sous la direction de
Satchin SOORKIA, maître de conférences

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 15 février 2022, par

Jordan Dezalay

Composition du jury

Séverine BOYE-PERONNE Professeure des Universités, Université Paris-Saclay	Présidente
Lahouari KRIM Professeur des Universités, Sorbonne Université	Rapporteur & Examineur
Joëlle MASCETTI Directrice de Recherche, Université de Bordeaux 1	Rapporteuse & Examinatrice
Jennifer NOBLE Chargée de Recherche, Aix-Marseille Université	Examinatrice
Luke MAC ALEESE Chargé de Recherche, Université Claude Bernard Lyon 1	Examineur
Satchin SOORKIA Maître de Conférence, Université Paris-Saclay	Directeur de thèse

Titre : Dynamique de relaxation des états excités de molécules d'intérêts biologiques

Mots clés : dynamique des états excités, photofragmentation, piège à ions cryogénique, pompe-sonde, spectroscopie laser

Résumé : Cette thèse porte sur l'étude des mécanismes de désexcitation des bases de l'ADN protonées et hydratées à la suite de l'absorption d'un photon UV. Le premier objectif porte sur la caractérisation des processus de relaxation en contrôlant l'énergie d'excitation déposée dans la molécule. Des expériences de spectroscopie de photodissociation et de pompe-sonde multi-échelle ont été réalisées dans un piège de Paul refroidie à 10 K. Nous avons pu montrer le rôle des états à longue durée de vie tels que des états à transfert de charge et des états triplets dans le processus de relaxation. Le deuxième objectif porte sur la caractérisation des effets d'environnement sur les processus de relaxation des bases de l'ADN hydratées. Nous avons effectué non seulement des expériences de photodissociation infrarouge mais aussi des expériences à deux couleurs, infrarouge et UV, qui permettent d'atteindre une sélectivité conformationnelle. L'attribution des spectres IR et UV repose sur des calculs *ab initio* que nous avons effectués.

Title : Excited states relaxation dynamics of molecules of biological interest

Keywords : excited states dynamics, photofragmentation, cryogenic ion trap, pump-probe, laser spectroscopy

Abstract : This thesis focuses on the study of deactivation mechanisms in protonated and hydrated DNA bases following the absorption of a UV photon. The first objective concerns the characterization of relaxation processes by controlling the excitation energy deposited in the molecule. Photodissociation spectroscopy and multiscale pump-probe experiments were carried out in a Paul trap cooled at 10 K. We have demonstrated the role of long lived states such as charge transfer states and triplet states on the relaxation processes. The second objective concerns the characterization of the environmental effects on the relaxation processes of hydrated DNA bases. To characterize the hydrated structures in the Paul trap, we carried out not only infrared photodissociation experiments but also two-color experiments, infrared and UV, which make it possible to achieve conformational selectivity. The assignment of IR and UV spectra is based on *ab-initio* calculations that we performed.

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mes parents et ma soeur pour m'avoir soutenu tout au long de mes études et pendant la thèse.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse Satchin Soorkia, qui m'a permis de m'épanouir dans ce projet passionnant. J'ai beaucoup appris à ses cotés, il m'a notamment guider à travers le métier d'enseignant. Sa patience et son calme ont été des ressources importantes pour mieux canaliser mon anxiété.

Merci à Michel pour toute ces conversations animées en salle café qui m'ont permis de voire le monde sous un nouvel angle. Merci pour son encadrement et ses réponses à mes nombreuses interrogations. J'ai essayé au maximum d'apprendre au près du "vieux Sage", et peut être qu'un jour je participerais à une de ses célèbres séances de Tai Chi.

Merci à Gilles pour les nombreuse connaissances expérimentales qu'il m'a apporté sur des domaines que je ne maitrisais pas du tout, il m'a aussi beaucoup appris pour essayé de pousser les raisonnements jusqu'à leurs limites. Merci à tous les trois pour cette aventure humaine et scientifique qu'a été cette thèse et merci pour votre soutien dans les moments difficiles qui fort heureusement ont été assez rares.

Un grand merci aux membres de l'équipe Sysiphe/équipe D pour leur accueil, leur gentillesse et leur soutient au cours de ces quatre années. Une petite mention spécial à Pierre, Niloufar et Benoit pour les nombreuses visites et discussions dans le "bureau visiteur" du premier étage, qui ont toujours été très agréables.

Je remercie bien évidemment tous les doctorants que j'ai côtoyer au cours de ces quatre années en commençant par les anciens Oliver, Adrien, Pierre, Delphine (grande partenaire de procrastination!) et Ozan (Grand maitre Jedi) qui ont permis de former un groupe soudé avec Jeffrey et Rémi. A ce groupe ce sont rajoutés Olivia (mes félicitations au Chef!), Jennifer (autre grande partenaire de procrastination et dernière doctorante de l'équipe D) et Charles. Je remercie également Ning, Lancelot, Laurent et Loïse avec qui j'ai certes partagé moins de temps mais dont j'ai apprécié chaque instant à vos cotés.

Je ne pourrait écrire ces remerciement sans mentionner la team sucrée formé de Pauline et d'Abigail alias Bibiche sans qui cette thèse n'aurait pas eu la même saveur. Merci pour toutes ces après-midi goûter et shopping.

Je tiens à remercier également mes camarades du magistère de physico-chimie moléculaire Yann, JB (aussi collègue de thèse) Meije, Mathilde et Anthony pour toute ces soirées aux thématiques cidre, bières, Marvel (ou DC), jeux de sociétés et MarioKart!

Je remercie également tous les collègues d'enseignements en particulier Nathalie, Lionel, Valeria, Isabelle, Erika, Rachel, Minh, pour l'excellente ambiance de travail, pour tous ce qu'ils m'ont apporté pédagogiquement et pour m'avoir fait découvrir l'autre côté du bureau.

Enfin je souhaite remercier le CAO Badminton pour m'avoir permis de pratiquer, avec convivialité, ma passion et de progresser tout au long de ces 4 années. Merci également aux chèvres du Kraken sur le jeux SWTOR sans qui le confinement dû à la pandémie du COVID-19 auraient été beaucoup plus difficile à supporter.

Table des matières

1	Introduction	11
1.1	Généralités	11
1.2	Etat de l'art	14
1.2.1	Mesures de durées de vie des bases de l'ADN/ARN en solution	15
1.2.2	Spectroscopie électronique des bases de l'ADN/ARN neutres	15
1.2.3	Dynamique de relaxation dans les bases neutres de l'ADN/ARN	17
1.2.4	Durées de vie - mesures expérimentales et simulations	22
1.2.5	Bases de l'ADN/ARN protonées	24
1.2.6	Effets d'environnement	25
1.3	Problématique	30
2	Dispositif Experimental	33
2.1	Schéma général	33
2.2	Production d'espèces protonées	35
2.2.1	Principe de l'électrospray	35
2.2.2	Source d'ions développée à Aarhus	37
2.2.3	Electrodes pulsées	37
2.3	Eléments d'optique ionique	38
2.4	Piège à ions quadripolaire	38
2.5	Sélection en masse	43
2.5.1	Porte de masse	43
2.5.2	Excitation des ions piégés par une tension radiofréquence auxiliaire	44
2.6	Spectrométrie de masse par temps de vol	44
2.7	Description des lasers	47
2.8	Synchronisation	48

2.9	Piège linéaire octopolaire refroidi à l'azote liquide	52
2.9.1	Double piégeage des ions	53
2.9.2	Modifications de la séquence impulsionnelle	54
2.9.3	Premiers complexes formés dans l'octopôle refroidi	54
3	Techniques et Méthodes	57
3.1	Spectroscopie de Photodissociation UV	57
3.2	Expérience Pompe-Sonde	58
3.3	Cinétique d'apparition de fragments	61
3.4	Hole-Burning UV-UV	62
3.5	Hole-Burning IR-UV	64
3.6	Spectroscopie IR avec laser UV non résonnant	65
3.7	Spectroscopie de photodissociation IR de complexes hydratés	65
3.8	Calculs de chimie quantique	67
3.8.1	Méthodes CC2	67
3.8.2	Méthodes DFT	67
3.9	Simulations Franck-Condon	68
3.10	Recherche conformationnelle	68
4	Processus de relaxation dans les bases protonées de l'ADN	71
4.1	L'uracile protonée	72
4.1.1	Forme kéto de l'uracile protonée	74
4.1.2	Cinétique d'apparition des fragments du tautomère kéto de l'uracile protonée	75
4.1.3	Expériences pompe-sonde sur le tautomère kéto	77
4.1.4	Calculs Coupled Cluster (CC2) des états excités du tautomère kéto	83
4.1.5	Processus de relaxation du tautomère kéto à l'état excité : bande origine et première bande vibronique à $+101\text{ cm}^{-1}$	87

4.1.6	Processus de relaxation du tautomer kéto à l'état excité : à partir de +260 cm^{-1} d'excès d'énergie	89
4.1.7	Processus de relaxation du tautomère kéto vers l'état fondamental . . .	92
4.1.8	Spécificités des voies de fragmentation avec le laser de sonde	94
4.1.9	Conclusions	96
4.1.10	Forme énoI de l'uracile protonée	97
4.1.11	Cinétique d'apparition des fragments du tautomère énoI de l'uracile . .	99
4.1.12	Expériences pompe-sonde sur uracile énoI	102
4.1.13	Processus de relaxation à l'oeuvre dans le tautomère énoI sur la bande origine	106
4.2	Thymine protonée - forme énoI	110
4.2.1	Cinétique d'apparition des fragments sur la thymine	112
4.2.2	Expériences pompe-sonde sur la thymine	113
4.2.3	Calculs théoriques	117
4.2.4	Processus de relaxation dans le tautomère énoI de la thymine protonée	119
4.3	Guanine protonée	122
4.3.1	Spectroscopie de photodissociation	122
4.3.2	Spectroscopie nanoseconde	126
4.3.3	Cinétique d'apparition	128
4.3.4	Expériences pompe-sonde.	129
4.3.5	Calculs théoriques	133
4.3.6	Processus de relaxation	136
4.4	Conclusion sur les bases de l'ADN protonées	139

5 Spectroscopie et exploration conformationnelle sur les bases de l'ADN protonées monohydratées **141**

5.1	Cytosine protonée et mono-hydratée	141
5.1.1	Spectroscopie de photodissociation infrarouge	146
5.1.2	Sonder la tautomérie des fragments de $CH^+ - (H_2O)_1$ formés par IRPD .	150

5.1.3	Preuve de la conservation de la tautomérie au cours de l'hydratation . . .	152
5.1.4	Recherche conformationnelle et optimisation de géométrie	153
5.2	Guanine protonée et mono-hydratée	169
5.2.1	Spectroscopie UVPD	169
5.2.2	Spectroscopie IRPD sur $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$	174
5.2.3	Recherche conformationnelle et optimisations de géométries	176
5.2.4	Spctres IR théoriques	178
5.2.5	Calculs des états excités	181
5.2.6	Conclusions sur les conformères de $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$	187
5.3	Résultats en cours d'interprétations	188
5.3.1	Spectroscopie	188
5.3.2	Pompe-sonde	189
5.3.3	Conclusion sur la spectroscopie des espèces hydratées	190

6 Conclusion et Perspectives **191**

Bibliographie **195**

Table des figures

1.1	Appariement des bases de l'ADN	11
1.2	Représentation des bases pyrimidiniques	14
1.3	Représentation des bases purines	14
1.4	Spectroscopie UV de la thymine et de l'uracile neutre	16
1.5	Géométries des minima de l'état $^1\pi\pi^*$ de l'uracile	18
1.6	Schéma des surfaces d'énergies potentielles des états excités et de l'état fondamental de l'uracile et de la thymine neutre	19
1.7	Schéma des principaux processus de relaxation théorique de la cytosine neutre	21
1.8	Spectre de photodissociation UV du tryptophane protoné et des complexes mono/bi hydratés	27
1.9	Spectre d'action des hydrates de thymine et uracile protonée	29
2.1	Schéma général du dispositif expérimental	34
2.2	Schéma de fonctionnement d'une source électrospray.	35
2.3	Schéma du piège de Paul	38
2.4	Diagramme de stabilité de Mathieu dans un piège à ions quadripolaire	41
2.5	Région de stabilité proche de l'origine	42
2.6	Trajectoire des ions piégés dans un piège quadripolaire	43
2.7	Chronogramme des impulsions.	51
2.8	Coupe de l'octopole refroidi	52
2.9	Schéma de l'octopole refroidi	53
2.10	Spectre de masse des complexes de la tyrosine protonée	55
2.11	Spectre de masse des complexes hydratés du dipeptide Lysine-Tyrosine formés à 130 K et 90 K	56

2.12	Spectre de masse du tryptophane protoné hydraté et spectre de photodissociation UV du complexe doublement hydraté.	56
3.1	Schéma de photodissociation UV	57
3.2	Schéma d'expérience pompe sonde	58
3.3	Simulation des expériences Pompe-Sonde	60
3.4	Schéma d'expérience Hole-Burning UV-UV	62
3.5	Schéma d'expérience Hole-Burning IR-UV	64
3.6	Schéma d'expérience de spectroscopie infrarouge avec un laser UV non résonnant	65
3.7	Schéma de spectroscopie infrarouge des complexes hydratés	66
4.1	Spectre de masse de l'uracile protonée avec les fragments induits par photoexcitation.	72
4.2	Représentation des tautomères de l'uracile protonée.	73
4.3	Spectre de photodissociation UV de l'uracile protonée.	74
4.4	Cinétique d'apparition des fragment primaires de l'uracile protonée kéto.	75
4.5	Evolution des temps d'apparition des fragments de l'uracile protonée kéto, $1/\tau$ (s^{-1}), en fonction de l'énergie d'excitation.	76
4.6	Signaux pompe-sonde sur la bande origine du tautomère kéto de l'uracile protonée à l'échelle ps.	78
4.7	Signaux pompe-sonde sur la bande origine du tautomère kéto de l'uracile protonée à l'échelle μs	79
4.8	Signaux pompe-sonde sur la bande origine du tautomère kéto de l'uracile protonée à l'échelle ms.	81
4.9	Signaux pompe-sonde enregistrés sur le fragment m/z 40 avec un laser d'excitation à 306,95 nm à l'échelle ps, μs et ms.	82
4.10	Simulations Franck-Condon du spectre UV de la forme kéto de l'uracile protonée.	85

4.11	Représentation des modes vibroniques à a)+100 et b)+260 cm^{-1} du tautomère keto de l'uracile protoné	86
4.12	Structures optimisées des états excités $^1\pi\pi^*$, $^1nO\pi^*$, $^3\pi\pi^*$	87
4.13	Schéma du processus de relaxation proposé sur les deux premières bandes vibroniques du tautomère kéto de l'uracile protonée.	89
4.14	Chemin réactionnel optimisé reliant l'état $^1\pi\pi^*$ et la structure Eth-Col au voisinage du croisement triple $^1\pi\pi^*/^3\pi\pi^*/S_0$	90
4.15	Schéma du processus de relaxation proposé avec un excès d'énergie d'au moins +260 cm^{-1} , du tautomère kéto de l'uracile protonée.	91
4.16	Cinétique d'apparition du fragment m/z 70 à l'échelle μs et ms sur la bande origine à 314,05 nm.	93
4.17	Schéma des processus de relaxation permettant un retour vers l'état fondamental du tautomère kéto de l'uracile protonée.	94
4.18	Spectres de masse de l'uracile protonée excitée à 256 nm.	98
4.19	Temps d'apparition des fragments du tautomère énol de l'uracile en fonction de la pression résiduelle.	99
4.20	Signaux pompe-sonde enregistrés à l'échelle picoseconde du tautomère énol de l'uracile protonée	103
4.21	Signaux pompe-sonde enregistrés à l'échelle microseconde du tautomère énol de l'uracile protonée.	104
4.22	Signaux pompe-sonde enregistrés à l'échelle milliseconde du tautomère énol de l'uracile protonée.	105
4.23	Intersection conique calculée par R.Omidyan	108
4.24	Schéma de relaxation proposé pour le tautomère enol de l'uracile protoné	109
4.25	Représentation de la forme énol de la thymine protonée.	110
4.26	Spectres de masse à une et deux couleurs de la thymine protonée.	111
4.27	Spectre de photodissociation UV de la thymine protonée, enregistré et moyenné sur l'ensemble des fragments.	111

4.28	Cinétiques d'apparition du fragment m/z 110 de la thymine protonée avec une excitation sur la bande origine à 267,2 nm.	112
4.29	Signal pompe-sonde à l'échelle picoseconde avec la thymine protonée à 267,2 nm.	113
4.30	Signal pompe-sonde à l'échelle picoseconde avec la thymine protonée à 257 nm.	114
4.31	Durées de vie nanoseconde de TH ⁺ mesurées sur les fragments m/z 44, m/z 84 et m/z 110 en fonction de l'excès d'énergie d'excitation.	115
4.32	Signal pompe-sonde à l'échelle microseconde et milliseconde avec la thymine protonée à 267,2 nm.	116
4.33	Représentation des orbitales moléculaires impliquées dans les transitions électroniques de la thymine protonée.	117
4.34	Structure de la guanine protonée avec numérotation des atomes d'azote. . . .	122
4.35	Différence de spectre de masse de la guanine protonée avec un laser d'excitation à 292,95 nm.	123
4.36	Spectroscopie de photodissociation UV de la guanine protonée à 1 couleur. . .	124
4.37	Spectre de photodissociation de la guanine protonée à deux couleurs enregistré sur le fragment m/z 135 et m/z 43.	125
4.38	Spectres UVPD de la guanine protonée obtenu avec (a) le laser picoseconde et (b) le laser à colorant.	126
4.39	Spectroscopie <i>hole burning</i> de la guanine protonée.	127
4.40	Cinétique d'apparition des fragments à l'échelle μ de la guanine protonée . . .	128
4.41	Expériences pompe-sonde sur la bande origine à 305,65 nm à l'échelle ps. . .	129
4.42	Expérience pompe-sonde sur la bande origine à 305,65 nm avec un laser de sonde à 532 nm sur une échelle μ s.	130
4.43	Expériences pompe-sonde sur la bande à 301,85 nm avec un laser de sonde à 532 nm sur une échelle μ s.	131
4.44	Expériences pompe-sonde à l'échelle μ s dans la région inférieur à 300 nm. . .	132
4.45	Orbitales moléculaires impliquées dans les transitions électroniques de la guanine protonée.	135

5.1	Représentation des formes tautomères de la cytosine protonée	141
5.2	Spectre de masse des complexes hydratés de la cytosine protonée formés à 80 K	142
5.3	Spectre de masse après photodissociation UV de $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$	143
5.4	Spectre de photodissociation de la cytosine protonée et du complexe monohydraté	144
5.5	Spectre de photodissociation IR de $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$	146
5.6	Spectres de photodissociation infrarouge de $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ et des formes tautomère de la cytosine isolée	148
5.7	Spectroscopie de CH^+ formé à 3489 cm^{-1}	150
5.8	Spectroscopie de CH^+ formé à 3524 cm^{-1}	151
5.9	Spectres IR simulés des formes kéto isolées et monohydratées de la cytosine protonée	157
5.10	Spectres IR simulés des formes énol isolées et monohydratées, de la cytosine protonée	161
5.11	Simulation Franck-Condon des trois premiers conformères du tautomère kéto cytosine calculés avec la méthode wB97XD/aug-cc-pVDZ	166
5.12	Modes de vibration du premier état électronique de CONF-Ko1	167
5.13	Modes de vibration spécifiques au premier état électronique excité de CONF-Ko2.	167
5.14	Spectre de photodissociation de la guanine protonée et du complexe monohydraté $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$	170
5.15	Spectre de photodissociation de $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ dans la région de la bande origine	171
5.16	Spectre <i>hole-burning</i> de $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ dans la région de la bande origine	172
5.17	Signal hole burning sur des bandes vibroniques spécifiques	173
5.18	Signal hole burning dans la région 288.25-287.5 nm	174
5.19	Spectre IR de la guanine protonée et du complexe monohydraté de la guanine protonée $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$	175
5.20	Comparaisons des spectres IR expérimentaux et théoriques de la guanine protonée et des quatre conformères monohydratés	180

5.21	Représentation des orbitales moléculaires du conformère N7-O impliqué dans la transition $\pi\pi^*$	182
5.22	Simulation Franck-Condon des conformères de $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ calculée en SCS-CC2/aug-cc-pVDZ à proximité de la bande origine comparée au spectre expérimental	184
5.23	Simulation Franck-Condon des conformères de $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ sur l'ensemble du spectre.	186
5.24	Spectroscopie UVPD de $\text{UH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ et $\text{TH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ comparés à la spectroscopie du monomère	189

Liste des tableaux

4.1	Energies d'excitation verticales et adiabatiques (en Ev) de la forme kéto de l'uracile protonée.	84
4.2	Configuration électronique, énergies d'excitation en vertical (eV) et forces d'oscillateur (f) des formes optimisées $^1\pi\pi^*$, $^1n_O\pi^*$ et $^3\pi\pi^*$	96
4.3	Energie des transitions électroniques vers les états singulets et triplets de la thymine protonée.	118
4.4	Energies des transitions (calculs verticaux) de la guanine protonée en SCS-CC2/aug-cc/pVDZ.	134
4.5	Energies de transition adiabatique de la guanine protonée calculée au niveau SCS-CC2/aug-cc-pVDZ	134
4.6	Transitions électroniques (nm) dans la géométrie optimisée de l'état $n_O\pi^*$ avec la méthode SCS-CC2/aug-cc-pVDZ , (en parentheses les forces d'oscillateur les plus importantes)	136
4.7	Transitions électroniques verticales (nm) dans la géométrie optimisée de l'état $^3\pi\pi^*$ avec la méthode SCS-CC2/aug-cc-pVDZ	136
5.1	Structures optimisées des quatre conformères kéto de $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$	154
5.2	Structures optimisées des quatre conformères énol de $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$	156
5.3	Energies de transition verticales calculées de $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ CONF-Ko1 et du tautomère kéto isolé	163
5.4	Energies adiabatiques de l'état $^1\pi\pi^*$ de CONF-Ko1	164
5.5	Energies adiabatiques de la transition S_0-S_1 calculée pour les conformères CONF-Ko1, CONF-Ko2 et CONF-Ko3	165

5.6	Calculs verticaux des trois premiers états excités du tautomère énol de la cytosine protonée (CH^+) et des conformères énol monohydratés avec la méthode SCS-CC2/aug-cc-pVDZ	168
5.7	Géométries et énergies relatives des différents conformères de $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$.	177
5.8	Energies verticales des trois premiers états excités de la guanine protonée et de ses conformères hydratés calculées avec la méthode SCS-CC2/aug-cc-pVDZ.	182
5.9	Energies des transitions adiabatiques entre S_0 et S_1 des différents conformères de $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$	183

1 - Introduction

1.1 . Généralités

L'ADN (l'acide désoxyribonucléique) constitue le support de l'information génétique, qui permet de coder les protéines nécessaires au bon fonctionnement du corps humains ainsi qu'à celui de nombreuses espèces vivantes de la planète. L'ADN est considéré comme un biopolymère formé de plusieurs nucléotides. Un nucléotide est formé par la combinaison de trois molécules : une base purique (adénine ou guanine) ou pyrimidinique (cytosine, thymine ou uracile), un sucre (ribose ou désoxyribose) et un acide phosphorique. La succession de nucléotides permet de former un brin d'ADN. Dans le noyau cellulaire, l'ADN se trouve sous forme d'une structure en double hélice constituée de deux brins et caractérisée pour la première fois par James Watson et Francis Crick.[1] Pour former cette structure hélicoïdale, les bases nucléiques de chaque brin s'appairent entre elles spécifiquement : l'adénine avec la thymine et la guanine avec la cytosine(1.1a,b). La structure de cet appariement a été mise en évidence par Watson et Crick avec la formation de deux liaisons hydrogène entre l'adénine et la thymine et de trois liaisons hydrogène entre la guanine et la cytosine.

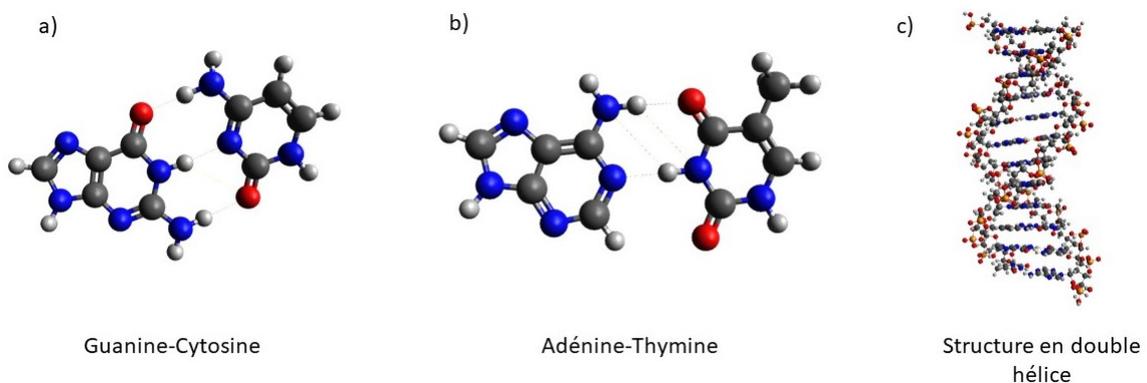


Figure 1.1 – a) Appariement entre la guanine et la cytosine, b) Appariement entre l'adénine et la thymine, C) Structure en double hélice de l'ADN

Les bases nucléiques cytosine, thymine et uracile sont des dérivés de la pyrimidine, une molécule azotée hétérocyclique aromatique voisine de la pyridine et comportant deux atomes d'azote. L'adénine et la guanine quant à elles sont des dérivés de la purine, elle-même constituée d'un cycle pyrimidine fusionné à un cycle imidazole. Ces bases absorbent les rayons UV grâce à la nature aromatique conjuguée conférée par les noyaux puriques et pyridiniques. Or, ce processus photophysique n'est pas souhaité dans le monde du vivant afin de préserver la stabilité du génome. De nombreuses études ont pu montrer que les rayonnements UV pouvaient être des sources de mutations du code génétique et induire de nombreux dommages dans le corps humain et notamment l'apparition de cancers de la peau. [2, 3] Ces dommages de l'ADN pourraient être expliqués par la création de dimères formés à partir de liaisons covalentes entre les bases nucléiques d'un même brin. [4] L'espèce dimérique majoritairement évoquée dans la littérature est le dimère cyclobutanique de pyrimidines (CPD) [4, 2, 5] formé principalement à partir de deux pyrimidines dont les liaisons doubles se cassent pour former un cyclobutane. Des études ont montré que des espèces dimériques formées après absorption de rayonnement UV entraînent des processus d'apoptose, c'est-à-dire la mort cellulaire. [6] Plusieurs études ont montré que la dimérisation pouvait aussi être induite par la présence de photo-sensibilisateurs qui transfèrent l'énergie absorbée par rayonnement UV vers l'état triplet des bases pyrimidiniques et déclencheraient la réaction de dimérisation. [7, 8, 9]

Néanmoins, les bases de l'ARN et de l'ADN sont des exemples marquants de la sélection étroite de molécules organiques sur lesquelles repose la vie telle que nous la connaissons. Le fait est que, seulement deux paires de bases Adénine-Thymine (AT) et Guanine-Cytosine (GC) codent toute l'information génétique, avec les liaisons hydrogène qui régissent la complémentarité des bases. Des études ex-vivo ont montré que les bases de l'ADN sont le fruit de nombreuses réactions photo-induites dans des glaces de pyrimidines et de purines contenant des molécules d'eau, d'ammoniac et de méthane. [10] Entre la formation des bases de l'ADN dans des environnements extrêmes [11, 12] et l'apparition du vivant, elles ont réussi à rester intactes malgré la présence de rayonnements intenses ce qui

implique une certaine photostabilité.

Le concept de photostabilité et les mécanismes assurant la photostabilité peuvent être illustrés avec les photostabilisateurs. [13] Ce sont en général des molécules organiques aromatiques, présentant des liaisons hydrogène intramoléculaires, qui possèdent une section efficace d'absorption importante dans le domaine UV et peuvent convertir l'énergie des photons absorbés en chaleur, sans subir de dégradation photochimique. Le mécanisme principal responsable de cette photostabilité est une désexcitation non-radiative ultrarapide de l'état localement excité vers l'état fondamental. Ce processus, appelé conversion interne, sert à convertir l'énergie des photons UV susceptible d'induire des dommages en énergie vibrationnelle (chaleur) qui est ensuite dissipée par l'environnement. Les bases de l'ADN et en particulier les structures supramoléculaires de l'ADN et des protéines disposent de mécanismes de désactivation à l'état excité très efficaces qui sont similaires à ceux des photostabilisants. Les calculs soutiennent l'hypothèse selon laquelle la photochimie des liaisons hydrogène joue un rôle décisif pour la photostabilité du codage moléculaire de l'information génétique dans les paires de bases d'ADN isolées. Ces résultats suggèrent que les structures Watson-Crick, à savoir Guanine-Cytosine et Adénine-Thymine se distinguent par des mécanismes de désactivation à l'état excité particulièrement efficaces qui maximisent leur photostabilité. [14]

Cependant, les voies de relaxation sont plus complexes car d'autres chemins de relaxation sont envisagés avec notamment l'implication des états triplets dans le processus de désactivation. Ces voies de relaxation ont été mises en évidence en solution. [15] Ceci nous ramène donc vers l'importance des états triplets dans les réactions de dimérisations des bases de l'ADN. La présence de chemins de relaxation non-radiatifs vers des états triplets pourrait expliquer l'origine de photodommage en absence de photosensibilisateur. Il est donc d'un intérêt majeur d'étudier les processus de relaxation de l'ADN et en particulier celui des bases nucléiques pour comprendre à la fois la photostabilité de l'ADN mais aussi les processus à l'origine de dommages potentiels.

1.2 . Etat de l'art

Au cours de cette thèse, j'ai étudié les bases protonées de l'ADN/ARN. La représentation des bases pyrimidiniques neutres, thymine, uracile et cytosine, est donnée dans la figure 1.2.

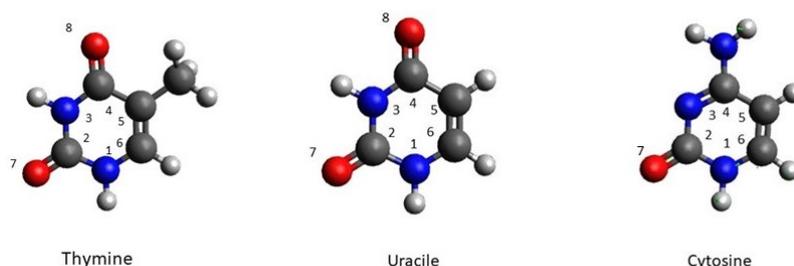


Figure 1.2 – Représentation des bases pyrimidiniques avec la numérotation des atomes.

La figure 1.3 montre la représentation des deux bases de l'ADN, adénine et guanine. Le noyau purine peut donner lieu à neuf formes tautomères possibles, c'est-à-dire des isomères de constitution interconvertibles par la réaction chimique réversible de migration d'un atome d'hydrogène, appelée tautomérisation. Seules les formes où l'atome d'hydrogène se trouve sur l'atome N₇(7H) mais surtout celle où l'atome d'hydrogène est localisé sur l'atome d'azote N₉(9H) existent en solution neutre (voir figure 1.3 pour la numérotation).

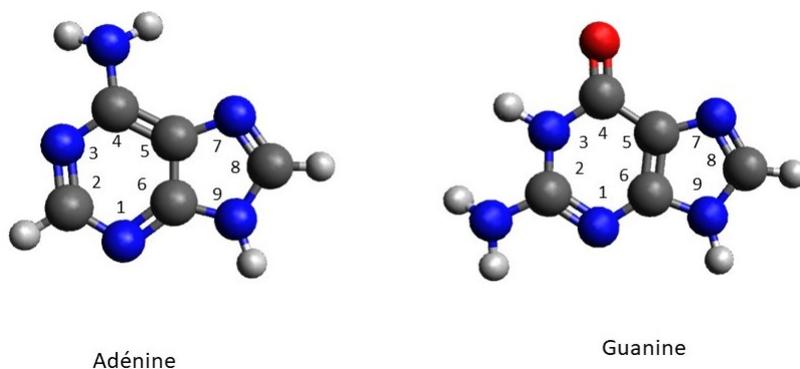


Figure 1.3 – Représentation des bases purines avec la numérotation des atomes.

1.2.1 . Mesures de durées de vie des bases de l'ADN/ARN en solution

La durée de vie de l'adénine en solution aqueuse a été mesurée à $\tau = 1,6 \pm 0,3$ ps en utilisant la méthode de photolyse flash pour sonder l'absorption transitoire à une longueur d'onde d'excitation de 280 nm [16]. La modification structurale avec l'ajout d'un ribose (adénosine : $\tau = 1,9 \pm 0,3$ ps) et d'un groupement phosphate (adénosine 5'-monophosphate : $\tau = 2,1 \pm 0,3$ ps) n'affecte pas cette durée de vie de façon significative. Des expériences de spectroscopie pompe-sonde femtoseconde en solution aqueuse par Reuther et al [17] ont permis de mesurer une durée de vie associée à l'état S_1 de $\tau_1 \simeq 1$ ps pour les quatre bases adénine, cytosine, thymine et uracile.

Peon et Zewail [18] ont mesuré les déclinés de fluorescence des nucléosides (base azotée associée à un sucre) : adenosine, guanosine, cytidine et thymidine et des nucléotides correspondants (base azotée associée à un sucre et un acide phosphorique) avec la technique de fluorescence *up-conversion* avec une résolution femtoseconde. Les durées de vie mesurées sont toutes sub-picoseconde (520-980 fs), avec un temps 20% plus long pour les nucléotides, ce qui permet de confirmer la possibilité pour ces systèmes de se relaxer par un processus non-radiatif ultrarapide à l'état fondamental par conversion interne. Ce processus est capital en biologie car il permet de maintenir la stabilité de l'ADN.

1.2.2 . Spectroscopie électronique des bases de l'ADN/ARN neutres

La spectroscopie de l'uracile et de la thymine neutres a été étudiée dans le groupe de Levy en 1988 [19] en jet moléculaire supersonique (figure 1.4). Le spectre R2PI (pour *resonance enhanced two-photon ionization*) des deux molécules présente une spectroscopie avec une seule bande très large dans la région de 36000 cm^{-1} . Deux hypothèses sont évoquées pour interpréter cet élargissement : (i) un couplage entre deux états électroniques excités et (ii) des facteurs Franck-Condon défavorables dus à un changement important entre la géométrie de l'état fondamental et la géométrie de l'état excité.

La spectroscopie électronique de la guanine, l'adénine et la cytosine neutres a été obtenue dans le groupe de de Vries en 2002 [20]. Il a été montré que les

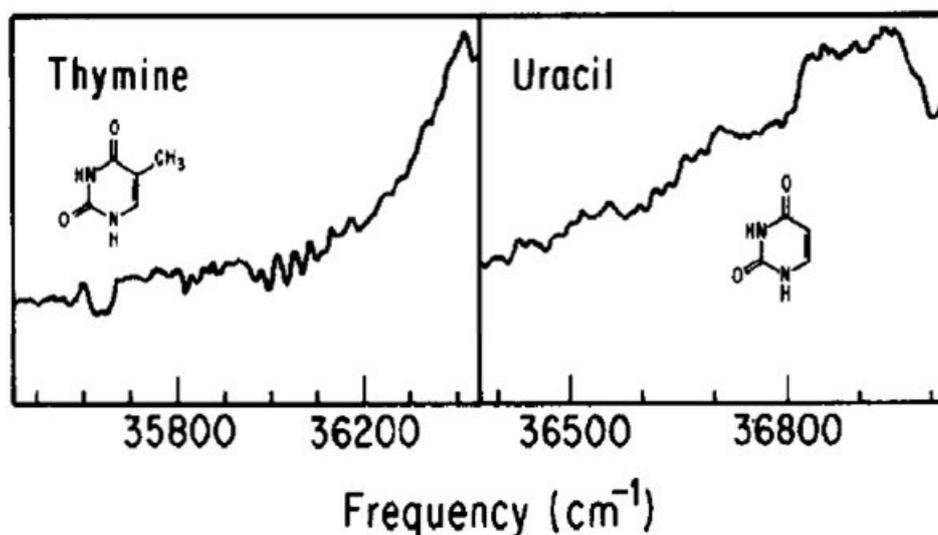


Figure 1.4 – Spectroscopie UV de la thymine et de l'uracile neutre obtenue par le groupe de Levy [19]

spectres obtenus étaient composés de plusieurs formes tautomériques des bases de l'ADN. Dans le cas de la guanine, quatre tautomères ont été identifiés et pour l'adénine et la cytosine, deux tautomères ont été observés. Les différents tautomères identifiés sont des transferts d'hydrogène entre des groupes oxo \leftrightarrow hydroxo et amino \leftrightarrow imino. La tautomérie de l'adénine se caractérise par le transfert d'hydrogène entre les atomes d'azote N_7 et N_9 , entraînant une modification des longueurs de liaisons $N_7 - C_8$ et $C_8 - N_9$. La forme la plus stable est le tautomère N_9H . Dans la cytosine, les deux tautomères les plus stables sont : (i) une forme keto et (ii) une forme éno. La forme keto est la forme représentée dans la figure 1.2 avec une fonction carbonyle et un hydrogène sur l'atome d'azote N_3 . Le tautomère éno présente une fonction alcool sur l'atome d'oxygène O_7 et l'atome d'azote N_3 forme une double liaison avec le carbone C_2 .

En 2006, Choi et Miller [21] ont identifié quatre formes tautomères de la guanine par des expériences de spectroscopie infrarouge en gouttelettes d'hélium, attribution confirmée par le groupe de Mons. [22] Comme dans le cas de l'adénine, les formes tautomères N_9H et N_7H peuvent coexister et de plus, comme dans la cytosine, la tautomérisation de la fonction carbonyle conduit aux formes

keto et énol.

1.2.3 . Dynamique de relaxation dans les bases neutres de l'ADN/ARN

Les processus de relaxation dans les bases neutres de l'ADN ont été très largement étudiés à la fois d'un point de vue expérimental et d'un point de vue théorique. Ces études ont fait l'objet d'un article de revue en 2016 [23].

Uracile et Thymine

L'uracile et la thymine ont des structures similaires, à ceci près que, l'hydrogène sur le C₅ dans l'uracile est substitué par un groupement méthyle -CH₃ (voir figure 1.2). De nombreuses études ont montré que le premier état excité de l'uracile et de la thymine neutre est un état noir $^1n\pi^*$ (qui n'est pas accessible optiquement)[24, 25]. Cet état est calculé entre 4,41 eV et 5,05 eV dans le cas de l'uracil. Le second état excité à partir de la géométrie de l'état fondamental (calcul vertical) est un état $^1\pi\pi^*$ dans la région entre 5,23 et 5,38 eV. Pour la thymine, l'état $^1n\pi^*$ est calculé entre 4,48 et 5,02 eV et son état $^1\pi\pi^*$ entre 5,06 et 5,33 eV[25].

Les optimisations de géométries permettent d'établir le minimum d'énergie de ces états sur la surface d'énergie potentielle mais dépendent des méthodes de calculs utilisées. Les méthodes principalement utilisées pour calculer ces états sont RI-CC2(*second-order approximate coupled cluster*), MS-CASPT2(*Multistate Complete Active Space Perturbation Theory*) et TD-DFT (*Time-Dependent Density Functional Theory*). Les états $^1n\pi^*$ sont calculés entre 3,69 et 4,34 eV pour l'uracile et 3,74 et 4,33 eV pour la thymine[26, 27, 28, 29]. Cependant, la position du minimum de l'état $^1\pi\pi^*$ est beaucoup plus controversée. Deux minima sont évoqués : (i) un premier minimum où la densité électronique est localisée sur la double liaison C₄-O₈ décrit $^1\pi_O\pi^*$ [30], voir figure 1.5(b) et (ii) un deuxième minimum dont la géométrie présente une déformation en *quasi-bateau* très proche en énergie de l'état S_1 [27], voir figure 1.5(a). L'optimisation avec des méthodes CC2, tout en gardant une contrainte sur la symétrie (C_s), calcul l'état $^1\pi_O\pi^*$ comme le plus bas minimum de la surface d'énergie potentielle de l'état S_2 .

Le processus de relaxation majoritairement admis est un processus non-radiatif

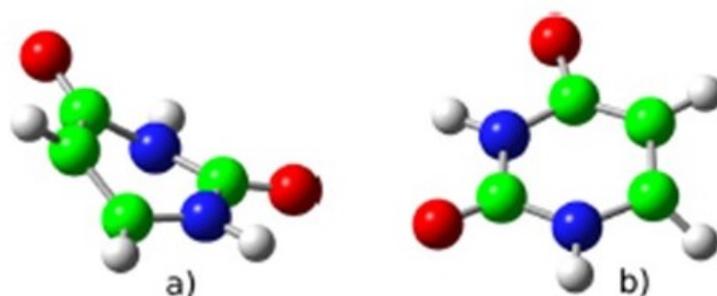


Figure 1.5 – Géométries des minima de l'état $^1\pi\pi^*$ de l'uracile extrait de la figure 4 de l'article de revue de R.Improta [23] a)Minimum en *quasi-bateau*[27],b)Minimum $^1\pi_O\pi^*$ [31].

à partir de l'état localement excité qui se relaxe en se déformant vers une intersection conique S_1/S_0 de type éthylénique (Eth-Col). Cette structure a été calculée en utilisant la méthode d'interaction de configuration multi-référence (*Multi Reference Configuration Interaction - MRCI*) dans l'uracile [24] et présente une torsion de la liaison $C_5 - C_6$ où l'atome de carbone C_5 sort du plan du cycle. L'énergie de cette intersection conique a été optimisée à 4,00 eV pour l'uracile et 3,90 eV pour la thymine en MS-CASPT2. D'autres structures d'intersection conique ont été calculées mais sont localisées bien plus haut en énergie et ne devraient pas jouer un rôle majeur dans le processus de relaxation.

La relaxation depuis l'état optiquement actif $^1\pi\pi^*$ n'est pas clairement définie et dépend aussi des méthodes utilisées. Un passage direct entre la région Franck-Condon et l'intersection conique Eth-Col est évoqué pour la thymine (calculs MS-CASPT2 et CASSCF) et l'uracile (calculs CASPT2 et CASSCF). [32, 33]

Un autre chemin a été proposé à partir de l'état $^1\pi\pi^*$ où le système se relaxerait vers le minimum de l'état S_2 $^1\pi_O\pi^*$. Dans cette géométrie, le franchissement d'une petite barrière permet d'atteindre une intersection conique entre l'état S_2 et S_1 . [33, 34] Le processus de relaxation se poursuit en rejoignant soit le minimum de l'état S_1 $^1n\pi^*$, soit l'intersection conique Eth-Col. [33]

L'accès à l'état triplet a aussi fait l'objet de nombreuses études théoriques. Le passage inter-système entre un état singulet $^1n\pi^*$ et un état triplet $^3\pi\pi^*$ est favo-

nable. Dans la thymine, une région de la surface d'énergie potentielle a été identifiée comme présentant une dégénérescence entre un état singulet et un état triplet [35], ce qui devrait permettre à une population excitée d'atteindre cet état triplet. Une étude TSH/CASSCF (*Trajectory Surface-Hopping/Complete Active Space Self-Consistent Field*) a permis de montrer dans le cas de l'uracile que le passage de l'état $^1n\pi^*$ vers l'état triplet $^3\pi\pi^*$ était favorisé [31]. La relaxation vers l'état $^1n\pi^*$ est possible à partir du minimum de l'état S_2 $^1\pi_O\pi^*$.

Il apparaît donc dans la thymine et l'uracile neutre deux voies de relaxation privilégiées, résumé dans la figure 1.6, à partir de l'état excité $^1\pi\pi^*$, une voie menant directement à l'intersection conique Eth-Col et une voie conduisant à un minimum $^1\pi_O\pi^*$. La population se relaxe ensuite vers l'état $^1n\pi^*$ et dans l'état S_1 la population pourrait rejoindre l'intersection conique Eth-Col ou se relaxer vers le triplet $^3\pi\pi^*$.

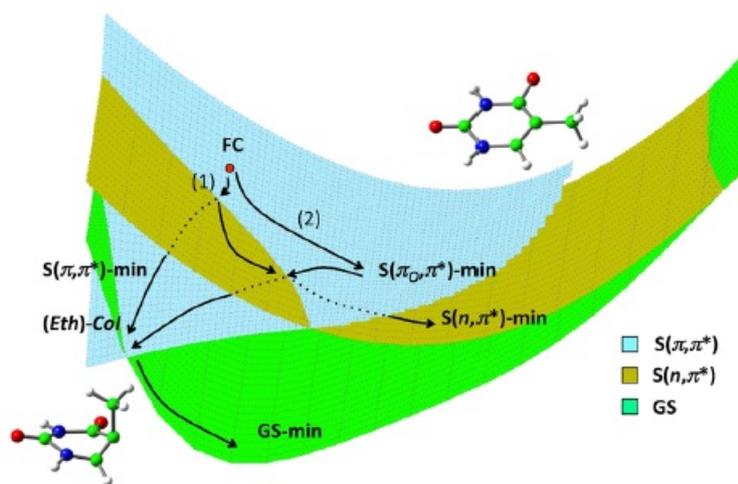


Figure 1.6 – Schéma des surfaces d'énergies potentielles des états excités et de l'état fondamental de l'uracile et de la thymine neutre [33, 34]

Cytosine

La différence entre la cytosine et les deux autres bases pyrimidiques se situe au niveau du premier état excité qui est un état $^1\pi\pi^*$. L'excitation verticale est calculée entre 4,54 et 4,65 eV. Deux états à transfert de charge sont déterminés

dans la cytosine, un premier état impliquant la paire libre de l'azote $N_3 n_N\pi^*$ et un deuxième état impliquant une paire libre de l'oxygène $O_7 {}^1n_O\pi^*$. L'état le plus bas en énergie est l'état ${}^1n_N\pi^*$ entre 4,76 et 5,29 eV tandis que l'état ${}^1n_O\pi^*$ est localisé entre 5,54 et 5,95 eV.

L'optimisation de l'état ${}^1\pi\pi^*$ conduit à un minimum localisé entre 3,77 et 4,48 eV. Plusieurs structures ont été déterminées comme étant des minima de la surface d'énergie potentielle : (i) une structure quasi plane [36], (ii) une structure présentant un léger pliage du cycle *butterfly ring deformation* [37] et (iii) une structure nommée *OP-min* où l'atome N_3 et le groupement NH_2 sortent du plan dans des directions opposées. [38]

Les recherches d'intersections coniques pour expliquer les processus de relaxation ont permis d'identifier une première intersection conique entre l'état ${}^1n_O\pi^*$ et l'état fondamental entre 4,8 et 5,2 eV. La géométrie de cette intersection conique est quasi plane et présente seulement une élongation de la liaison $C_2 - O_7$. [39] Cependant la localisation de ce croisement est relativement haute en énergie. D'autres études ont permis d'identifier une intersection conique plus accessible depuis le minimum *OP-min* avec une petite barrière de 0,14 eV. [38] Une troisième intersection conique de type éthylénique Eth-Col a été identifiée comme une voie de relaxation possible vers l'état fondamental. [40]

Comme dans le cas de la thymine et de l'uracile, le passage vers l'état triplet a aussi été étudié. Une région de la surface d'énergie potentielle de l'état S_1 quasi dégénéré avec l'état triplet T_1 a été identifiée et a permis de calculer un couplage spin-orbite de 20 cm^{-1} au niveau CASPT2. [32] Le passage inter-système entre un état singulet et un état triplet dans la cytosine a aussi été confirmé au niveau CASSCF. [41]

La présence de plusieurs minima sur la surface d'énergie potentielle rend la compréhension du processus de relaxation plus difficile. Avec un faible excès d'énergie deux processus seraient en compétition, à savoir la relaxation vers l'intersection conique Eth-Col et la relaxation vers le minimum *OP-min* qui permettrait ensuite d'atteindre une autre intersection conique proche en énergie pour retourner dans l'état fondamental. Ces processus sont résumés dans la figure 1.7.

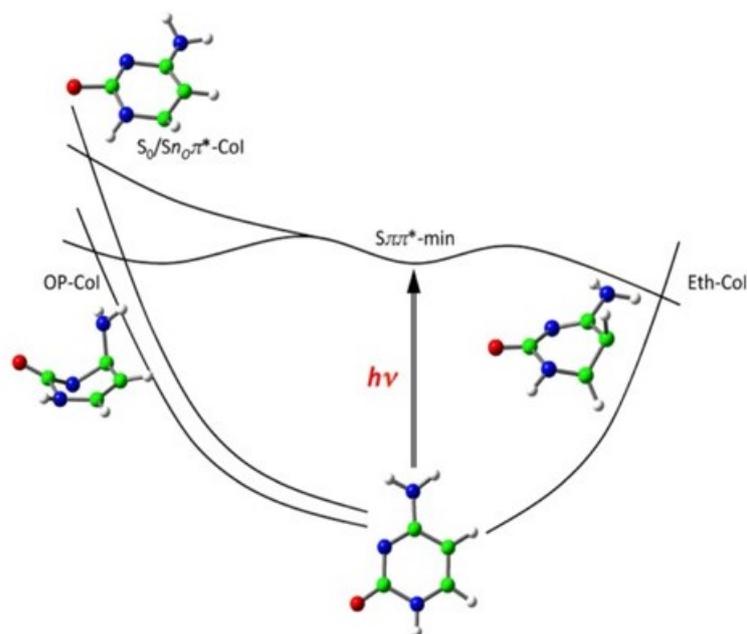


Figure 1.7 – Schéma des principaux processus de relaxation théorique de la cytosine neutre[36, 42]

Guanine

Le processus de relaxation a principalement été étudié sur les tautomères 9H et 7H de la guanine. Dans le tautomère 9H neutre le premier état excité est un état $L_a^1\pi\pi^*$. La transition verticale est calculée par TD-DFT à 4,53 eV. [43] Un deuxième état excité $L_b^1\pi\pi^*$ est calculé avec une force d'oscillateur plus grande que l'état $L_a^1\pi\pi^*$. Le spectre simulé de ces états en CC2 prédit une bande à 4,8 eV et une autre bande à 5,5 eV. [44] Les calculs réalisés sur le tautomère 7H présentent des valeurs du même ordre de grandeur pour $L_a^1\pi\pi^*$ et $L_b^1\pi\pi^*$.

Le minimum de l'état $L_a^1\pi\pi^*$ présente une pyramidalisation du carbone C_2 portant le groupement $-NH_2$. [45] Les calculs de MEP (*minimum energy path*) (calculs CASPT2 et CASSCF) localisent une intersection conique $L_a^1\pi\pi^*/S_0$ avec une énergie adiabatique, par rapport au minimum de l'état fondamental S_0 , à 4,3 eV. [46] Cette structure de l'intersection conique, nommée 2E-Col, présente une distorsion hors du plan du carbone C_2 . Des calculs au niveau CASPT2 et CASSCF ont permis de déterminer un minimum de l'état $L_b^1\pi\pi^*$ avec une géométrie plane du cycle

mais un groupement $-NH_2$ perpendiculaire au plan, ce qui suggère un croisement avec l'état $^1n\pi^*$ proche de la région Franck-Condon. Le minimum de l'état $^1n\pi^*$ est localisé à 0,26 eV en dessous de l'intersection conique 2E-Col. Une seconde intersection conique, nommée 6E-Col, est accessible depuis l'état $^1n\pi^*$ via une barrière de 0,07 eV.[46]

Dans la guanine neutre la voie de relaxation principale après excitation du premier état optiquement actif semble être la déformation du carbone C_2 conduisant à l'intersection conique 2E-Col permettant ensuite de rejoindre l'état fondamental S_0 .

1.2.4 . Durées de vie - mesures expérimentales et simulations

En 2010 Barbatti et al. [44] ont répertorié les constantes de temps des bases de l'ADN/ARN et de leurs dérivés observées expérimentalement afin d'avoir un point de comparaison des temps extraits des simulations des dynamiques.

Dans le cas de la thymine et de l'uracile, trois constantes de temps ont été identifiées en excitant avec un laser de pompe à 250 nm. Pour la thymine, les constantes de temps mesurées sont : $\tau_1 = <0,05$ ps, $\tau_2 = 0,49$ ps et $\tau_3 = 6,3$ ps. Pour l'uracile, les constantes de temps mesurées sont : $\tau_1 = <0,05$ ps, $\tau_2 = 0,53$ ps et $\tau_3 = 2,4$ ps. [47]. En diminuant l'énergie d'excitation à 267 nm de légères modifications sont observées sur les constantes de temps τ_1 et τ_3 , mais la constante de temps τ_2 d'une centaine de femtosecondes n'est pas observée expérimentalement dans les deux molécules. Néanmoins, les simulations donnent une constante $\tau_2 = 0,74$ ps [44] dans le cas de l'uracile, mais les trajectoires associées à ce temps représentent une fraction minoritaire. Des constantes de temps de 5,12 ps pour la thymine et 1,05 ps pour l'uracile ont aussi pu être mesurées à 267 nm.[48, 49] Les temps ps observés ont été attribués au processus de relaxation vers l'état S_1 ($^1n\pi^*$) depuis l'état S_2 ($\pi\pi^*$).

Dans la cytosine neutre, trois constantes de temps sont aussi observées en excitant à 250 nm : $\tau_1 = <0,05$ ps, $\tau_2 = 0,82$ ps et $\tau_3 = 3,2$ ps.[47] En excitant à 267 nm, deux temps sont mesurés comme dans la thymine et l'uracile, c'est-à-dire $\tau_1 = 0,16$ ps et $\tau_3 = 1,8$ ps.[48, 49] Cependant, les simulations indiquent que

la grande majorité des trajectoires conduisent à une désexcitation à l'état fondamental avec un temps intermédiaire $\tau_2 = 0,53$ ps. [44]

Dans la guanine, deux constantes de temps sont observées en excitant à 267 nm, une constante de temps de 100 fs et une constante de temps comprise entre 360 et 800 fs.[48, 49]

Les mesures de toutes ces constantes de temps ont été possibles grâce à l'utilisation de lasers femtosecondes avec des durées d'impulsions courtes pour sonder des processus ultrarapides. Néanmoins, cela présente certains désavantages notamment en terme d'énergie d'excitation. En effet, l'excitation à un photon de 267 nm (4,64 eV) apporte de l'excès d'énergie par rapport au minimum d'énergie de transition électronique, qui se situe autour de 300 nm (4,13 eV). Cet excès d'énergie peut être suffisant pour ouvrir des voies de relaxation qui pourraient ne pas être observées en excitant à proximité de la bande origine. De plus, avec l'emploi des lasers ultracourts, il est difficile de tenir compte de la spécificité en tautomère de certaines base de l'ADN. Le signal obtenu peut donc être la somme d'un ensemble de mécanismes de relaxation qui sont potentiellement en compétition et des contributions provenant de différents tautomères.

C'est pourquoi d'autres études de dynamique ont été réalisées en ayant un compromis à la fois sur la résolution temporelle pour sonder les processus rapides, l'accordabilité et la résolution en énergie pour garder une sélectivité sur les structures sondées. En 2016, le groupe de Leutwyler a pu mesurer, avec un laser picoseconde (résolution : 20 ps, ~ 10 cm⁻¹), une constante de temps de $\tau = 730$ ps sur la bande origine de la transition dans la cytosine (31835 cm⁻¹, 314,12 nm) qu'ils ont attribuée à la durée de vie de l'état $S_1^1 \pi\pi^*$. [50] Cette constante de temps est 700 fois plus grande que les mesures par des expériences pompe-sonde femtoseconde où l'on obtient un temps $0,2 < \tau < 1,2$ ps avec une excitation à 263 - 270 nm. Ce groupe a aussi mis en évidence qu'avec un excès d'énergie de 500 cm⁻¹ par rapport à la bande origine, une voie de relaxation est ouverte et conduit vers l'intersection conique Eth-Col. [51]

L'étude de la dynamique proche des bandes origines a permis de mettre en évidence le rôle de certains états excités dans le processus de relaxation. En 2002,

Nir et al. [52] ont attribué une constante de temps de 290 ns à la durée de vie de l'état triplet de la cytosine. Dans la thymine, des dérivés méthylés de la thymine et de l'uracile, des constantes de temps ns ont été mesurées, qui pourraient être attribuées à la durée de vie d'un état *noir*. Dans la thymine, ce temps est estimé à 20 ns.[53] La spectroscopie infrarouge d'un état *noir* de la thymine, avec une durée de vie de plusieurs centaines de ns, a pu être observée par le groupe de de Vries.[54]

1.2.5 . Bases de l'ADN/ARN protonées

L'adénine protonée est certainement la base de l'ADN dont la spectroscopie et les processus de relaxation ont été les plus largement étudiés. Marian et al[55] ont enregistré le spectre de photodissociation UV de l'adénine protonée produite par électrospray et piégée dans un piège de Paul. Le spectre obtenu présente une large bande d'absorption à laquelle se superposent des bandes vibroniques qui semblent relativement larges. C'est un changement drastique de la spectroscopie de l'état $^1\pi\pi^*$ par rapport à la molécule neutre. Les calculs théoriques permettent d'attribuer le spectre UV au tautomère le plus stable 1H-9H. Néanmoins, les contributions des autres formes tautomères au spectre ne peuvent pas être exclues, en particulier le tautomère 3H-7H. Le changement drastique dans la spectroscopie de l'adénine après protonation est interprété par l'accès direct et sans barrière à une intersection conique S_1/S_0 , ce qui se traduit par une durée de vie très courte de l'état $^1\pi\pi^*$, mesuré à 161 fs.[56] Dans l'adénine neutre, l'accès à l'intersection conique nécessite le passage par un état de transition qui augmente la durée de vie de l'état $^1\pi\pi^*$ (9 ps)[57] et se traduit par une spectroscopie résolue. L'étude réalisée par Cheong et al [58] sur le tautomère 3H-7H montre qu'il présente la même spectroscopie d'action que le conformère le plus stable et évoque un processus de relaxation ultra-rapide similaire.

Le groupe au sein duquel j'ai réalisé cette thèse avait déjà commencé à s'intéresser aux bases de l'ADN/ARN protonées.[59] L'étude de la spectroscopie de photodissociation UV (UVPD) de la cytosine et de l'uracile protonée a permis de caractériser les domaines d'absorption des deux formes tautomères keto et énol.

Le spectre UVPD de la thymine protonée est attribué au tautomère énol. Ces trois bases pyrimidiniques présentent des bandes origine d'absorption moins énergétiques que la pyrimidine protonée, dont la bande origine se situe vers 250 nm.

Précédemment, le groupe a proposé un mécanisme de relaxation pour la cytosine protonée, mettant en évidence le rôle des états à longues durées de vie dans le processus de relaxation.[60] Le groupe a pu proposer le mécanisme suivant pour le tautomère keto de la cytosine par des expériences pompe-sonde multi-échelle et l'appui de calculs théoriques CC2. En excitant le tautomère keto sur la bande origine, la population excitée se relaxe en 140 fs de l'état $^1\pi\pi^*$ plan vers un minimum $^1\pi_{CO}\pi^*$. La durée de vie de cet état $^1\pi_{CO}\pi^*$ est estimée à 5 ns. Il s'ensuit une relaxation de la population vers un état à transfert de charge $^1n_O\pi^*$ dont la durée de vie est mesurée à une vingtaine de μs . De cet état $^1n_O\pi^*$, la population excitée peut se transférer vers l'état triplet $^3\pi\pi^*$ par passage inter-système où la population reste piégée pendant 15 ms avant de se désexciter vers l'état fondamental S_0 par un nouveau passage inter-système. Le mécanisme de relaxation peut donc être résumé comme ceci : $^1\pi\pi^* \rightarrow ^1\pi_{CO}\pi^* \rightarrow ^1n_O\pi^* \rightarrow ^3\pi\pi^* \rightarrow S_0$.

De la même façon, le groupe a pu proposer un mécanisme légèrement différent dans le cas du tautomère énol de la cytosine protonée. Dans ce dernier, étant donné que le proton se fixe sur l'atome d'oxygène les états $^1\pi_{CO}\pi^*$ et $^1n_O\pi^*$ sont absents. La population excitée dans la région Franck-Condon emprunte une voie de relaxation impliquant l'état $^1n_{NH_2}\pi^*$ dont le groupement $-NH_2$ se distord perpendiculairement au plan de la molécule. La durée de vie de cet état est de l'ordre de 1.5 μs . A partir de cet état, la population peut aussi se relaxer vers un état triplet avant de se désexciter dans l'état fondamental S_0 . Des processus de désactivation par conversion interne ont pu être observés depuis les états $^1\pi\pi^*$ et les états $^1n\pi^*$.

1.2.6 . Effets d'environnement

Une fois les propriétés intrinsèques des bases de l'ADN/ARN protonées et isolées connues, les études des effets de l'environnement apparaissent comme une suite logique dans la compréhension des mécanismes de relaxation. En milieu biologique, l'eau apparaît naturellement comme le solvant le plus pertinent.

En 2006, Mercier et al.[61] ont montré que l'addition de deux molécules d'eau suffit pour rallonger la durée de vie de l'état excité du tryptophane protoné et obtenir un spectre vibrationnellement résolu. Cet acide aminé contient un hétérocycle indole qui lui confère des propriétés spectroscopiques d'absorption dans le domaine UV. Le tryptophane neutre a été étudié en jet moléculaire supersonique et plusieurs conformères stables ont été identifiés.[62] Le spectre obtenu est un spectre résolu avec une bande origine 0_0^0 intense et une progression de bandes de combinaisons d'un mode de basse fréquence à 26 cm^{-1} sur les premiers $\sim 100\text{ cm}^{-1}$. La spectroscopie UVPD du tryptophane protoné a été étudiée dans un piège 22-pole refroidi à 10 K à Lausanne dans le groupe de Thomas Rizzo.[63] Le spectre du tryptophane protoné (protonation du groupement $-\text{NH}_2$) obtenu à 10 K (voir figure 1.8) présente une bande large de 347 cm^{-1} autour de 35000 cm^{-1} (285,7 nm). Ce comportement suggère une durée de vie à l'état excité relativement courte, ce qui est en accord avec les expériences pompe-sonde réalisées à Orsay où une durée de vie de 380 fs de l'état excité $^1\pi\pi^*$ a été mesurée pour une longueur d'onde d'excitation de 266 nm.[64] Le couplage entre l'état localement excité $^1\pi\pi^*$ et l'état dissociatif $^1\pi\sigma_{\text{NH}_3}^*$, caractérisé par la perte d'un atome d'hydrogène, est à l'origine de cette durée de vie ultracourte à une longueur d'onde d'excitation de 266 nm. A l'énergie de la bande origine ($\sim 286\text{ nm}$), c'est un transfert de proton rapide vers le cycle qui est à l'origine de la spectroscopie non résolue. Les études de microhydratation à Lausanne ont permis de montrer que l'ajout de molécules d'eau permet de repousser cet état dissociatif suffisamment haut en énergie pour retrouver une spectroscopie résolue avec des bandes fines.

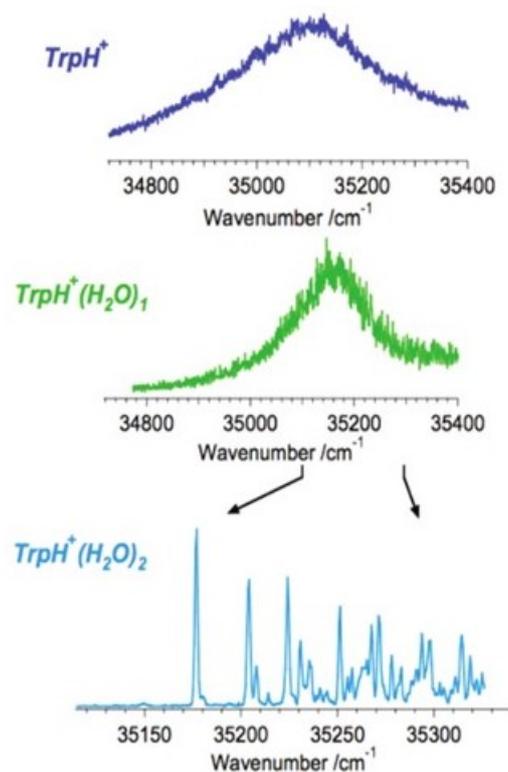


Figure 1.8 – Spectre de photodissociation UV du tryptophane protoné et des complexes mono/bi hydratés[61]

En 2015, Etienne Garrand a développé un nouveau dispositif expérimental avec une approche *double piège*,[65] combinant un piège linéaire refroidi à l'azote liquide et un piège de Paul maintenu à ~ 10 K, pour étudier les structures des complexes faiblement liés par spectroscopie IRPD. Précédemment, les espèces solvatées étaient principalement générées avec des sources de type électrospray. Cependant, la production d'espèces hydratées se limite principalement à quelques molécules de solvant. L'objectif de Garrand était de trouver une façon plus générale de former des espèces solvatées. Le premier essai a été de former les espèces hydratées directement dans le piège quadripolaire refroidi. Le refroidissement permet d'une part de former plus facilement des agrégats faiblement liés et d'autre part de former des agrégats de tailles plus importantes. Néanmoins, les molécules de solvant se condensent sur les parois du piège à plus basse température et rendent le fonctionnement instable. Pour pallier à ce problème, le choix a

été de former les complexes dans un premier piège linéaire (octopole) refroidi en amont de la trappe quadripolaire. L'octopole est refroidi par un cryostat à azote liquide pour favoriser la formation de complexes à une température comprise entre 80 K et 300 K. Les agrégats formés sont ensuite envoyés dans le piège quadripolaire refroidi à 10 K.

Cette approche a été testée sur le dipeptide protoné glycine-glycine (GlyGlyH^+). Avec l'octopole à 300 K, aucun agrégat n'est formé. En abaissant la température à 80 K, des complexes $\text{GlyGlyH}^+(\text{H}_2\text{O})_n$ ont été observés avec $n > 30$. L'étude des complexes $\text{GlyGlyH}^+(\text{H}_2\text{O})_n$ avec n tel que $0 \leq n \leq 4$ a permis de suivre l'évolution des modes des liaisons N-H et O-H de GlyGlyH^+ et les modes d'élongation O-H libre de l'eau par spectroscopie IRPD. Ces expériences ont permis d'identifier le site préférentiel de complexation des molécules d'eau à proximité de la charge électrostatique NH_3^+ avec chaque hydrogène formant une liaison hydrogène. Les expériences avec le méthanol et l'acétone comme solvant ont montré que les agrégats étaient de plus petites tailles, étant donné que les pressions partielles de ces solvants sont plus faibles à basse température, avec rarement plus de six molécules de solvant agrégées. Ils en ont déduit que ces molécules interagissent seulement avec les groupements fonctionnels de l'ion et remplissent uniquement la première sphère de solvation.

En 2008, Bakker et al [66] se sont intéressés à caractériser la tautomérie de l'uracile protonée, par photodissociation IR de sa forme monohydratée. La spectroscopie IR dans les régions $1000\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ et $2500\text{-}3800\text{ cm}^{-1}$ a permis d'identifier au moins deux structures. Le mode d'élongation O-H libre à 3556 cm^{-1} est la signature d'un tautomère énol, tandis que la présence du conformer keto n'a pas pu être confirmée. Il a été suggéré que la présence de la molécule d'eau catalyse en partie la réaction de tautomérisation de l'uracile protonée en abaissant la barrière d'activation de $164,7\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ à $69,5\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ à 298 K, en permettant un transfert de proton partiel de l'uracile vers la molécule d'eau.

En 2009, Bakker et al [67] ont étudié le monohydrate de la cytosine protonée par spectroscopie de photodissociation IR dans la région $2700\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$. D'après les calculs, trois conformères sont susceptibles d'être présents mais une seule de

ces structures a pu être clairement attribuée.

A partir de leurs études, nous pouvons supposer que nous devrions également conserver la tautomérie des molécules au cours de l'hydratation sans isomérisation possible. Notons par ailleurs que les modes d'élongation N-H et O-H liés, dans le domaine $2700-3200\text{ cm}^{-1}$, sont calculés avec des intensités élevées par rapport aux autres bandes du spectre mais, expérimentalement, ces bandes sont relativement larges et de faibles intensités.

En 2014, Pedersen et al [68] se sont intéressés à l'effet de la solvation sur la spectroscopie électronique de l'uracile et de la thymine protonée avec pour but de comprendre le rôle que peut jouer la molécule d'eau sur la transition électronique et à partir de combien de molécules d'eau complexées le spectre serait confondu avec celui mesuré en solution. Les ions sont d'abord piégés dans un octopole situé dans une chambre possédant une importante pression de vapeur d'eau. La spectroscopie de photodissociation des complexes a été enregistrée à température ambiante. Après absorption UV les fragments observés résultent de la perte de : (i) H_2O , (ii) H_2O et NH_3 et (iii) H_2O et HNCO .

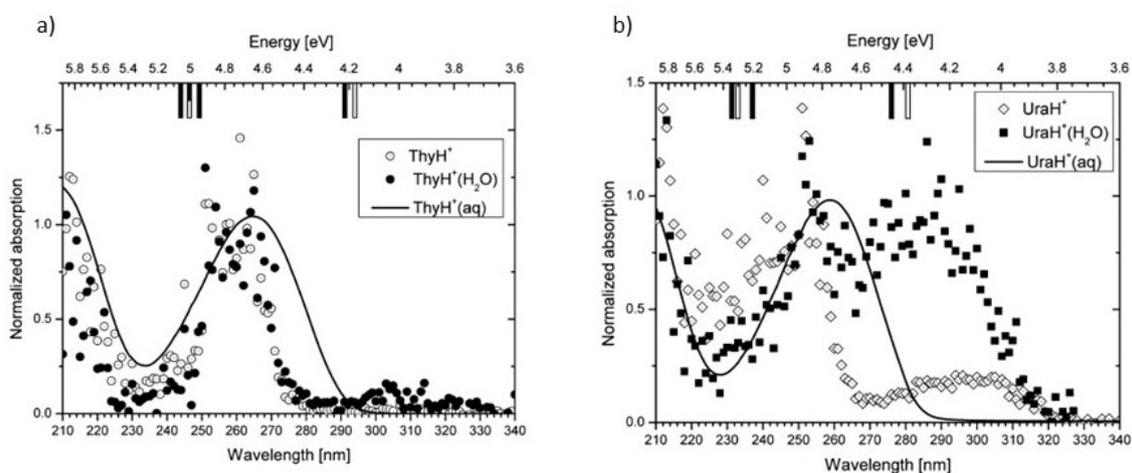


Figure 1.9 – Spectre d'action de a) la thymine protonée/monhydratée et b) uracile protonée/monhydratée obtenu par Pedersen[68]

Le spectre de la thymine hydratée présente deux bandes d'absorption entre 210 et 230 nm et entre 240 et 280 nm. Un signal de faible intensité est observé entre 280 et 335 nm (figure 1.9 a) cercle noire). Ils ont observé que le signal d'ab-

sorption entre 280 et 335 nm n'est observé que sur la perte d'eau. C'est aussi le cas sur le spectre de l'uracile hydratée. Les bandes observées sont attribuées aux tautomères keto et énol dans leurs formes hydratées. Ils estiment que seuls les conformères les plus stables de chaque tautomère devraient être formés, mais il est difficile d'en conclure que ce sont les seuls conformères formés. Les transitions électroniques d'un même tautomère hydraté sont peu affectées par la position de la molécule d'eau.

Le spectre de l'uracile hydratée présente trois bandes d'absorption entre 210-230 nm, entre 230-260 nm attribuées au tautomère énol hydraté et une bande plus large 260-310 nm attribuée au tautomère keto hydraté (figure 1.9 b) carré noir). Selon les calculs théoriques, chaque tautomère ne devrait présenter énergétiquement qu'un seul conformère. Le spectre UV du monohydrate présente un décalage dans le bleu par rapport à la forme isolée.

Les calculs indiquent que la molécule d'eau favorise la formation de liaisons hydrogène sur les fonctions hydroxyles des deux pyrimidines. La molécule d'eau semble s'accrocher plus facilement sur les formes keto puisque la proportion de tautomère keto calculée augmente avec une molécule d'eau à 23% pour la thymine et 67% pour l'uracile.

Ces premières études spectroscopiques sur les hydrates des bases de l'ADN protonées ont apporté quelques informations sur la structure et les propriétés des états électroniques excités. Néanmoins, les ions sont étudiés à température ambiante, ce qui se traduit par une spectroscopie non résolue.

Mon approche dans cette thèse sera donc de fournir des données spectroscopiques plus précises (spectroscopie IR et UV) sur des ions froids afin de comparer directement avec les calculs de chimie quantique.

1.3 . Problématique

Dans une première partie de ma thèse, j'ai cherché à sonder la population excitée qui se retrouve dans ces états optiquement non actifs à longues durées de vie tout en contrôlant l'énergie d'excitation donnée au système. Afin d'étudier ces

états à longues durées de vie, je me suis intéressé aux bases de l'ADN/ARN protonées en piège à ion cryogénique à 10 K. Cette approche permet à la fois de refroidir ces espèces protonées dans le niveau vibrationnel $\nu = 0$ à l'état fondamental et aussi de les piéger sur des durées de plusieurs dizaines de millisecondes. La protonation des bases de l'ADN devrait peu influencer la position énergétique des états $^1\pi\pi^*$, elle peut néanmoins influencer la position des états $^1n\pi^*$ car en fonction du site de protonation certains états excités du neutre $^1n\pi^*$ peuvent être supprimés lorsque le proton se fixe sur un doublet non-liant, soit d'un atome d'azote, soit d'un atome d'oxygène. J'ai effectué des expériences (i) de photodissociation UV pour obtenir les spectres UV des espèces étudiées, (ii) de pompe-sonde multi-échelles résolues en temps et en énergie de la picoseconde (10^{-12} s) à plusieurs dizaines de millisecondes (10^{-3} s) pour mesurer les durées de vies des états électroniques et (iii) de cinétique d'apparition des fragments pour caractériser le temps d'apparition des fragments après retour à l'état fondamental. Les résultats ont été confrontés aux calculs de chimie quantique afin de proposer un mécanisme de désexcitation à partir de l'état localement excité et jusqu'au retour à l'état fondamental.

La deuxième partie de ma thèse porte sur la caractérisation des effets d'environnement sur les processus de relaxation des bases de l'ADN. L'un de ces effets concerne l'interaction de ces bases avec des molécules d'eau. Pour ce faire, j'ai participé au couplage d'un piège linéaire octopolaire contrôlée en température au piège à ion cryogénique à 10 K dans le but de produire des espèces hydratées. D'une part, j'ai effectué des expériences de photodissociation UV pour obtenir les spectres UV des espèces monohydratées avec comme premier objectif d'avoir une comparaison directe avec les bases de l'ADN protonées pour rendre compte de l'effet d'une seule molécule d'eau sur la structure électronique de ces systèmes. D'autre part, j'ai cherché à caractériser le paysage conformationnel des espèces hydratées présentes dans le piège cryogénique par des techniques de double résonance en employant non seulement des expériences de photodissociation infrarouge mais aussi des expériences à deux couleurs, infrarouge et UV, qui permettent d'atteindre une sélectivité conformationnel. L'attribution des spectres IR

et UV repose sur des calculs de chimie quantique.

Le chapitre qui suit sera consacré à la description du dispositif expérimental et des outils spectroscopiques et théoriques utilisés.

Le troisième chapitre exposera les résultats obtenus sur les bases de l'ADN/ARN protonées : l'uracile, la thymine et la guanine. La confrontation des mesures des durées de vie des états excités avec les calculs de chimie quantique, qui donnent la localisation des états électroniques, permet de proposer les mécanismes de désactivation à partir de l'état localement $^1\pi\pi^*$ jusqu'au retour à l'état fondamental.

Le quatrième chapitre est consacré à l'étude des effets d'environnement, avec l'accent sur les espèces monohydratées. La spectroscopie de photodissociation UV des complexes monohydratés a été étudiée et comparée à celle des bases isolées. La combinaison de la spectroscopie de photodissociation infrarouge avec les techniques de double résonance et les calculs de chimie quantique ont permis d'identifier les structures des différentes conformations peuplées à basse température.

Le dernier chapitre de cette thèse donne les conclusions des études de dynamique multiéchelle sur les bases de l'ADN/ARN protonées, avec un accent particulier sur le rôle des états à transfert de charge et des états triplets dans les processus de désactivation, et des études sur les complexes monohydratés qui permettent de rendre compte précisément de l'influence d'une molécule d'eau sur la structure électronique à partir des structures identifiées à 10 K.

2 - Dispositif Experimental

2.1 . Schéma général

Le schéma général du dispositif expérimental utilisé au cours de ma thèse est représenté sur la figure 2.1. Dans un premier temps, les espèces protonées sont produites par une source d'ions de type électrospray développée à Aarhus au Danemark.[69] Les ions sont ensuite guidés vers une première chambre qui contient un octopole équipé d'un cryostat à azote liquide. Les ions produits dans la source électrospray peuvent être hydratés par collisions avec des molécules d'eau contenues dans le gaz tampon d'hélium. Une résistance et un thermocouple permettent de contrôler la température du piège qui influe sur la distribution en taille des espèces hydratées. Sinon, le piège est maintenu à température ambiante et les ions produits dans la source sont dirigés directement dans la deuxième chambre où se trouve un piège de Paul refroidi à 10 K par un cryostat à l'hélium. L'interaction avec les lasers se fait au centre du piège de Paul dont le contenu est ensuite analysé par spectrométrie de masse à temps de vol. Un ensemble d'éléments d'optique ionique (déviateurs, lentilles, filtre de masse, ..) permet de guider et de sélectionner les ions que l'on souhaite étudier.

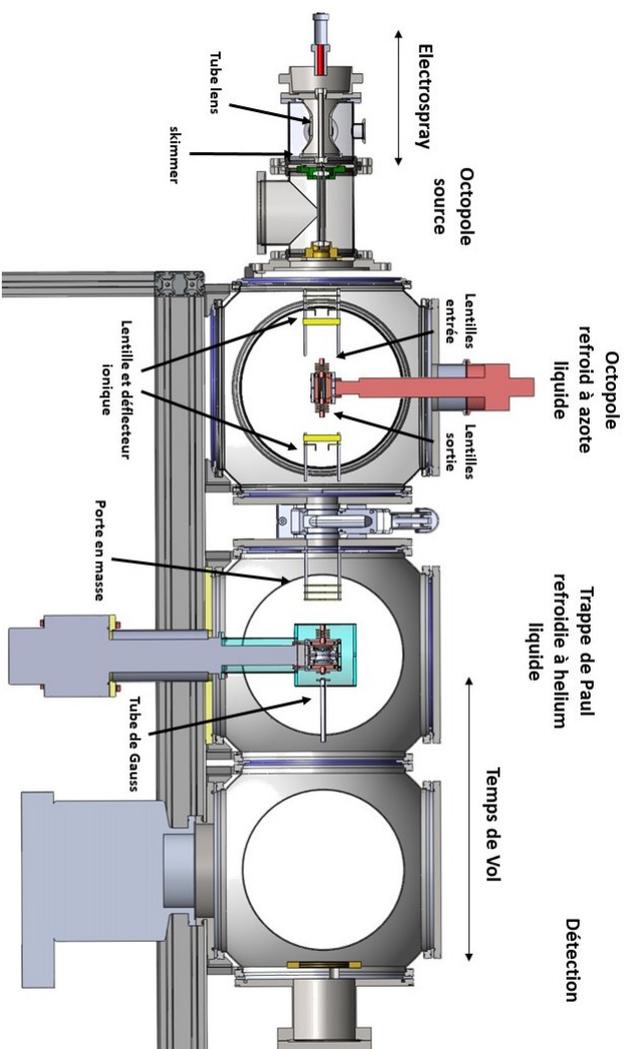


Figure 2.1 – Schéma général du dispositif expérimental comprenant une source d'ions de type électrospray, un octopôle refroidi pour la production de complexes, un piège quadripolaire refroidi à 10 K et un spectromètre de masse à temps de vol.

2.2 . Production d'espèces protonées

2.2.1 . Principe de l'électrospray

Dans cette partie, je présente la technique utilisée pour produire des ions en phase gazeuse. Les prémices de l'électrospray ont débuté par une prédiction de John William Rayleigh en 1882 : lorsque des molécules de solvant contenues dans de fines gouttelettes possédant une charge électrique s'évaporent, on devrait remarquer une accumulation de charges à la surface de ces gouttelettes. Cette accumulation se poursuivrait jusqu'à atteindre un nombre de charges critique (appelé limite de Rayleigh) où la répulsion de Coulomb surpasserait la tension de surface. Cette instabilité provoquerait ainsi un éclatement des gouttelettes en plusieurs nouvelles gouttelettes plus petites.

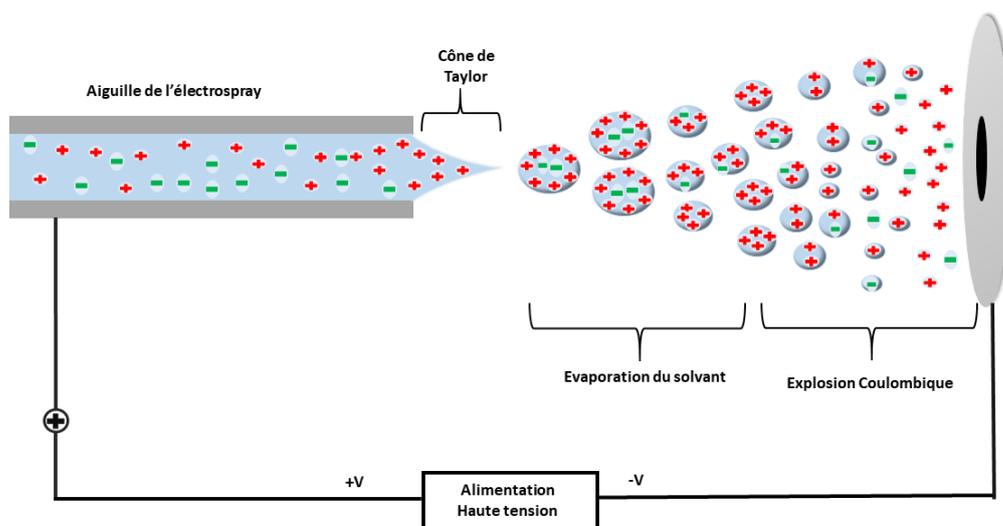


Figure 2.2 – Schéma de fonctionnement d'une source électrospray.

Ce n'est qu'en 1917 que cette prédiction a pu être observée expérimentalement par John Zeleny. En appliquant un champ électrique intense à une aiguille d'où s'écoule un liquide, il a pu photographier la formation d'un spray de gouttelettes chargées. Le spray, aussi appelé cône de Taylor, est formé par l'interaction entre les forces de tensions de surfaces des gouttelettes et le champ électrique qui leur

est imposé.[70] Le principe de fonctionnement est illustré sur le schéma de la figure 2.2.

En 198, John B. Fenn a décrit le premier dispositif d'électrospray, une solution contenant l'espèce souhaitée circulant à travers une aiguille avec un débit de l'ordre d'une dizaine de $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. [71] Cette aiguille est maintenue à une tension de plusieurs kV relative à l'entrée du capillaire soumis à une tension de quelques dizaines de V. Le champ électrique entre la pointe de l'aiguille et le capillaire entraîne une dispersion du liquide, les forces de Coulomb permettent de former un spray de gouttelettes chargées (cône de Taylor). Le champ électrique va créer une accumulation de charges (positives ou négatives suivant le signe du champ électrique) à la surface, jusqu'à atteindre la limite de Rayleigh. Cette limite atteinte, les gouttelettes éclatent et se divisent en gouttelettes de tailles inférieures. Ce processus se répète jusqu'à évaporation totale du solvant et qu'il ne reste plus que le soluté chargé positivement (ou négativement) isolé en phase gazeuse.

Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer le passage des molécules chargées encore sous forme liquide dans les gouttelettes à une molécule isolée en phase gazeuse. Ces deux mécanismes sont différents selon la masse du composé. Le premier mécanisme proposé par Malcolm Dole en 1968 (modèle du résidu chargé), suppose que la succession de fissions des gouttelettes due à l'accumulation de charges à leur surface va diminuer progressivement le nombre de molécules d'intérêt au sein des gouttelettes jusqu'à ne contenir qu'une seule molécule chargée. Lorsque le solvant est évaporé de cette dernière gouttelette le soluté ionique sera formé en phase gazeuse.[72]

Le second processus qui semble dominer pour des masses inférieures à 3000 Da a été proposé par Iribarne et Thomson en 1976. Ce mécanisme de formation d'ion est observé lorsque l'énergie électrostatique au sein de la gouttelette surpasse la limite d'instabilité de Rayleigh, il est thermodynamiquement favorable pour les ions solvatés dans la gouttelette de s'évaporer hors de celle-ci et ainsi d'être transférés en phase gazeuse.[73]

Durant ma thèse, les espèces étudiées ont été dissoutes dans un mélange eau-méthanol avec un ratio volumique (1 :3), les concentrations des solutions sont

de l'ordre de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Le débit utilisé lors des expériences est de l'ordre de $3\text{-}4 \mu\text{L.min}^{-1}$. Une tension continue de 3000 V est appliquée sur l'aiguille, le capillaire d'entrée de la chambre est porté à une tension comprise entre $50\text{-}100 \text{ V}$. Ce capillaire est chauffé pour favoriser l'évaporation des molécules de solvant.

2.2.2 . Source d'ions développée à Aarhus

La source d'ions développée à Aarhus est décrite schématiquement dans la figure 1 de l'article d'Andersen et al.[69]En sortie du capillaire, les ions sont focalisés par une lentille, appelée *Tube Lens*, pour ensuite passer à travers un écorceur, appelé *Skimmer*. Les ions provenant de la source entrent ensuite dans un guide d'ions octopolaire porté à une tension de l'ordre de quelques volts, correspondant à l'énergie des ions. Une radiofréquence (RF) ($f = 1,5 \text{ MHz}$, $V_{pic \text{ à } pic} = 150 \text{ V}$) est appliquée aux huit barreaux et sert à guider les ions vers la sortie de l'octopole.

2.2.3 . Electrodes pulsées

Une électrode, portée à une tension légèrement supérieure à l'énergie cinétique des ions et placée en sortie du guide octopolaire, permet de stocker les ions. L'électrode décrite précédemment fait partie d'un jeu de deux électrodes qui permettent de donner une structure temporelle aux ions avant de les injecter dans l'octopole refroidi à l'azote liquide et/ou dans le piège de Paul refroidi. La création de paquets d'ions pulsés permet d'une part de réaliser une sélection en masse de l'espèce d'intérêt et d'autre part de synchroniser l'arrivée des ions avec l'impulsion du gaz tampon, ce qui permet de piéger et de refroidir les ions dans le piège. A chaque extraction, le potentiel répulsif de l'électrode placée en sortie de l'octopôle, appelée B_1 , est abaissé ($+10 \text{ V} \rightarrow -20 \text{ V}$) pendant un temps de $\sim 3 \mu\text{s}$. L'ajustement de ces tensions permet d'optimiser la formation d'un paquet d'ions qui est ensuite accéléré par une deuxième électrode, appelée tube de Gauss, portée à -200 V . Lorsque le paquet d'ions se retrouve à l'intérieur du tube de Gauss, l'électrode est mise à la masse. Ce changement de potentiel permet de référencer le paquet d'ions en sortie à 0 V .

2.3 . Éléments d'optique ionique

Des lentilles d'Einzel placées tout le long du trajet des ions entre la source et le piège de Paul permettent de refocaliser le paquet d'ions. Elles sont constituées de trois plaques métalliques dont les deux aux extrémités sont à 0 V et celle située au centre est fixée à une tension de l'ordre de grandeur de l'énergie des ions. Des déflecteurs, composés de deux plaques métalliques parallèles, sont utilisés pour corriger la trajectoire du faisceau d'ions en appliquant un champ électrique perpendiculaire au faisceau.

2.4 . Piège à ions quadripolaire

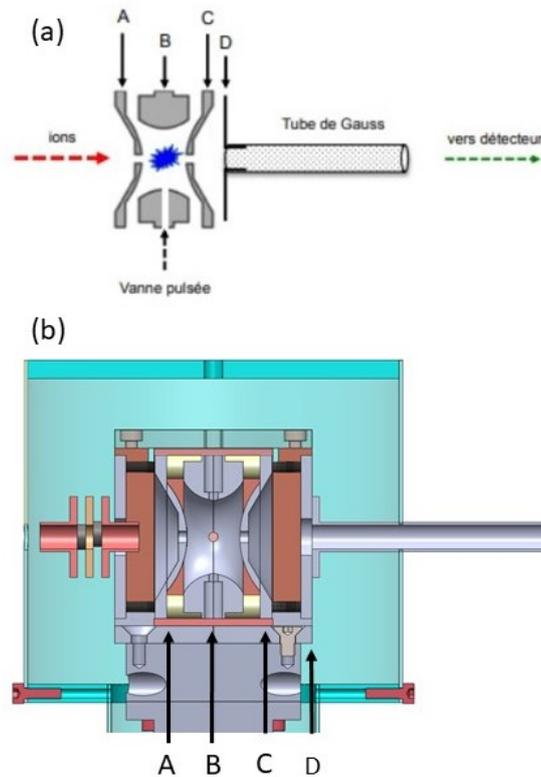


Figure 2.3 – Schéma du piège de Paul : (a) simplifié avec A : électrode d'entrée, B : *ring electrode*, C : électrode de sortie, D : tube de Gauss et (b) dessin technique mettant en situation du piège Paul et le tube de Gauss dans le dispositif.

Les pièges quadripolaires sont de très bons outils de stockage qui permettent de piéger des molécules chargées (ions positifs ou négatifs) dans un champ élec-

trique quadripolaire. L'utilisation des trappes quadripolaires découle de l'appari- tion des quadripôles en spectrométrie de masse, principalement utilisés comme filtres de masse. Ces deux dispositifs sont basés sur les même équations : les équations de Mathieu. Je donne dans la suite de cette partie les solutions qui per- mettent de définir les conditions afin d'obtenir une trajectoire stable des ions au sein du piège.

Dans le cas d'un analyseur de masse, les paramètres sont ajustés pour per- mettre à une espèce possédant un rapport m/z bien précis d'avoir une trajectoire stable au sein du quadripôle. Les masses plus petites et plus grandes ont ainsi des trajectoires instables et sont expulsées du quadripôle, le but étant d'obtenir une seule espèce avec le rapport m/z désiré à la sortie de l'analyseur de masse.

Dans le cas d'un piège quadripolaire, les paramètres sont optimisés de ma- nière à confiner des ions avec un rapport m/z proche. Dans une zone de stabilité, chaque ion va ainsi avoir une trajectoire propre au sein du piège, le but étant d'ob- tenir un spectre de masse comprenant toutes les espèces piégées dans le piège à ions.

Une trappe quadripolaire est constituée de trois électrodes hyperboliques, deux électrodes appelées *end-cap electrodes* et d'une électrode centrale en forme d'anneau *ring electrode*. Pour obtenir un champ quadripolaire :

$$r_0^2 = 2z_0^2$$

où r_0 correspond à la distance entre le centre du piège et la *ring electrode*, z_0 est la distance entre la *end-cap electrode* et le centre du piège. Un potentiel Φ_0 est appliqué sur l'électrode centrale, possédant une composante courant continu ou DC (U) et une composante courant alternatif ou AC (V_{RF}) telle que :

$$\Phi_0 = U - V_{RF} \cos(\Omega t + \gamma) \quad (2.1)$$

où γ correspond à la phase de la radio fréquence (RF) et Ω la fréquence ra- diale. En général, la *end-cap electrode* est à la masse, dans notre expérience le potentiel appliqué sur l'électrode d'entrée (A) est proche de l'énergie des ions (en- viron 200 V). L'électrode de sortie (C) est au même potentiel que l'électrode A sauf

quand l'extraction des ions est déclenchée, où le potentiel est abaissé de -200 V (voir les schémas de la figure 2.3 pour les électrodes A, B et C). Le potentiel dans un champ purement quadripolaire en coordonnées cylindriques peut s'exprimer comme :

$$\Phi_{r,z} = \frac{\Phi_0(r^2 - 2z^2)}{r_0^2 + 2z_0^2} + \frac{2\Phi z_0^2}{r_0^2 + 2z_0^2} \quad (2.2)$$

Afin d'avoir une idée du mouvement des ions au sein de la trappe et de rechercher les zones de stabilité et d'instabilité, il faut résoudre les équations différentielles du second ordre de Mathieu :

$$\frac{d^2u}{d^2\xi} + (a_u - 2q_u \cos 2\xi)u = 0 \quad (2.3)$$

où a_u et q_u sont les paramètres qui permettent de définir les régions de stabilité, ξ étant égal à la moitié de la fréquence radiale Ω .

Les solutions de l'équation de Mathieu permettent de définir les conditions afin d'obtenir une trajectoire stable des ions au sein du piège selon l'axe z , qui est orienté du centre du piège, pour origine du repère, vers le centre d'une *end-cap electrode* :

$$a_z = \frac{-16eU}{mr_0^2 + 2z_0^2\Omega^2} \quad (2.4)$$

et

$$q_z = \frac{-8eV}{mr_0^2 + 2z_0^2\Omega^2} \quad (2.5)$$

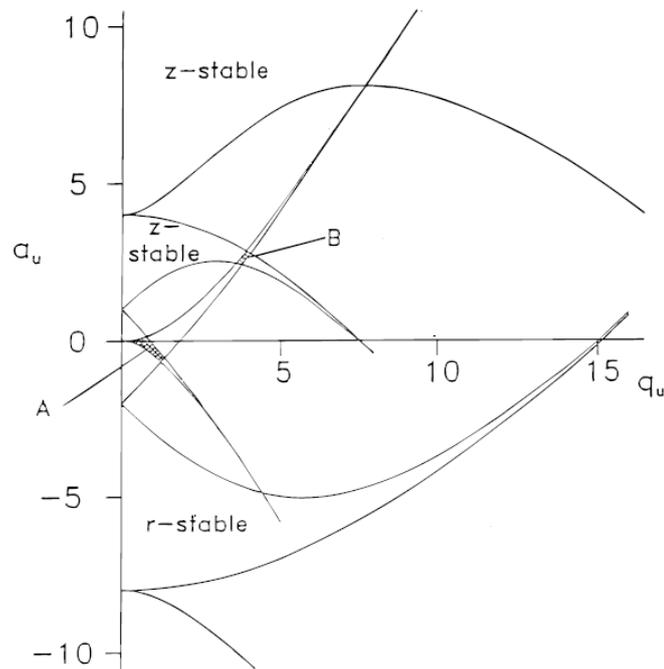


Figure 2.4 – Diagramme de stabilité de Mathieu dans d’une trappe à ions quadrupolaire dans les deux directions r et z . [74]

Une relation similaire est obtenue pour déterminer la partie radiale :

$$a_r = -\frac{a_z}{2} \text{ et } q_r = -\frac{q_z}{2}$$

Les solutions stables et périodiques permettent de définir les régions de stabilité. Chaque coordonnée définit une zone de stabilité, il existe ainsi une région z -stable et une région r -stable. La combinaison des deux zones de stabilités permet d’obtenir les régions de stabilités dans les deux directions, z et r . Elles sont représentées dans la figure 2.4 par les zones hachurées et nommées A et B.

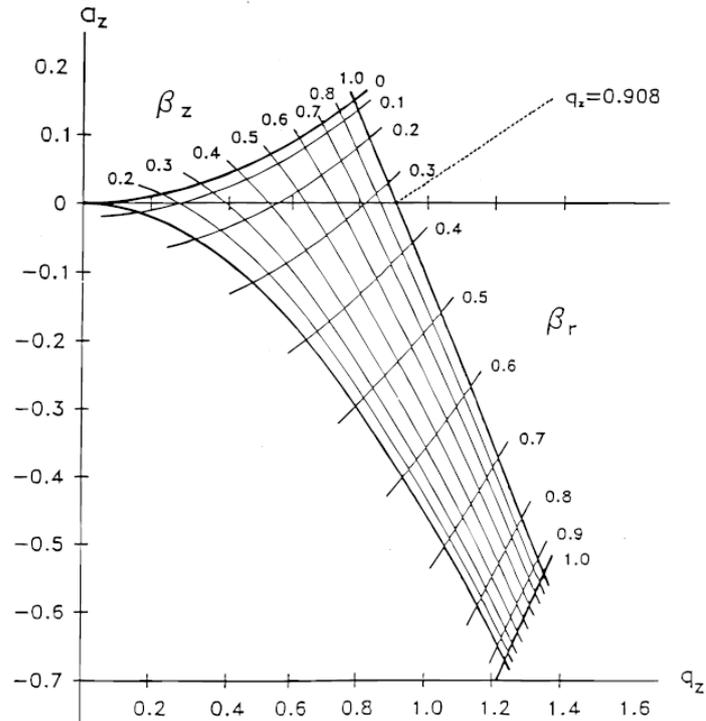


Figure 2.5 – Région de stabilité proche de l’origine, c’est-à-dire la région A de la figure 2.4. [74]

Pour être piégés dans une trajectoire stable les ions doivent être dans des régions stables en z et stables en r . La zone de stabilité proche de l’origine permet aux ions de faibles rapport masse sur charge d’être piégés efficacement. La valeur donnée de $q_z = 0.908$ correspond à la limite de stabilité des ions de faible rapport m/z pour des valeurs données de r_0 , z_0 , V et ω .

La trajectoire des ions au centre du piège prend la forme d’oscillations selon la courbe de Lissajous ou plus figurativement en forme de *huit*, composée de deux fréquences séculaires fondamentales $\omega_{r,0}$ et $\omega_{z,0}$. Les fréquences séculaires sont données par l’équation :

$$\omega(u, n) = (n + \frac{1}{2}\beta_u)\Omega \quad (2.6)$$

Avec n un entier qui permet de décrire les fréquences d’ordre supérieur et β_u un autre paramètre de piégeage qui décrit les frontières des régions d’instabilités. Le paramètre β_u est défini par l’équation :

$$\beta_u \approx \sqrt{a_u + \frac{q_u^2}{2}} \quad (2.7)$$

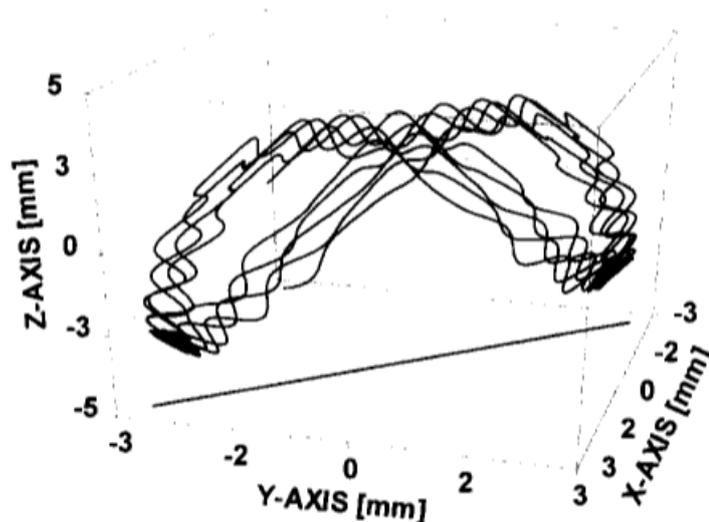


Figure 2.6 – Trajectoire des ions piégés dans un piège quadripolaire.[75]

2.5 . Sélection en masse

2.5.1 . Porte de masse

En général, les conditions de l'électrospray sont optimisées de façon à produire majoritairement l'espèce protonée d'intérêt. Néanmoins, ces conditions peuvent donner lieu à de la fragmentation induite dans la source électrospray. Un temps de vol est créé à la sortie de la source électrospray, les ions vont se séparer temporairement le long du trajet vers le piège de Paul. Une porte en masse, composée de deux plaques métalliques dont une est maintenue à la masse et une autre sur laquelle on applique une tension pulsée, permet de sélectionner uniquement l'espèce que l'on souhaite introduire dans la trappe de Paul. Cette porte de masse est localisée entre le piège refroidi à l'azote liquide et le piège de Paul à 10 K. Le principe de fonctionnement est le suivant : les deux plaques permettent d'appliquer un champ électrique perpendiculaire à la trajectoire des ions. Ce champ est contrôlé temporellement et peut être annulé au moment du passage de l'espèce d'intérêt au niveau des plaques. Le retard correspond au temps de vol de l'espèce d'intérêt entre la source et les plaques de la porte de masse et la largeur temporelle est définie de manière à sélectionner uniquement les ions d'un rapport m/z

donné. L'ajustement de la largeur temporelle de la porte en masse permet aussi d'avoir une indication sur la largeur temporelle du paquet d'ions.

2.5.2 . Excitation des ions piégés par une tension radiofréquence auxiliaire

Nous pouvons procéder à la sélection en masse avec la porte en masse de façon efficace lorsque les ions de rapport m/z différents sont séparés temporellement. Expérimentalement, nous avons constaté qu'il est difficile de réaliser cette sélection en masse lorsque nous produisons des espèces hydratées avec l'octopole refroidi à l'azote liquide et qu'elles sont ensuite transférées vers le piège de Paul. Dans ce cas, pour procéder à la sélection en masse, nous utilisons une RF auxiliaire pour trier les ions piégés dans le piège de Paul et garder uniquement l'espèce d'intérêt. La tension RF auxiliaire est créée à l'aide d'un générateur RF et envoyée sur l'électrode d'entrée de la trappe (électrode A). Cette technique appelée *tickle* a été décrite par Kang et al [76]. Elle permet notamment d'enlever des ions fragments produits au cours d'expériences de photofragmentation combinant un ou deux lasers. La fréquence de la RF auxiliaire dépend de la géométrie du piège à ions, de la fréquence et de l'amplitude de la RF principale, et du rapport m/z de l'ion que l'on souhaite déstabiliser.

2.6 . Spectrométrie de masse par temps de vol

La spectrométrie de masse par temps de vol, communément appelé TOF (pour *Time Of Flight* en anglais) a été développée pour permettre d'analyser un très grand nombre d'espèces moléculaires dans un intervalle de masse très important, produites par exemple par des techniques de type MALDI, désorption laser ou désorption de plasma. Dans ce dispositif expérimental, le spectromètre de masse à temps de vol permet d'analyser les ions stockées dans le piège, formés :

- dans l'électrospray
- par collisions dans le piège
- par excitation laser

Le principe repose sur la capacité de pouvoir différencier le temps de vol de deux ions possédant la même énergie cinétique, E_c , par leur masse, m .

$$E_c = \frac{1}{2}mv^2 \quad (2.8)$$

En effet d'après l'équation 2.8, deux espèces possédant une énergie cinétique E_c identique mais des masses (m) différentes auront des vitesses (v) différentes. Deux ions de masses différentes n'ont donc pas la même vitesse dans le temps de vol. Les ions ne vont donc pas arriver aux mêmes temps sur le détecteur et sont donc séparés temporellement. Afin de fournir une énergie cinétique identique à l'ensemble des ions, on applique une impulsion électrique qui permet de créer un paquet d'ions avec une énergie cinétique définie. A travers le temps de vol, le paquet d'ions va se séparer pour former des paquets d'ions possédant la même vitesse et donc la même masse. L'énergie cinétique étant définie à partir de la différence d'énergie potentielle ΔU , il faut aussi prendre en compte que les espèces présentes sont des molécules chargées, donc que l'énergie cinétique dépend aussi de la charge de l'ion.

$$E_c = q\Delta U \quad (2.9)$$

Il faut donc plutôt considérer le rapport masse sur charge : m/z d'une espèce présente dans un temps de vol. Dans ma thèse, je ne me suis intéressé qu'à des espèces mono chargées, les pics de masse obtenus dans le temps de vol ne dépendent donc que de la masse des ions. Les ions possédant la masse la plus faible seront les premiers à atteindre le détecteur, là où les ions possédant la masse la plus lourde arriveront en dernier, ce qui permet d'obtenir le spectre de masse de tous les ions contenus dans le paquet d'ion initial. Le temps de vol peut donc être défini à partir de la vitesse des ions et la longueur du temps de vol (L).

$$t = \frac{L}{v} \quad (2.10)$$

Les équation 2.8 et 2.9 permettent de déterminer la vitesse des ions en fonction de la différence d'énergie potentielle appliquée :

$$v = \sqrt{\frac{2qU}{m}} \quad (2.11)$$

ce qui permet d'en déduire le temps de vol :

$$t = L\sqrt{\frac{m}{2qU}} \quad (2.12)$$

La spectrométrie de masse par temps de vol présente de nombreux avantages. D'une part, elle permet d'avoir une cartographie de l'ensemble des ions stockés dans le piège à ions très simplement et rapidement, contrairement à des analyseurs de masse quadrupolaires où il est nécessaire de balayer la radiofréquence pour extraire l'ensemble des ions présents dans le piège.

Un second avantage est de pouvoir facilement comparer l'intensité relative entre différents pics du spectre de masse et ce, indépendamment des possibles variations au sein de la source ; une diminution de la quantité d'ions formés va s'accompagner d'une diminution de l'intensité de tous les pics du spectre de masse.

Néanmoins, la technique de temps de vol présente certaines limites, notamment au niveau de la résolution des pics de masses. Ce problème de résolution est principalement dû à la position des ions dans le piège de Paul. Au départ du temps de vol, tous les ions ne sont pas à la même position de l'espace, même s'ils acquièrent la même énergie cinétique, le petit écart spatial de position va entraîner un élargissement du paquet d'ions et donc un élargissement du pic de masse. L'élargissement d'un pic de masse représente un problème pour la séparation d'espèce de rapport m/z proche, ce qui peut arriver lorsqu'il y a la présence d'isotopes dans les molécules étudiées ou dans le cas de perte de fragment de petite masse tel que l'hydrogène. Pour augmenter significativement la résolution une solution est de se placer dans les conditions décrites par Willey et McLaren en 1955,[77] et de définir une zone d'ionisation, une zone d'accélération et une zone libre de champ.

Dans le dispositif expérimental la zone d'ionisation correspond à la zone d'extraction comprise entre le centre du piège où sont piégés les ions (électrode B) et l'électrode de sortie (électrode C), dans cette région l'énergie cinétique des ions est nulle. Pour extraire les ions le potentiel de l'électrode de sortie est soudainement abaissé à -350 V, ce qui permet d'attirer les ions hors du piège. Les ions sont ensuite accélérés entre l'électrode de sortie (électrode C) et l'électrode du

tube de Gauss (électrode D). La tension portée sur le tube de Gauss est de l'ordre de -1300 V. En ajustant la tension du tube de Gauss, on peut modifier la distribution en énergie des paquets d'ions de même masse et gagner en résolution sur le pic de masse. Après quelques microsecondes, la tension sur le tube de Gauss retombe à 0 V, les ions sont ainsi libres de tout champ électrique. La zone sans champ démarre de la fin du tube de Gauss jusqu'au détecteur.

Un système de galettes micro canaux est utilisé pour détecter les ions à la fin du temps de vol (Z-Gap 3 plaques dont 2 en V Microchannel Plate Detector Assembly, Jordan TOF product). Le signal est ensuite enregistré à l'aide d'un oscilloscope (TDS3000, Tektronix)

2.7 . Description des lasers

Les spectres de photodissociation UV réalisés au cours de cette thèse ont été obtenus avec un amplificateur optique paramétrique : OPA (EKSPLA-PG411) pompé par la troisième harmonique (355 nm) d'un laser Nd-YAG à blocage de mode picoseconde (EKSPLA-SL300). Il peut fournir des photons visible ou UV dans la région 680-220 nm. La résolution spectrale du laser picoseconde est de 8 à 10 cm^{-1} . Ce laser est aussi utilisé pour les expériences pompe-sonde à l'échelle picoseconde, on utilise comme laser de sonde la deuxième sortie OPA pompé par le même laser ou la troisième harmonique du Nd :YAG à 355 nm. L'énergie typique du laser OPA est de 200-600 $\mu\text{J}/\text{pulse}$ dans le domaine visible. Dans l'UV on a entre 30 et 50 $\mu\text{J}/\text{pulse}$. L'énergie à 355 nm (3ème harmonique) est de 10 $\mu\text{J}/\text{pulse}$.

Pour créer le décalage temporel entre le laser de pompe et le laser de sonde à l'échelle picoseconde on utilise une platine optique motorisée (*IMS-LM 250 N Load Aluminum Linear Motor Stage* avec le contrôleur *Universal Motion Controler Driver ESP 300* de chez Newport) qui permet d'effectuer des pas de 6,6 ps. Le délai maximal atteignable entre les deux lasers est de 1,4 ns avec la ligne à retard.

Pour réaliser des expériences pompe-sonde sur des échelles de temps plus longues on peut utiliser la seconde ou troisième harmonique (532 ou 355 nm) d'un YAG (Quantel YG 980) ou d'un laser à colorant (Quantel TDL 90) pompé par la

seconde harmonique d'un YAG (Quantel YG 980). Le délai entre les lasers est créé par un générateur d'impulsion qui permet de synchroniser le laser de pompe et le laser de sonde avec une gigue (ou *jitter* en anglais) de 10 ns.

On peut aussi enregistrer des spectres de photodissociation UV avec une meilleure résolution spectrale en utilisant des lasers à colorants (Quantel TDL 90) dans la région 680-220 nm avec une résolution de $0,2 \text{ cm}^{-1}$. En utilisant ces lasers, l'énergie des photons UV envoyés dans le piège est de l'ordre d'une centaine de $100 \mu\text{J}$ à quelques mJ par impulsion.

Un laser IR est aussi utilisé pour la spectroscopie IR, le faisceau IR est obtenu à partir d'un cristal de KTiOPO_4 , appelé cristal KTP, ou d'un cristal de LiNbO_3 , appelé cristal niobate, d'un oscillateur paramétrique optique (développé par André Peermans à l'Université de Namur - Euroscan) pompé par un Nd :YAG (Quantel YG980). Le cristal KTP permet de balayer la région 3250 à 3850 cm^{-1} , le cristal niobate balaye une plus grande région de 2950 à 3750 cm^{-1} . L'énergie des photons IR est de l'ordre de $100 \mu\text{J}$ par impulsion.

2.8 . Synchronisation

Dans la mesure où nous utilisons des lasers impulsionnels, l'ensemble du dispositif fonctionne en mode pulsé à 10 Hz. Pour la synchronisation, nous utilisons un générateur d'impulsion GINI (Générateur d'Impulsions Numérique Informatisé) qui est un générateur d'impulsions électriques, conçu et réalisé par le service électronique de l'ISMO. Ce générateur fonctionne avec un programme exécutable (Labview), lui-même développé par le service électronique de l'ISMO, qui permet de générer les impulsions qui commandent les différents modules et appareils du dispositif expérimental.

Le schéma de la figure 2.7, présente les différentes séquences d'impulsions utilisées dans le dispositif. Une horloge est créée pour référencer les impulsions à une même origine. La séquence impulsionnelle est 100 ms pour pouvoir travailler à 10 Hz. Par souci de clarté dans l'explication, j'ai divisé la séquence en quatre sous-séquences :

- Production de paquets d'ions
- Sélection en masse des paquets d'ion
- Piégeage dans le piège de Paul et activation avec un (ou des) laser(s)
- Extraction des ions et temps de vol jusqu'au détecteur

Tous les ions formés à la sortie de l'électrospray sont accumulés à l'entrée du B_1 (section 2.2.3), ce qui permet de créer un premier paquet d'ions. Le paquet d'ions est ensuite libéré en abaissant la tension du B_1 (pendant environ $3 \mu\text{s}$) et est attiré vers le tube de Gauss. Le tube de Gauss accélère le paquet d'ions pendant $\sim 6 \mu\text{s}$ (déclenché en même temps que le B_1). La durée de la porte temporelle sur le tube de Gauss est ajustée pour accélérer tout le paquet d'ions issu du B_1 et de remettre à zéro la tension sur le tube de Gauss pendant que les ions sont encore à l'intérieur. Ainsi lorsque les ions sortent du tube (vers $7-8 \mu\text{s}$) ils rentrent dans une zone sans champ et gardent l'énergie cinétique acquise (-200V). Lors de la mise à la masse du tube de Gauss, tous les ions sont référencés à la même énergie cinétique. Les ions vont ainsi pouvoir se séparer en fonction de leur masse. La porte en masse est déclenchée environ $40 \mu\text{s}$ après l'activation du B_1 pour laisser passer uniquement l'ion que l'on souhaite piéger dans le piège de Paul. Ce délai de $40 \mu\text{s}$ est ajusté en fonction de la masse et de l'énergie cinétique des ions. L'ouverture ou largeur de la porte de masse (ou *mass gate*) est de l'ordre de 1 à $2 \mu\text{s}$ pour optimiser le signal sur l'ion avec la masse souhaitée.

Cette série d'impulsions peut être reproduite plusieurs fois afin de créer plusieurs paquets d'ions. On appelle ce processus le mode rafale puisqu'il permet de créer une succession de paquets d'ions, et d'augmenter la quantité d'ions piégés au sein du piège. En général, on active entre 4 et 8 rafales lors d'une séquence de remplissage de la trappe à ions. Les rafales sont séparées par un intervalle de 100 à $200 \mu\text{s}$.

Le piégeage des ions n'est possible que si des atomes d'He sont utilisés pour bloquer les ions. Pour cela le gaz tampon doit déjà être présent au sein de la trappe à l'arrivée des ions. Pour ce faire, la vanne pulsée est ouverte en amont de la création du paquet d'ions. Il faut 1 à 2 ms pour que le gaz arrive dans le piège après le déclenchement d'ouverture de la vanne; $200-400 \mu\text{s}$ de délai mécanique

entre le trigge et le mouvement du ressort, puis le temps pour le gaz de diffuser dans le tuyau. Pour cela, la vanne est déclenchée *au coup d'avant*, c'est-à-dire 3 ms avant le début de la prochaine séquence impulsionnelle. Les ions sont stockés pendant environ 49 ms, ce qui permet de refroidir complètement les ions dans leur état vibrationnel fondamental et au gaz introduit dans la chambre d'être évacué. Ce temps de stockage suffisamment long est nécessaire pour s'assurer que les ions soient excités par le (ou les) laser(s) en absence de gaz résiduel.

L'extraction des ions du piège est déclenchée lorsque l'on arrête la radiofréquence. L'arrêt de la radiofréquence est référencé par rapport à l'origine de l'horloge et est toujours déclenché après l'envoi du laser c'est à dire environ 50 ms. Ce temps d'extraction peut être modifié jusqu'à un délai de 90 ms. Ce délai d'extraction est ajusté en fonction de la nature de l'expérience à réaliser. La RF est arrêtée pendant 25 μ s. La tension RF revient à zero en une à deux périodes, soit environ 2 μ s. C'est le temps minimal pour donner l'ordre au pulseur d'extraire les ions du piège de Paul. La tension du pulseur Jordan, appliquée sur l'électrode C (voir schémas de la figure 2.3) est soudainement abaissée pendant 6 μ s. La baisse de la tension sur l'électrode C est déclenchée quelques μ s après l'arrêt de la RF. La tension portée sur le tube de Gauss est déclenchée dès l'arrêt de la RF pendant 8 μ s, seuls les ions présents dans le tube de Gauss lors de la mise à la masse seront accélérés dans la zone sans champ et atteindront le détecteur.

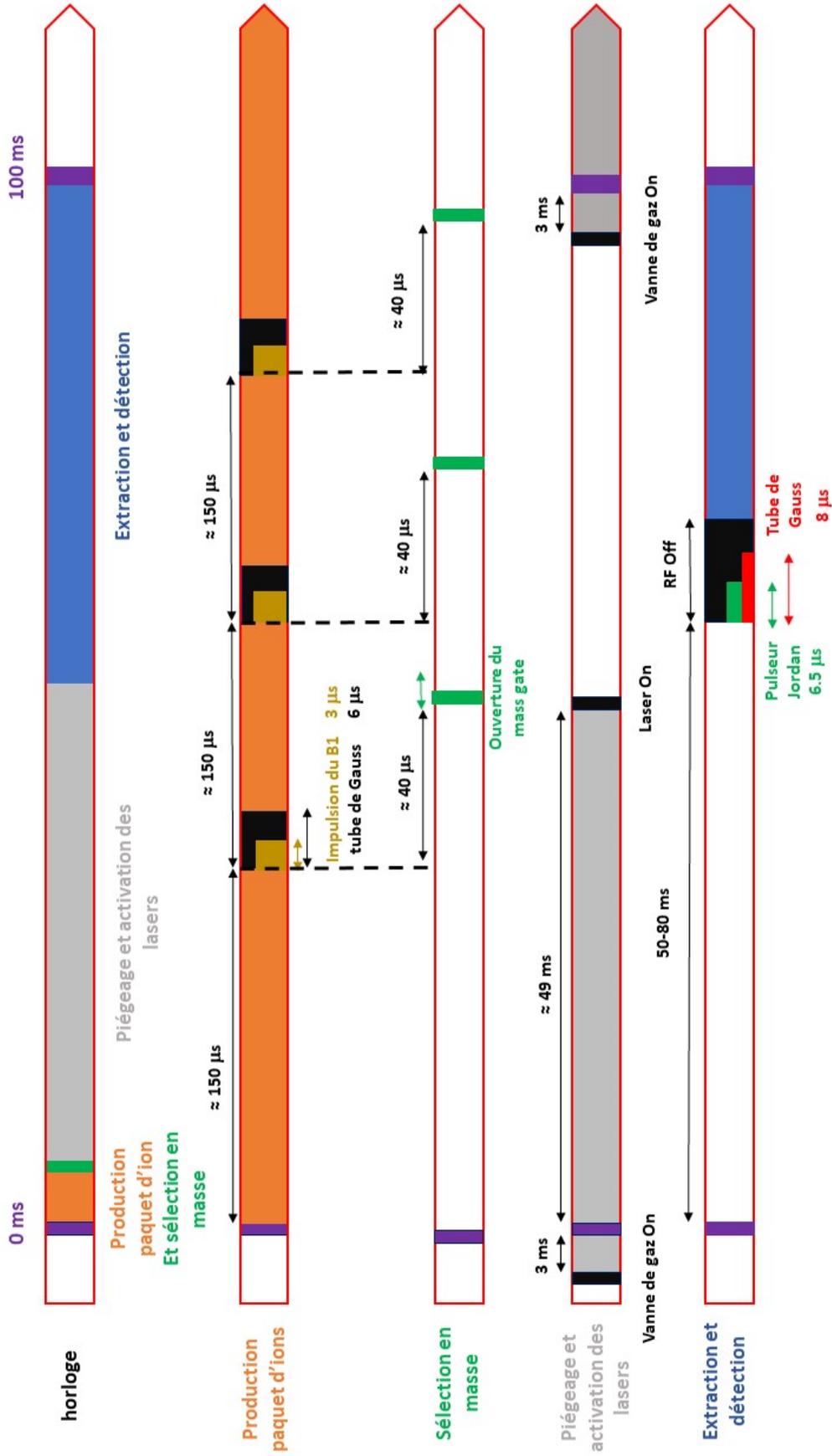


Figure 2.7 – Chronogramme des impulsions.

2.9 . Piège linéaire octopolaire refroidi à l'azote liquide

Pendant ma thèse, j'ai participé au montage et à la mise en fonctionnement d'un piège linéaire octopolaire refroidi à l'azote liquide, placé en amont du piège de Paul. Cette approche *double trappe* a été développée par Etienne Garand à l'université du Wisconsin, Madison,[65] pour produire des complexes à partir d'ions provenant d'une source électrospray. Ces ions sont solvatés par des molécules polaires telles que l'eau, le méthanol ou l'acétone. Ainsi, on peut aisément environner une espèce ionique avec une à plusieurs dizaines de molécules de solvant. Ces complexes sont ensuite injectés dans le piège de Paul refroidi à 10 K pour des expériences de photodissociation, soit avec un laser UV pour étudier la spectroscopie électronique, de ces complexes, soit un laser IR pour caractériser les structures des complexes à l'état fondamental.

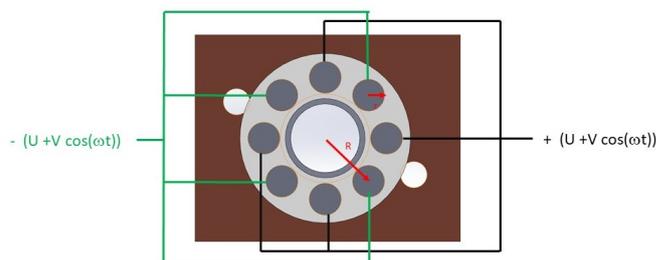


Figure 2.8 – Coupe de l'octopôle refroidi permettant de visualiser l'alternance des tensions, avec r : rayon des barreaux et R : rayon de l'octopôle.

Le piège est constitué de deux jeux de quatre barreaux cylindriques de diamètre $r = 1,5$ mm, auxquels on applique une tension RF en opposition de phase (voir figure 2.8). Ces deux tensions RF qui alimentent les barreaux sont délivrées par une alimentation RF (Model 128 de chez Aradara Technologies LP) conçue pour délivrer une fréquence de 2 MHz quand elle est reliée à une charge capacitive de 30 pF, c'est-à-dire la capacité équivalente de l'octopôle et des câbles d'alimentation. Les huit barreaux sont disposés sur un cercle de rayon $R = 5,75$ mm. Le rapport r/R a été choisi d'après l'article Rao et al [78] car c'est le seul paramètre

géométrique qui influe sur la stabilité de la trajectoire des ions dans le piège à la fréquence RF donnée. La longueur d'octopole est de 50 mm. Le piège a été réalisé à l'atelier mécanique de l'ISMO.

En fonctionnement, nous introduisons le gaz tampon l'hélium à l'aide d'une vanne pulsée (Parker General Valve) afin de ralentir et de piéger les ions en présence de la tension RF. Les ions sont ainsi piégés tout le long de l'axe de l'octopole.

L'octopole est maintenu à l'intérieur d'une boîte en cuivre qui est en contact avec le doigt froid d'un cryostat à azote liquide (Janis Model VPF-100) (figure 2.9). La mise à froid s'effectue en introduisant de l'azote liquide via la canne de transfert du cryostat. Ce montage permet de former des espèces hydratées en dopant le gaz tampon en molécules de solvant en le faisant circuler dans un réservoir placé en amont de la vanne pulsée. La température de l'octopole peut être ajustée à l'aide d'un contrôleur (Temperature controller 325, Lake Shore) pour optimiser la solvation des complexes formés.

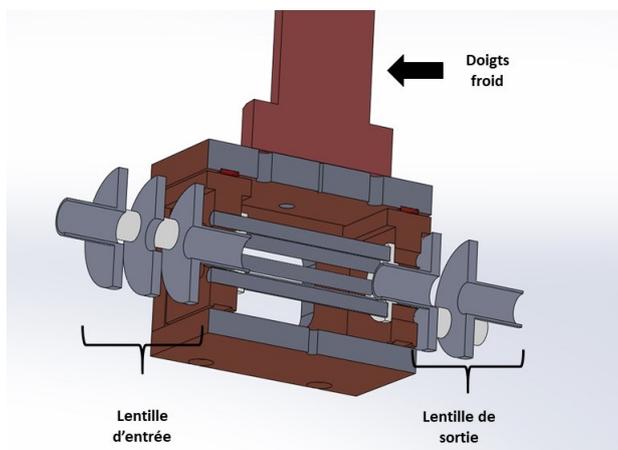


Figure 2.9 – Schéma de l'octopole refroidi monté à l'intérieur d'une boîte en cuivre en contact avec le doigt froid d'un cryostat à azote liquide.

2.9.1 . Double piégeage des ions

Un ajustement sur les tensions impulsionsnelles du dispositif à dû être réalisé pour pouvoir observer la présence de molécules complexées dans le piège à ion quadrupolaire. En effet, l'énergie cinétique de 220 V impulsée par le Gauss de la source, n'est pas gênant pour former des espèces hydratées dans l'octopôle

refroidi. Cependant, nous nous sommes rendus compte que la différence entre l'énergie cinétique des ions et la tension de le piège de Paul provoquait la dissociation des hydrates.

L'énergie cinétique des ions a donc été ajustée à 155 V en appliquant une tension de -155 V sur le Gauss de la source. La tension (V) de l'octopôle refroidi est fixée à une valeur très proche de l'énergie des ions 150 V. Les ions sont focalisés à l'entrée de l'octopôle avec une lentille portée à une tension de 152 V. Une tension de 158 V est appliquée à la sortie de l'octopôle pour contenir les ions dans la trappe. Pour extraire les ions de l'octopôle cette tension est abaissée à une valeur de l'ordre 120/130 V. La tension du piège quadrupolaire est donc elle aussi ajustée à 150V pour ne pas fragmenter les complexes.

2.9.2 . Modifications de la séquence impulsionnelle

L'ajout d'un élément dans le dispositif modifie forcément la séquence d'impulsions, la vanne de gaz de l'octopôle refroidi est ouverte quelques millisecondes avant l'arrivée des ions, un temps de piégeage entre 1 et 5 ms est suffisant pour maximiser la quantité de complexes formés. La tension du pulseur d'extraction est abaissée pendant un temps compris entre 10 à 20 μ s pour laisser suffisamment de temps aux complexes de sortir de l'octopôle. La vanne de gaz du piège de Paul est déclenchée en fonction du temps de piégeage des ions dans l'octopôle refroidi de l'ordre de 2 à 3 ms avant l'extraction de l'octopôle.

2.9.3 . Premiers complexes formés dans l'octopôle refroidi

Les premiers tests de complexation ont été réalisés sur la tyrosine protonée avec comme solvant de complexation l'acétone. On a choisi l'acétone comme molécule complexante car elle possède un moment dipolaire important, ce qui facilite la formation de complexes en formant des interactions de type électrostatique, tout en ayant la possibilité de former des liaisons hydrogène avec son atome d'oxygène. La tyrosine est un bon candidat à la fois pour former des liaisons hydrogène avec ses fonctions acide carboxylique, amine et alcool. Le spectre de masse de la tyrosine complexée par des molécules d'acétone dans l'octopôle refroidi puis piégée dans le piège de Paul est représenté sur la figure 2.10. Sur ce spectre, les

complexes sont formés à 120 K dans l'octopole refroidi. On peut observer que l'ion principal est toujours la tyrosine protonée présentant un temps de vol de 33.65 μs , puis on observe une décroissance en intensité en fonction du nombre de molécules d'acétone complexées, chaque pic de masse étant séparé d'environ 1 μs . A cette température les complexes les plus intenses sont les complexes comprenant peu de molécules de solvant.

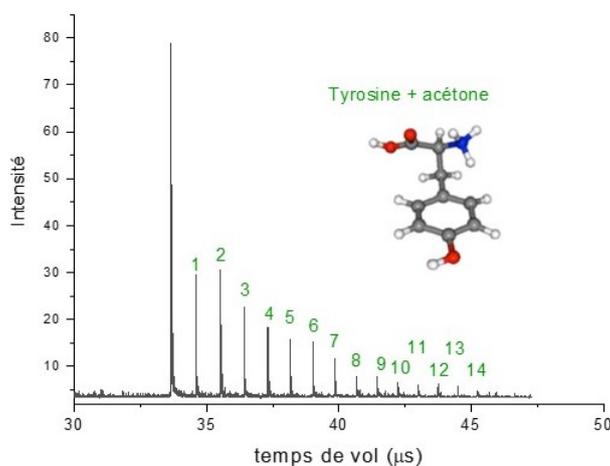


Figure 2.10 – Spectre de masse des complexes de la tyrosine protonée (m/z 82) avec des molécules d'acétone ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$, masse = 58 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) à 80 K. Le nombre de molécules d'acétone, n , qui constitue le complexe $\text{Tyr}-(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_n$ est indiqué.

Nous avons ensuite étudié l'effet de la température du piège sur la distribution en taille des complexes qui peuvent être formés. Pour illustrer cet effet, nous avons choisi le dipeptide Lysine-Tyrosine protoné avec l'eau comme molécule de solvant. Ce peptide possède de nombreux sites permettant de réaliser des liaisons hydrogène. On peut voir dans la figure 2.11 la distribution en population des complexes formés à 130 K et à 90 K. En travaillant à 130 K, environ 60% des peptides observés sur le spectre de masse sont complexés, en formant majoritairement des petits complexes. En diminuant la température de l'octopôle refroidi, on voit que le signal du dipeptide parent n'a pratiquement pas évolué, alors que la distribution des complexes se déplace vers des valeurs m/z plus importantes.

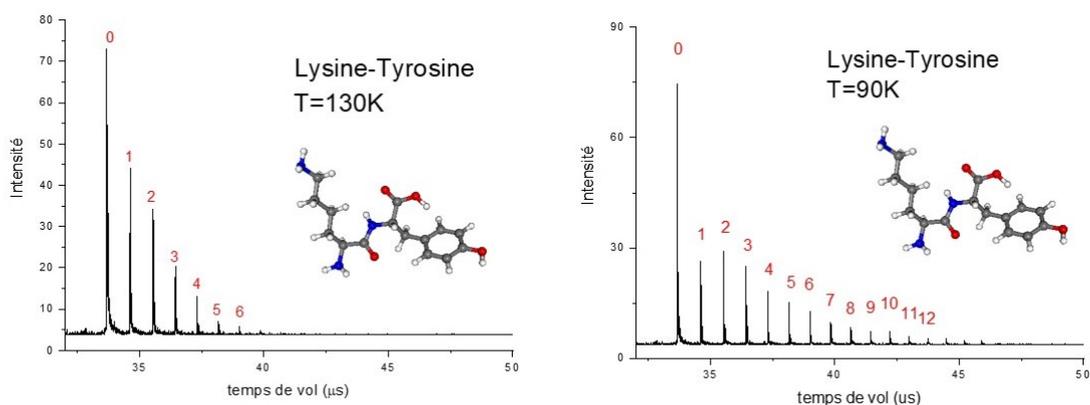


Figure 2.11 – Spectre de masse des complexes hydratés du dipeptide Lysine-Tyrosine formés à 130 K et 90 K

Enfin, nous avons enregistré le spectre de photodissociation UV d'un complexe bien connu dans la littérature avec l'exemple du tryptophane protonée complexé avec deux molécules d'eau (voir figure 2.12). Le tryptophane protoné est connu pour présenter un spectre de photodissociation UV très large à basse température. Mercier et al ont démontré en 2006 qu'en ajoutant deux molécules d'eau dans sa sphère de solvatation, on obtenait un spectre du tryptophane résolu [61]. On a donc formé des complexes de tryptophane hydratés et enregistré le spectre du conformère présentant deux molécules d'eau, qui reproduit parfaitement le spectre obtenu par Mercier et al.

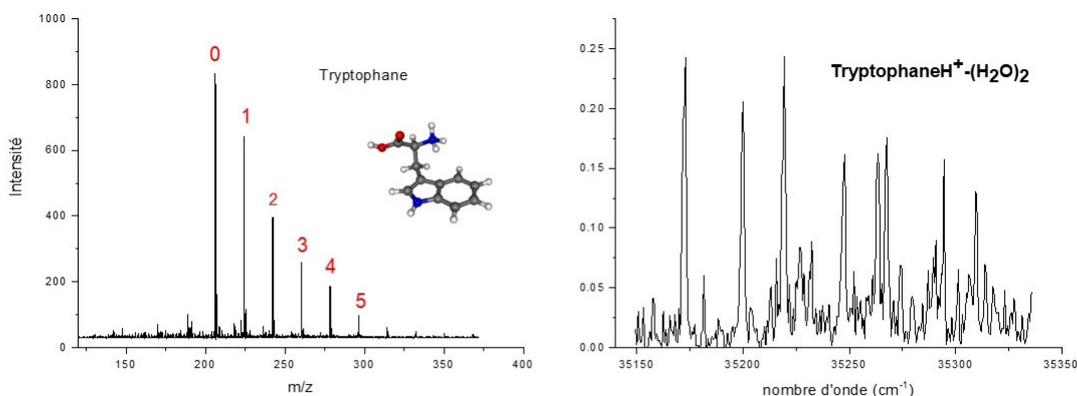


Figure 2.12 – Spectre de masse du tryptophane protoné hydraté et spectre de photodissociation UV du complexe doublement hydraté.

3 - Techniques et Méthodes

Dans ce chapitre, je détaille le principe de plusieurs techniques que j'ai utilisées au cours de ma thèse. Je vais bien entendu discuter du principe de spectroscopie de photo dissociation qui est le socle de départ de toutes nos expériences. Par la suite, je vais détailler les méthodes permettant d'apporter des informations sur les processus de relaxations d'une molécule. Enfin, je m'attarderai sur les moyens permettant d'identifier et de caractériser différents conformères pouvant être piégés dans le piège de Paul.

3.1 . Spectroscopie de Photodissociation UV

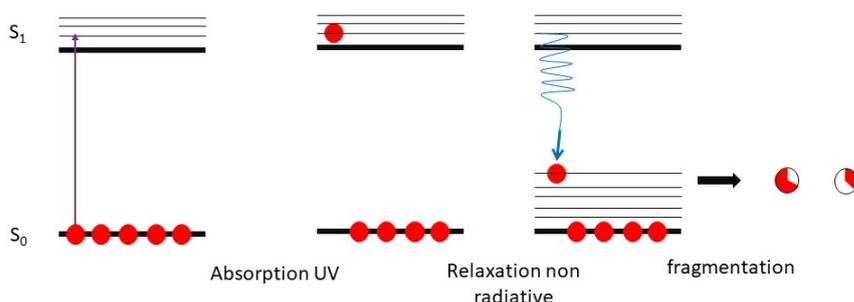


Figure 3.1 – Schéma de photodissociation UV

La photodissociation est une technique qui consiste à déposer de l'énergie interne dans un système comme une molécule (neutre ou chargée) à l'aide d'un photon, l'excès d'énergie du système entraîne la rupture reproductible d'une ou plusieurs liaisons chimiques. La figure 3.1 donne une représentation schématique de la technique de photodissociation UV. Cette technique peut permettre de remonter à des informations sur l'énergie de liaison des liaisons rompues. Les fragments créés peuvent donner des indices sur la conformation ou la présence de différents isomères selon le mécanisme de dissociation. La photodissociation apporte un complément aux expériences de CID (dissociation induite par collision), l'énergie apportée par collision n'étant pas suffisante dans certains systèmes pour

induire une fragmentation. La fragmentation après absorption d'un photon UV peut très bien se réaliser dans un état excité mais tout aussi bien après un retour dans l'état fondamental, ces retours à l'état fondamental se réalisent avec une importante énergie interne souvent suffisante pour franchir les barrières de dissociation et entraîner la fragmentation du système. Les fragments obtenus après un retour à l'état fondamental sont souvent similaires à ceux obtenus par CID. La spectroscopie de photodissociation consiste ensuite à mesurer l'intensité des fragments induits par l'absorption du photon UV, tout en scannant la longueur d'onde du laser. Les fragments sont créés uniquement lorsqu'un photon est résonnant avec un état excité de l'ion, à chaque résonance le signal du fragment va augmenter sur le spectre de masse et former une bande d'absorption.[79] [80]

3.2 . Expérience Pompe-Sonde

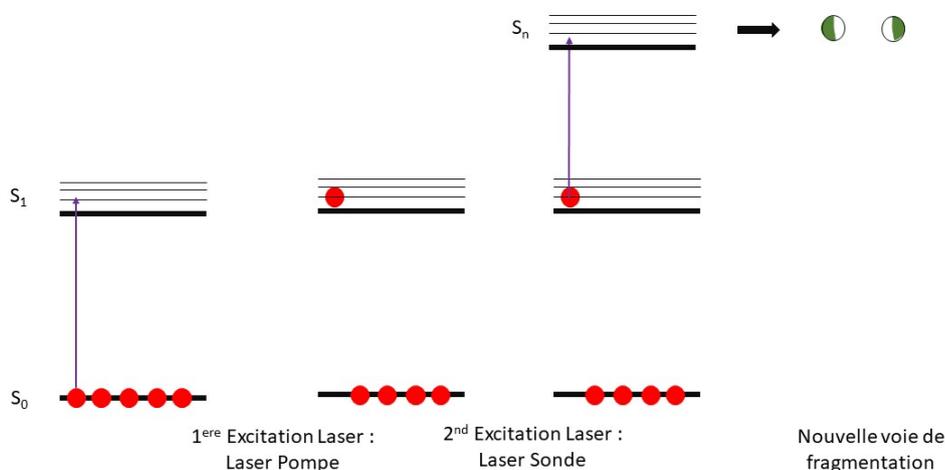


Figure 3.2 – Schéma d'expérience pompe sonde

Les expériences pompe-sonde schématisées en figure 3.2, permettent de sonder une population après excitation par un laser UV dans un état excité et d'observer l'évolution temporelle de cette population. Pour réaliser une expérience pompe-sonde il faut utiliser deux lasers, un laser de pompe et un laser de sonde.

Le laser de pompe permet de porter une population de l'état fondamental vers un état excité lorsque l'énergie du laser résonne avec une transition du système étudié. Le deuxième laser est utilisé pour venir sonder la population présente dans un état excité. Il est important de souligner la particularité des expériences pompe-sonde basées sur un signal de photo-dissociation. En effet, le laser de pompe seul entraîne la formation de fragments. Pour mesurer un signal pompe+sonde, il est nécessaire que le laser de sonde induise un changement dans le rapport de branchement des voies de fragmentation et/ou dans le cas idéal l'apparition de nouveaux fragments. Quand on est dans un cas idéal, on observe sur le spectre de masse l'apparition de nouveaux fragments et la diminution en intensité des fragments "primaires", c'est à dire issus du laser de pompe. En effet la combinaison de deux lasers UV ou Visible apporte suffisamment d'énergie dans le système pour ouvrir de nouvelles voies de fragmentations permettant la création de nouveaux fragments. La dépopulation de l'état excité par le laser sonde diminue la population empruntant les anciennes voies de fragmentation "primaires", ce qui se traduit par la diminution de ces fragments. Il faut aussi s'assurer que le laser de sonde n'absorbe pas la population encore dans l'état fondamental pour former des fragments qui pourraient s'ajouter au signal à deux couleurs sans être représentatif de la population dans un état excité.

Dans les expériences pompe-sonde, on mesure l'intensité des fragments en fonction du décalage temporel entre le laser de pompe et le laser de sonde, ce qui permet de mesurer l'évolution d'une population dans un état excité au cours du temps. Le signal pompe-sonde obtenu est modélisé par une simple exponentielle décroissante convoluée par une fonction Gaussienne :

$$S(t) = S_0 + \frac{S_1}{2} \left[1 + \operatorname{erf} \left(\frac{t - t_0}{I_0} \right) \right] e^{-\frac{t-t_0}{\tau}} \quad (3.1)$$

avec la fonction d'erreur

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-t^2} dt \quad (3.2)$$

Les paramètres I_0 et t_0 sont fixés par l'expérience avec I_0 la largeur de la gaussienne qui dépend du profil temporel des faisceaux lasers, avec notre laser pico-

seconde, la largeur I_0 est fixée à 15 ps. Le temps t_0 correspond au temps zero entre le laser de pompe et le laser de sonde.

Le paramètre S_0 correspond au signal précédant le signal pompe-sonde et S_1 l'amplitude du signal pompe-sonde, S_1 dépend de la population présente dans l'état excité et de la section efficace d'absorption de l'état excité. La modélisation du signal permet ainsi d'extraire la constante de temps τ associée à la durée de vie de l'état excité.

La figure 3.3 présente les principaux cas de signaux pompe-sonde observés sur les nouveaux fragments. Le premier cas présente un signal à deux couleurs qui diminue jusqu'à ce que l'intensité du signal retourne à sa valeur initiale (pompe seule). Pour simuler ce signal on utilise une exponentielle décroissante décrite dans l'équation 3.1.

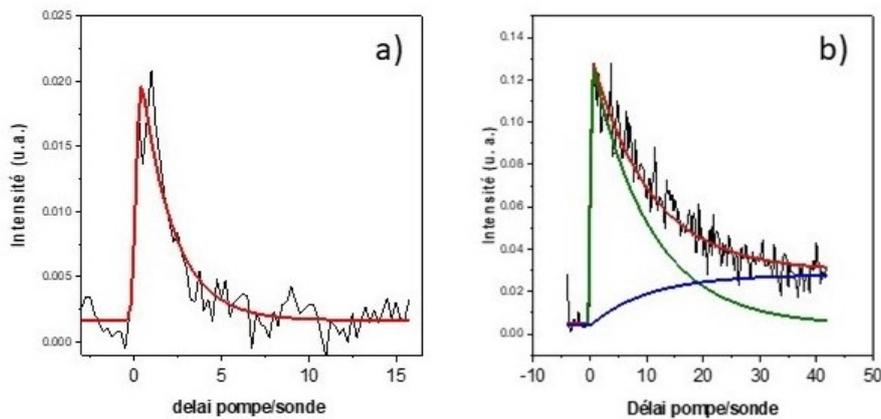


Figure 3.3 – Cas typique de signaux pompe sonde observés sur les nouveaux fragments a) simulation avec une mono-exponentielle décroissante b) simulation avec exponentielle décroissante + exponentielle croissante

Dans le second cas présenté on voit que le signal ne revient pas à zéro sur l'échelle observée, mais décroît jusqu'à un palier. Pour simuler ce signal pompe-sonde on utilise deux exponentielles, une croissante et l'autre décroissante avec la même constante de temps. La courbe verte correspond à l'exponentielle décroissante que l'on attribue à un état en cours de désexcitation avec une durée caractéristique τ . La courbe bleue est l'exponentielle croissante que l'on attribue

à un état en cours de population avec un temps caractéristique τ . Le paramètre S_2 de l'équation 3.3 est fixé à partir de l'intensité du palier observé.

$$S(t) = S_0 + \frac{S_1}{2} [1 + \operatorname{erf}(\frac{t - t_0}{I_0})] e^{-\frac{t-t_0}{\tau}} + \frac{S_2}{2} [1 + \operatorname{erf}(\frac{t - t_0}{I_0})] (1 - e^{-\frac{t-t_0}{\tau}}) \quad (3.3)$$

3.3 . Cinétique d'apparition de fragments

Les expériences de cinétique d'apparition des fragments consistent à estimer différents processus temporels de fragmentation. Pour cela, on décale l'extraction des ions présents au sein du piège par rapport à l'envoi du laser UV. On mesure l'intensité des différents fragments en fonction du délai temporel entre le laser et l'extraction des ions. Décaler le temps d'extraction des ions permet d'obtenir une information sur les différents processus temporels qui conduisent à une fragmentation à l'état fondamental. Usuellement, le temps d'extraction des ions est très éloigné de l'excitation laser, environ 15 à 30 ms d'écart. L'extraction du piège quadripolaire est contrôlée par un générateur d'impulsion (GINI) qui a une résolution de 10 ns. Le facteur principal limitant la résolution est le temps nécessaire à l'électrode de sortie de la trappe pour atteindre sa valeur nominale qui est de l'ordre de 100 ns, qui correspond au temps de montée du pulseur utilisé pour extraire les ions de la trappe. L'échelle des expériences de cinétique d'apparition de fragments est donc de l'ordre de quelques centaines de ns jusqu'à 50 ms ce qui est la limite atteignable avant le début d'un nouveau cycle.

Pour simuler le signal expérimental on utilise cette fois la convolution d'une gaussienne avec une exponentielle croissante :

$$S(t) = S_0 + \frac{S_1}{2} [1 + \operatorname{erf}(\frac{t - t_0}{I_0})] (1 - e^{-\frac{t-t_0}{\tau}}) \quad (3.4)$$

les paramètres de la formule ne changent pas, à l'exception de S_1 qui correspond à l'intensité maximale du signal de fragmentation. La constante de temps extraite de cette formule donne une estimation du temps d'apparition des fragments.

3.4 . Hole-Burning UV-UV

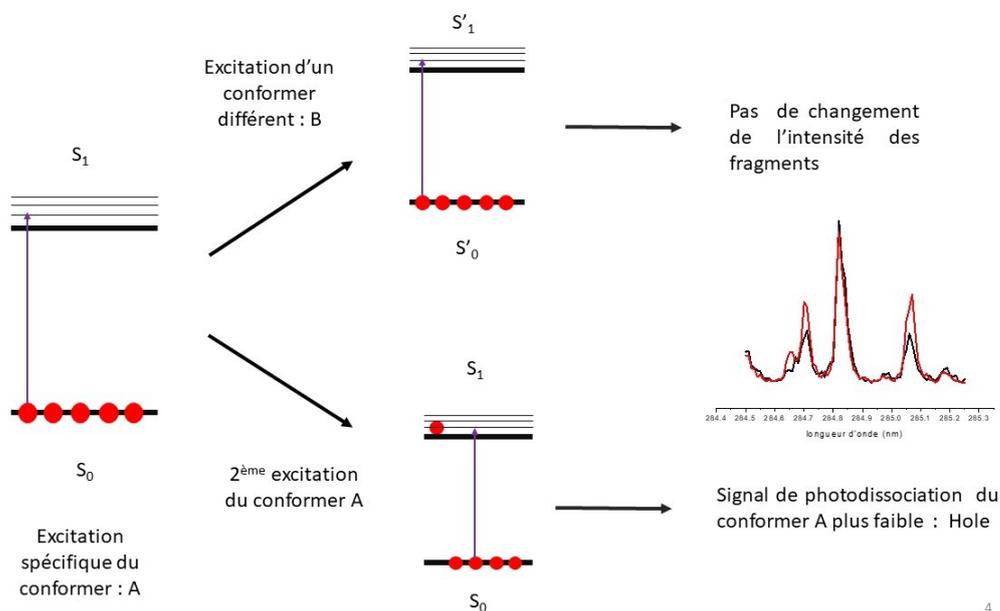


Figure 3.4 – Schéma d'expérience Hole-Burning UV-UV

Le spectre de photo-dissociation obtenu peut être constitué de plusieurs isomères qui donnent les mêmes fragments. Un moyen de différencier les bandes provenant d'isomères différents est de réaliser la spectroscopie UV-UV hole burning. En 2014 Kang et al ont décrit une méthode de hole burning spécifique aux pièges à ions quadripolaires.[76] Le principe de base est similaire aux expériences hole burning réalisées en jet moléculaire : un laser UV (appelé laser : burn) est utilisé pour exciter spécifiquement un isomère, c'est à dire que la longueur d'onde est fixée sur une transition vibronique du spectre UV. Un second laser accordable est utilisé pour enregistrer le spectre UV. L'innovation de cette technique était de pouvoir différencier le signal des fragments créés par le laser burn du signal des fragments créés par le laser accordable. Pour séparer ces deux composantes, on utilise la technique du "tickle" décrite précédemment. Le laser de burn est envoyé environ 30 ms après le piégeage des ions dans la trappe pour dépeupler une conformation de la trappe. Les fragments créés sont ensuite éjectés de la trappe en appliquant une tension radiofréquence externe spécifique au fragment. Pour éjecter complètement les ions, la radiofréquence de tickle est appliquée pendant

plusieurs millisecondes. L'ion parent, qui n'est pas affecté par la radiofréquence, est ensuite excité par le laser accordable pour enregistrer le spectre UV. Ce laser est envoyé quelques microsecondes avant l'extraction des ions.

En procédant ainsi, toutes les bandes vibroniques reliées à la bande vibronique, excité par le laser burn, vont diminuer en intensité. Pour obtenir le signal hole-burning, il suffit ensuite de faire la différence entre le spectre UV sans laser burn et le spectre UV avec laser burn. Pour ce faire, le laser burn est déclenché à 5 Hz tandis que le laser accordable est déclenché à 10 Hz. Un pulseur envoie une double déclenche à l'oscilloscope ce qui permet d'enregistrer le spectre de masse à 5 Hz et celui à 10 Hz. De ce fait, chaque pic du spectre de masse est dédoublé avec un pic correspondant au signal à 5 Hz et un pic au signal à 10 Hz. Le pic à 5 Hz correspond aux fragments créés par les deux lasers tandis que le pic à 10 Hz ne comprend que les fragments créés par le laser de scan.

Comme le montre le schéma figure 3.4 deux cas de figure vont être observés. Lorsqu'une bande provient de l'isomère excité par le premier laser, une partie de la population de l'état fondamental a déjà été excitée, il y a donc moins de molécules dans l'état fondamental ce qui implique que moins de molécules vont être excitées par le laser UV, ce qui va se traduire par une plus faible quantité de fragments. Expérimentalement, on observe donc une bande moins intense, ainsi chaque bande spécifique de l'isomère excité présente un trou dans le spectre UV. Dans le cas contraire, le ou les isomères qui ne sont pas excités par le premier laser conservent la même population dans l'état fondamental et leurs bandes garderont la même intensité.

Une autre technique peut être utilisée, elle consiste à séparer les fragments provenant du laser de burn et du laser accordable en fonction de leur temps de vol. Le laser de burn est envoyé dans le piège indépendamment de l'envoi du laser accordable. Le laser accordable est envoyé au moment de l'extraction des ions. Pour rappel, l'extraction est réalisée avec un pulseur créant un différentiel de 350 V, qui possède un temps de montée de 80 ns. Les fragments formés dans le temps de montée du pulseur ne vont donc pas avoir la même énergie cinétique que les ions créés par le laser de burn et ne vont donc pas arriver au même moment sur

le détecteur et former deux pics différents du même fragment. Pour avoir une bonne séparation des deux pics, le laser de scan est envoyé environ 50 ns après le déclenchement du pulseur. Pour avoir un bon rapport signal sur bruit, le laser de burn est déclenché à 5 Hz et le laser accordable à 10 Hz. Pour enregistrer le spectre de masse à 5 Hz et celui à 10 Hz, un générateur de pulses envoie un signal de double déclenche à l'oscilloscope. L'analyse du TOF présente ainsi 4 pics pour un seul fragment, deux provenant du spectre de masse à 5 Hz et deux provenant du signal à 10 Hz. Les signaux des deux déclenches sont décalés d'environ $2 \mu\text{s}$ de façon à éviter un recouvrement entre différents pics de masse.[81]

3.5 . Hole-Burning IR-UV

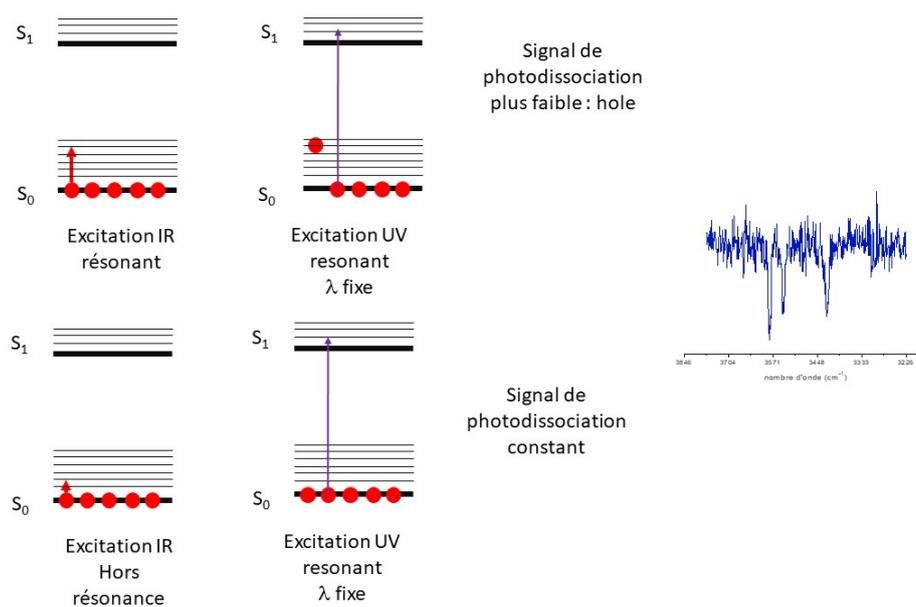


Figure 3.5 – Schéma d'expérience Hole-Burning IR-UV

La technique de hole-burning peut aussi être réalisée en combinant un laser IR et un laser UV. Le laser UV est fixé à une longueur d'onde résonnante avec un isomère spécifique. Le laser IR est envoyé avant le laser UV et permet de dépeupler l'état fondamental. Lorsque le laser IR dépeuple l'isomère sondé par le laser UV qui est fixé sur une de ses transitions vibroniques, le signal des fragments créés par le laser UV est fortement diminué. De cette façon, suivant le laser accordable

utilisé, on peut obtenir la spectroscopie électronique d'un isomère mais aussi sa spectroscopie infrarouge.

3.6 . Spectroscopie IR avec laser UV non résonnant

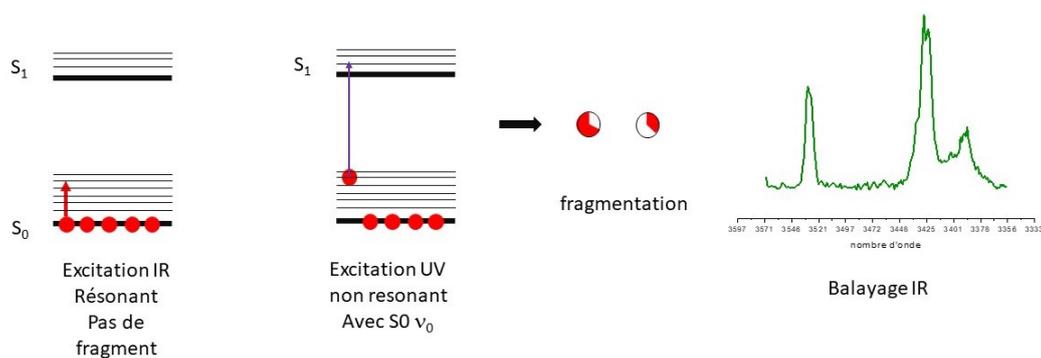


Figure 3.6 – Schéma d'expérience de spectroscopie infrarouge avec un laser UV non résonnant

Un autre moyen d'obtenir le spectre IR de certaines molécules est dans un premier temps d'utiliser un laser IR pour créer un état fondamental chaud puis d'utiliser un laser UV non résonnant avec l'état vibrationnel fondamental, avec une énergie du laser inférieure à l'énergie de la transition 0_0^0 . Ainsi le laser UV est absorbé par la population excitée vibrationnellement à l'état fondamental pour atteindre un état excité et former des fragments. La formation des fragments est conditionnée par l'absorption du laser IR, résonnant avec une transition vibrationnelle dans S_0 , et le laser UV. Balayer le laser IR permet ensuite d'enregistrer la spectroscopie IR de toutes les espèces qui sont susceptibles de former ce fragment. Cette technique permet d'avoir un très bon rapport signal sur bruit mais nécessite que l'espèce présente un spectre UV relativement large pour être sûr que la combinaison IR+UV puisse atteindre un mode de l'état excité.

3.7 . Spectroscopie de photodissociation IR de complexes hydratés

Dans le cas des complexes hydratés, la spectroscopie IR peut être obtenue uniquement avec le laser IR, un ou plusieurs photons IR dans la région des modes

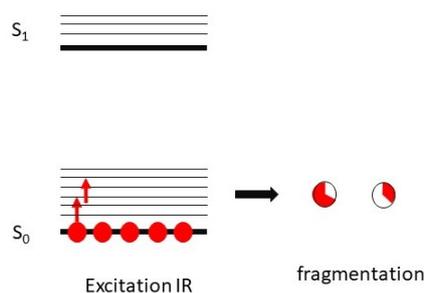


Figure 3.7 – Schéma de spectroscopie infrarouge des complexes hydratés

d'élongations des liaisons hydrogènes covalentes ($2000-4000\text{ cm}^{-1}$) permet de dissocier l'hydrate en perdant la molécule d'eau.

Les modes infrarouges que nous allons observer sont principalement les modes d'élongations N-H et O-H situés dans la région $3000-3700\text{ cm}^{-1}$. En absorbant un photon IR, les complexes vont gagner environ $0,37-0,46\text{ eV}$ d'énergie interne, cette valeur est inférieure à l'énergie de liaison des complexes monohydratés dont l'énergie est plutôt située entre $0,5$ et 1 eV . Un seul photon IR n'est donc pas suffisant pour dissocier le complexe, il faut au moins deux à trois photons IR pour y parvenir. Dans le cas où l'excitation IR conduit à la fragmentation, comme c'est le cas avec les complexes hydratés, on se retrouve d'un point de vue expérimental dans la même situation que dans le cas du hole burning UV/UV. On peut alors adopter les mêmes techniques, auxquelles on peut ajouter une autre qui tient compte des spécificités des bases de l'ADN, en particulier le fait que les formes tautomériques absorbent dans l'UV dans des régions spectrales bien différentes.

L'unique photo-fragment IR étant le monomère de l'espèce hydratée on peut se poser la question si le fragment possède une signature de la tautomérie de sa forme hydratée, en particulier pour les molécules possédant ces formes telles que la cytosine et l'uracile protonée. Connaître la tautomérie d'un fragment permettrait ainsi d'apporter une information complémentaire sur le conformère à l'origine de ce fragment. Pour obtenir cette information, on forme le photo-fragment, à partir d'une bande du spectre IR, proche du pulse de gaz du piège de Paul (à environ $2-4\text{ ms}$ sur la séquence impulsionnelle) pour que le gaz résiduel de la

chambre puisse refroidir les fragments formés. Ensuite on utilise le fait que les tautomères protonés des bases de l'ADN absorbent dans des régions spectrales différentes. On balaye donc avec un laser UV dans la région des bandes d'origine de chaque tautomère et on observe la présence (ou l'absence) des fragments du monomère, ce qui permet d'en déduire donc la tautomérie de l'hydrate à l'origine du fragment.

3.8 . Calculs de chimie quantique

Les méthodes utilisées pour les calculs des états électroniques (optimisation de géométrie, états excités et calculs de fréquences des modes normaux dans l'approximation harmonique) sont décrites ci-dessous. Nous avons principalement utilisé les méthodes CC2 (*Coupled Cluster*) avec le logiciel TURBOMOLE [82] et DFT avec le logiciel GAUSSIAN 16 [83].

3.8.1 . Méthodes CC2

Les calculs *ab initio* ont été effectués avec le logiciel TURBOMOLE (v7.1) en utilisant l'approximation de la résolution de l'identité (RI pour *Resolution of Identity* en anglais) pour l'évaluation des intégrales de répulsion électronique.[84] Les géométries d'équilibre de l'état électronique fondamental S_0 et des états excités singulets et triplets ont été déterminées au niveau CC2 (pour *second-order Coupled Cluster*) [85] avec comme base aug-cc-pVDZ.[86] Les calculs SCS-CC2 (SCS pour Spin-Component Scaled) ont été réalisés en complément, car ils permettent une meilleure description des états à transfert de charge qu'avec la méthode CC2.[87]

3.8.2 . Méthodes DFT

Nous avons aussi effectué des calculs en utilisant la théorie de la fonctionnelle de densité (DFT, sigle pour *Density Functional Theory*). Les géométries ont été optimisées au niveau B3LYP/6-311++G(3df,2p) et wB97X-D/6-311++G(3df,2p). Les fréquences ont également été calculées dans l'approximation harmonique. Nous avons choisi ces deux niveaux de calcul en se basant sur les études disponibles dans la littérature, notamment sur les complexes monohydratés. [67] La

fonctionnelle wB97X-D permet de prendre en compte les effets de dispersions et permet notamment de mieux décrire les interactions non-covalentes ce qui est particulièrement adapté pour le cas des espèces mono-hydratée

3.9 . Simulations Franck-Condon

Pour simuler les spectres Franck-Condon, nous avons choisi d'utiliser le code *ezFCF* (anciennement connu sous le nom *ezSpectrum*) qui fait partie de la suite de logiciel libre *ezSpectra*.^[88] *ezFCF* calcule les progressions vibrationnelles (spectre bâton) pour l'excitation électronique ou les spectres de photoélectrons pour les molécules polyatomiques dans le cadre de l'approximation double harmonique, c'est-à-dire que l'état initial et l'état final sont décrits par un potentiel harmonique. Pour réaliser ces calculs *ezFCF*, nous avons besoin des géométries à l'équilibre, des fréquences harmoniques et des vecteurs des modes normaux pour chaque état électronique. De plus, nous pouvons également indiquer la température, qui dépend des conditions expérimentales, et l'énergie d'excitation ou d'ionisation.

ezFCF permet de calculer les facteurs Franck-Condon soit en utilisant l'approximation de mode parallèle (ou *parallel mode approximation* en anglais), soit en utilisant les rotations de Dushinsky. Le calcul peut être effectué en dimensionnalité complète ou réduite, avec des seuils en énergie d'excitation et de nombre de modes de vibrations peuplés.

Les fichiers de sortie contiennent :

- Les coordonnées alignées de l'état initial et de l'état final.
- La matrice de recouvrement des modes normaux de vibration.
- Les déplacements pour chaque mode de vibration.
- Les facteurs de Franck-Condon ainsi que les intensités.

3.10 . Recherche conformationnelle

Pour explorer le paysage conformationnel, nous avons effectué une recherche conformationnelle en utilisant le programme CREST (Conformer-Rotamer Ensemble Sampling Tool)^[89] associé au programme xtb, développé dans le groupe de Grimme.^[90]

Les structures sont calculées en utilisant une méthode semi-empirique *Tight Binding DFT* GFN2-xTB, méthode développée pour calculer les structures, les fréquences vibrationnelles et les interactions non-covalentes pour des tailles de systèmes moléculaires pouvant contenir jusqu'à ~1000 atomes.[91] Cette méthode est particulièrement intéressante pour les systèmes biochimiques comme les (métallo-) protéines, l'ARN et l'ADN et leurs interactions inter et intramoléculaires.

4 - Processus de relaxation dans les bases protonées de l'ADN

Dans ce chapitre, je m'intéresse aux processus de relaxation des bases protonées de l'ADN, en particulier l'implication des états à transfert de charge et des états triplets à longues durées de vie dans les mécanismes de relaxation. Pour rappel, des expériences pompe-sonde ont permis de mesurer trois constantes de temps sur des échelles différentes pour la cytosine protonée[60]. Ces constantes de temps et les calculs théoriques ont permis d'identifier la nature des états excités participant au processus de relaxation, et c'est ainsi qu'un mécanisme de relaxation a été proposé.

Dans une première partie je vais m'intéresser au processus de relaxation des formes kéto et énol de l'uracile protonée. Je présenterai dans un premier temps les spectres de photodissociation UV. Puis, je présenterai les résultats des expériences de cinétique d'apparition des fragments et les expériences pompe-sonde résolues en énergie. Je m'appuierai sur les résultats des calculs SCS-CC2 pour proposer les mécanismes de relaxation qui peuvent s'opérer. Ensuite, nous verrons l'évolution de ces mécanismes dans la thymine, qui présente peu de changements structuraux par rapport à l'uracile protonée. Les résultats sur la guanine protonée seront également présentés ainsi qu'une discussion sur les processus non-radiatifs qui peuvent s'opérer.

4.1 . L'uracile protonée

Le schéma de photofragmentation de l'uracile protonée UH^+ présente trois fragments majoritaires : la perte de NH_3 , H_2O , et la perte de HNCO conduisant aux fragments m/z 96, m/z 95 et m/z 70 (voir spectre de masse de la figure 4.1). Ce schéma de fragmentation est observé aussi par la technique de dissociation induite par collision (CID pour Collision-Induced Dissociation).

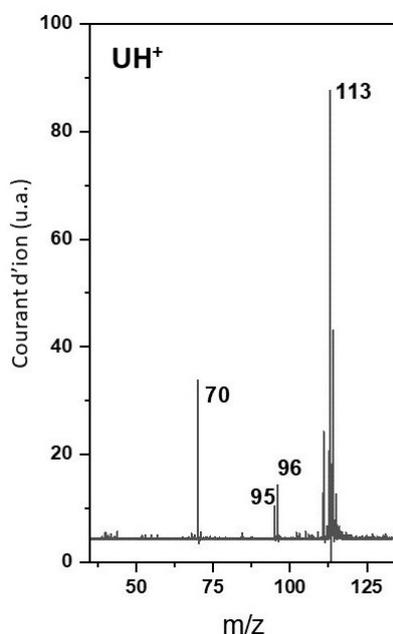


Figure 4.1 – Spectre de masse de l'uracile protonée avec les fragments induits par photoexcitation.

La spectroscopie électronique de l'uracile protonée a déjà été publiée à basse température (30 K) et à température ambiante (300 K). Deux régions d'absorption distinctes ont été identifiées autour de 3,95 eV (314 nm) et 4,68 eV (265 nm) qui correspondent respectivement à la région d'absorption des tautomères kéto et énoI (voir figure 4.2).

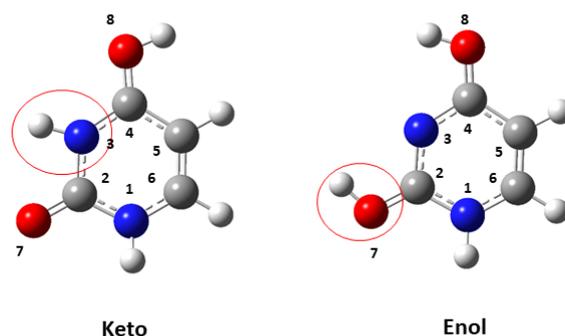


Figure 4.2 – Représentation des tautomères de l'uracile protonée. Le cercle rouge indique la localisation de la charge positive. Les atomes du cycle sont numérotés de 1 à 6.

La spectroscopie de l'uracile protonée (voir figure 4.3) présente bien deux zones d'absorption : une autour de 314 nm et une autre région autour de 265 nm. Le spectre n'a pas été enregistré entre 300 et 260 nm mais a déjà été publié par Berdakin et al. [92] sur le domaine 320-230 nm et est directement comparable à notre spectre de photodissociation. Dans la partie la plus rouge, le spectre présente une succession de bandes très fines ($\sim 13 \text{ cm}^{-1}$ de large), tandis que dans la partie la plus bleue, les bandes ont une largeur beaucoup plus importante ($\sim 200 \text{ cm}^{-1}$). Ces deux zones d'absorption correspondent aux deux formes tautomères, kéto-énol (appelée par "kéto" la suite) et énol-énol (appelée "énol" par la suite) présentes dans le piège de Paul.

Le spectre de photodissociation de la figure 4.3(a) est celui du tautomère kéto tandis que le spectre de photodissociation de la figure 4.3(b) est celui du tautomère énol, qui absorbe à plus haute énergie. Chaque isomère correspond à un site de protonation différent de l'uracile possédant à la fois un groupe lactame et un groupe lactime. Le tautomère le plus stable (énol) est protoné sur l'oxygène du lactame, le tautomère kéto plus haut en énergie de 0.08 eV[92] est quant à lui protoné sur l'azote du groupe lactime. Les affinités protoniques de chaque atome ont été calculées par Turecek et al [93] en 2000, et ont mis en évidence une affinité protonique plus importante sur l'atome d'oxygène O₇ ($\approx 920 \text{ kJ.mol}^{-1}$) puis ensuite sur l'atome d'azote N₃ ($\approx 860 \text{ kJ.mol}^{-1}$) (voir figure 4.2 pour la numérotation

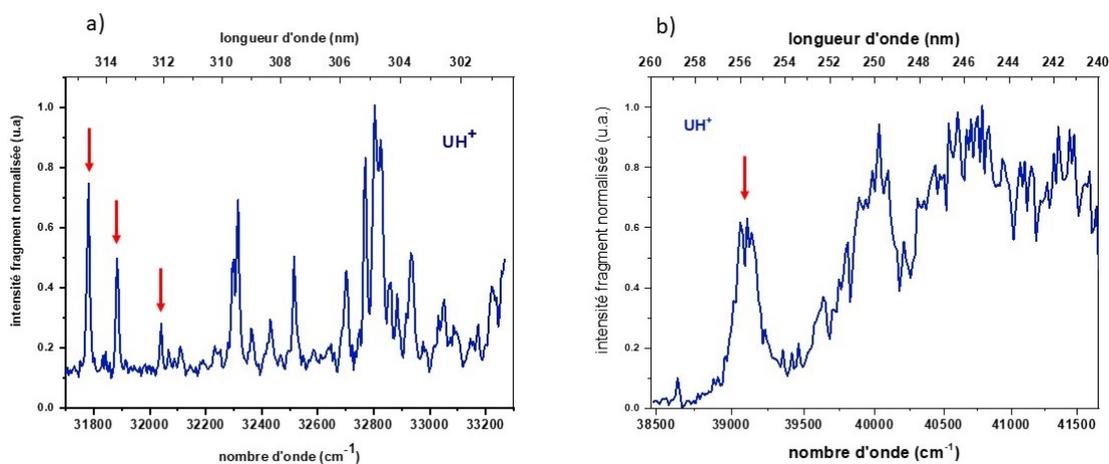


Figure 4.3 – Spectre de photodissociation UV de l'uracile protonée, enregistré et moyenné sur l'ensemble des fragments : m/z 70, m/z 95 et m/z 96. a) spectroscopie dans la région du kéto, b) spectroscopie dans la région de l'énol. les flèches rouge indique les transitions dont les résultats des expériences de cinétiques d'apparition de fragments et des expériences pompe-sonde sont présentés dans la suite du chapitre

des atomes).

4.1.1 . Forme kéto de l'uracile protonée

La spectroscopie de photodissociation UV de l'uracile protonée dans la région du tautomère kéto entre 31500 et 38000 cm^{-1} , présente une spectroscopie résolue qui correspond à une progression vibronique, c'est-à-dire une succession de bandes d'excitation du niveau vibrationnel le plus bas de l'état fondamental ($\nu = 0$) vers plusieurs niveaux vibrationnels d'un état excité. La première transition est située à 31765 cm^{-1} et correspond à la bande origine du tautomère kéto. Les successions de bandes vibroniques localisées autours de 32300 cm^{-1} et 32800 cm^{-1} proviennent des modes de vibration de respiration caractéristiques des cycles aromatiques comportant six atomes, comme déjà observés dans les bases de pyrimidines neutres.[94]

4.1.2 . Cinétique d'apparition des fragments du tautomère kéto de l'uracile protonée

Les temps d'apparition des photofragments ont été enregistrés avec plusieurs excès d'énergie en fixant la longueur d'onde de pompe sur chaque transition vibronique du spectre de photodissociation UV. Les trois photofragments primaires m/z 70, m/z 95 et m/z 96 ont la même constante de temps d'apparition, ce qui suggère une dissociation unimoléculaire de UH^+ à l'état fondamental. A partir de la bande à $+260 \text{ cm}^{-1}$, le temps d'apparition des photofragments est constant de l'ordre de $300 \pm 50 \text{ ns}$, ce qui est comparable à la limite de résolution expérimentale. On peut seulement en déduire que le temps d'apparition est égal ou supérieur à 300 ns .

En regardant sur la bande origine et la première transition vibronique à $+101 \text{ cm}^{-1}$, les temps d'apparition sont significativement plus longs, de l'ordre de $15 \mu\text{s}$ et $11 \mu\text{s}$, respectivement. (voir figure 4.4).

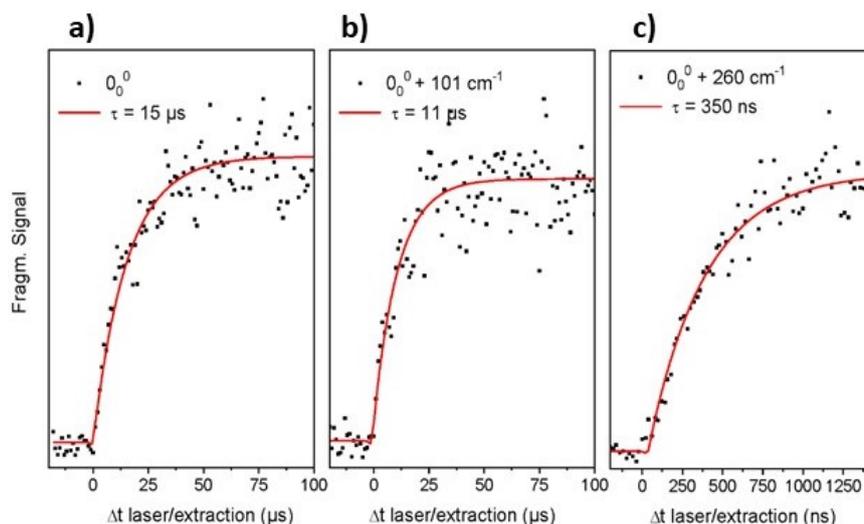


Figure 4.4 – Cinétique d'apparition du fragment m/z 70 : (a) sur la bande origine 0_0^0 , (b) sur la bande à $+101 \text{ cm}^{-1}$ d'excès d'énergie et (c) sur la bande à $+260 \text{ cm}^{-1}$ d'excès d'énergie. Les courbes en rouge représentent une simulation avec des constantes de temps $\tau = 15 \mu\text{s}$, $11 \mu\text{s}$ et 350 ns sur les trois premières bandes du spectre de photodissociation, respectivement.

Les constantes d'apparition des fragments primaires en fonction de l'énergie

des photons sont rapportées sur une échelle semi-logarithmique sur la figure 4.5. Comme on peut le voir, la constante de temps change d'un facteur 50 en seulement 260 cm^{-1} . Ce comportement non linéaire de la cinétique d'apparition des fragments ne peut pas s'expliquer simplement par une augmentation de l'énergie interne présente dans la population s'étant relaxée vers le fondamental.

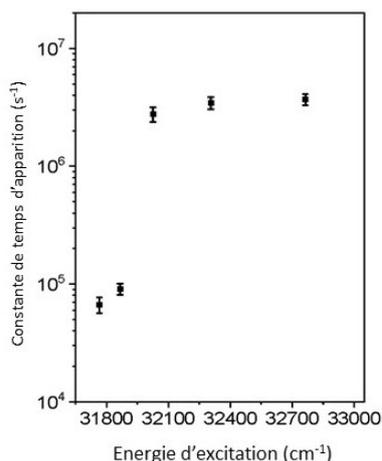


Figure 4.5 – Evolution des temps d'apparition des fragments de l'uracile protonée kéto, $1/\tau$ (s^{-1}), en fonction de l'énergie d'excitation.

Les voies de fragmentation conduisant aux pertes de NH_3 , H_2O et HNCO ont été étudiées d'un point de vue théorique par Rossich Molina et al.[95] Pour chaque canal de dissociation, l'énergie de l'état de transition le plus élevé, qui détermine l'étape limitante de la cinétique de fragmentation, est calculée entre 2,8 eV et 3,1 eV. De plus, l'énergie des photons sur la bande origine (3,94 eV) dépasse d'environ 1 eV les barrières énergétiques les plus élevées conduisant aux principaux fragments dans l'état fondamental. On peut donc en conclure que si la molécule retourne à l'état fondamental par conversion interne avec cette énergie de 3,94 eV, on est très éloigné du seuil de dissociation on ne devrait pas observer une si forte variation de la cinétique d'apparition avec $+260 \text{ cm}^{-1}$ d'énergie supplémentaire dans le système.

Comme nous le verrons dans la suite de ce chapitre, nous suggérons qu'au moins deux processus de désactivation indépendants à l'état fondamental entrent en compétition après l'excitation électronique de la forme kéto de UH^+ avec un

changement drastique à partir de $+260 \text{ cm}^{-1}$ au-dessus de la bande origine.

4.1.3 . Expériences pompe-sonde sur le tautomère kéto

Des expériences pompe-sonde de photodissociation ont été réalisées pour suivre l'évolution de la population après l'absorption d'un photon UV. Les premières expériences pompe-sonde ont été effectuées en fixant la longueur d'onde de pompe sur la bande origine du tautomère kéto déterminée par la spectroscopie de photodissociation UV. En se plaçant sur la bande origine, on s'assure de mettre le minimum d'énergie possible dans le système, ce qui permet de porter la molécule dans un état électroniquement excité, sans énergie dans les modes de vibration. La combinaison de la pompe UV et d'une sonde UV entraîne une diminution de l'intensité des photo-fragments primaires m/z 70, m/z 95 et m/z 96 ainsi que l'apparition de nouveaux fragments dans le spectre de masse. Nous verrons que les nouveaux fragments créés ne sont pas identiques en fonction de l'échelle temporelle et en fonction de la longueur d'onde de la sonde.

Le spectre de masse de la figure 4.6(a) à deux couleurs montre que l'on a bien une diminution de l'intensité des fragments primaires m/z 70, m/z 95 et m/z 96, et l'apparition du fragment m/z 43 avec un laser de sonde à 625 nm. Il est important de noter que ce fragment m/z 43 n'est observé qu'à l'échelle ps, ce fragment est donc spécifique à une population excitée à l'échelle ps. Le décalage temporel entre le laser de pompe et le laser de sonde à l'échelle ps permet d'observer un signal transitoire sur les fragments en déplétion et les fragments en augmentation. Le signal transitoire du fragment m/z 43 ne présente pas un déclin jusqu'à la ligne de base. Ceci est dû à la limite expérimentale de la ligne à retard que nous utilisons pour décaler temporellement le laser de pompe et le laser de sonde car la longueur de la platine limite les expériences pompe-sonde à un délai maximum de 1,5 ns. Donc, la limite expérimentale ne permet pas de mesurer précisément la durée de vie de cet état, on extrait néanmoins une constante de temps à partir du signal transitoire, ce qui permet d'estimer la durée de vie de cet état excité à une durée supérieure à 5 ns. Il est important de préciser que la somme des fragments est constante en fonction du délai entre le laser de pompe et le laser de sonde.

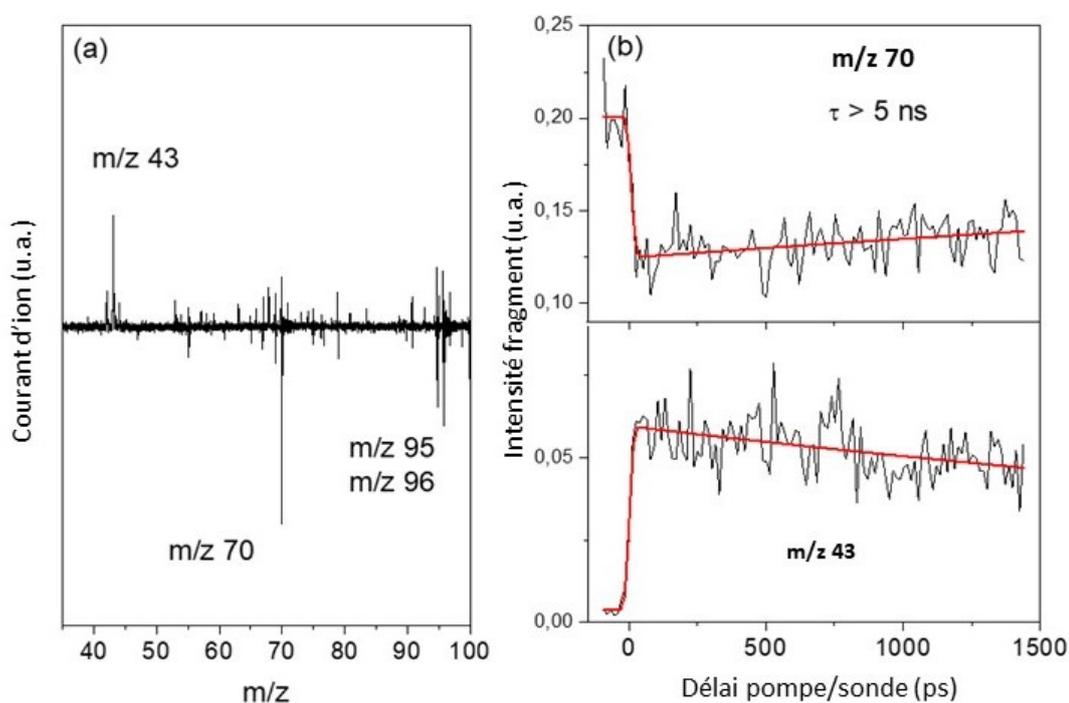


Figure 4.6 – Signaux pompe-sonde sur la bande origine du tautomère kéto de l'uracile protonée à l'échelle ps. a) Spectre de masse à deux couleurs de UH^+ excité sur la bande origine et sondé à 625 nm à l'échelle ps. Ce spectre de masse est obtenu en faisant la différence du spectre de masse avec les deux lasers, pompe et sonde, et le spectre de masse avec le laser de pompe seul. b) Signal transitoire sur les fragment m/z 70 et m/z 43 à l'échelle ps. En rouge simulation avec une constante de temps de 5 ns.

Le changement de voie de dissociation entre la fragmentation UV et la fragmentation UV + sonde est donc caractéristique d'une population qui a été déplacée. Le signal transitoire mesuré peut donc bien être associé à une durée de vie d'un état excité.

Les expériences pompe-sonde ont ensuite été poursuivies sur une échelle μs avec un laser de sonde à 625 nm. On peut remarquer sur le spectre de masse à deux couleurs de la figure 4.7 la présence de deux nouveaux fragments m/z 42

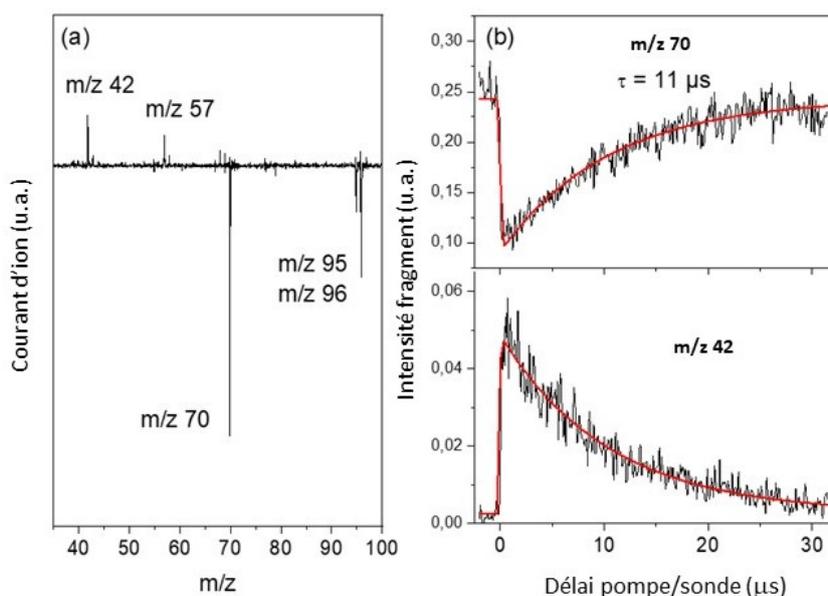


Figure 4.7 – Signaux pompe-sonde sur la bande origine du tautomère kéto de l'uracile protonée à l'échelle μs . a) Spectre de masse à deux couleurs de UH^+ excité sur la bande origine et sondé à 625 nm à l'échelle μs . Ce spectre de masse est obtenu en faisant la différence du spectre de masse avec les deux lasers, pompe et sonde, et le spectre de masse avec le laser de pompe seul. b) Signal transitoire sur les fragment m/z 70 et m/z 42 à l'échelle μs . En rouge simulation avec constante de temps de $11\mu s$

et m/z 57 ainsi que la disparition du fragment m/z 43. Les fragments primaires, m/z 70, m/z 95 et m/z 96, continuent de présenter une déplétion de leurs signaux à deux couleurs à l'échelle μs . Nous mesurons un signal transitoire sur un domaine allant jusqu'à $30\mu s$ pour l'ensemble des fragments. Une durée de vie d'une dizaine de microsecondes est estimée en modélisant le signal par une exponentielle décroissante. Le signal transitoire ne revient pas complètement lui aussi à zéro dans cette fenêtre temporelle. Ce comportement signifie que même après plusieurs dizaines de microsecondes, un signal à deux couleurs est toujours observé.

Le signal à deux couleurs restant après la mesure de deux déclin de population pourrait être dû à l'absorption du laser de sonde par l'ensemble des fragments primaires qui fragmenteraient à nouveaux pour former les ions m/z 42 et

m/z 57. Cette hypothèse semble néanmoins peu probable car le laser de sonde utilisé est dans le domaine du visible. En effet, dans l'uracile protonée il semble admis que les fragments primaires soient des espèces à couche fermée. Ces espèces n'absorbent pas dans le domaine (630-530 nm). De plus cela impliquerait que les fragments secondaires seraient issus des fragments primaires, ce qui ne semble pas être le cas ici non plus puisque le fragment m/z 42 est probablement relié au fragment neutre complémentaire du fragment m/z 70. Une autre hypothèse serait qu'à l'échelle microseconde on sonderait un autre état excité. Pour vérifier cette hypothèse on réalise l'expérience pompe-sonde à une échelle milliseconde. Il apparaît que lorsque l'on passe à l'échelle ms, le laser de sonde dans le domaine visible (625-550 nm) ne permet plus d'obtenir un signal à deux couleurs. Cette absence de signal à deux couleurs sur l'échelle ms peut signifier que la population excitée par le laser de pompe c'est complètement relaxée vers l'état fondamental. Une autre possibilité serait que la population excitée se soit relaxée vers un autre état excité mais que le laser de sonde ne soit pas assez énergétique pour sonder cette population.

Pour poursuivre ces expériences, nous avons alors choisi comme sonde un laser à 355 nm. Comme on peut le voir sur la figure 4.8, on retrouve un spectre de masse à deux couleurs en utilisant une sonde avec plus d'énergie. On remarque cette fois que le fragment principal est le fragment m/z 40 qui n'a pas été observé dans les échelles temporelles précédentes. Le fragment m/z 42 est aussi présent mais moins intense que le fragment m/z 40. Une déplétion est toujours observée sur les fragments primaires. En faisant varier le délai pompe-sonde sur une dizaine de ms on peut observer un déclin transitoire sur l'ensemble des fragments. La modélisation par une exponentielle décroissante permet d'obtenir une durée de vie de l'ordre de 2 ms. On peut constater que le signal des fragments secondaires disparaît totalement après quelques ms, les fragments primaires quant à eux retrouvent leur intensité maximale.

En résumé, les expériences pompe-sonde avec le laser de pompe fixé à la longueur d'onde de la transition origine ont permis de mesurer trois constantes de temps sur trois échelles de temps différents : $\tau_1 > 5$ ns, $\tau_2 \simeq 11$ μ s et $\tau_3 \simeq 2$ ms. Nous

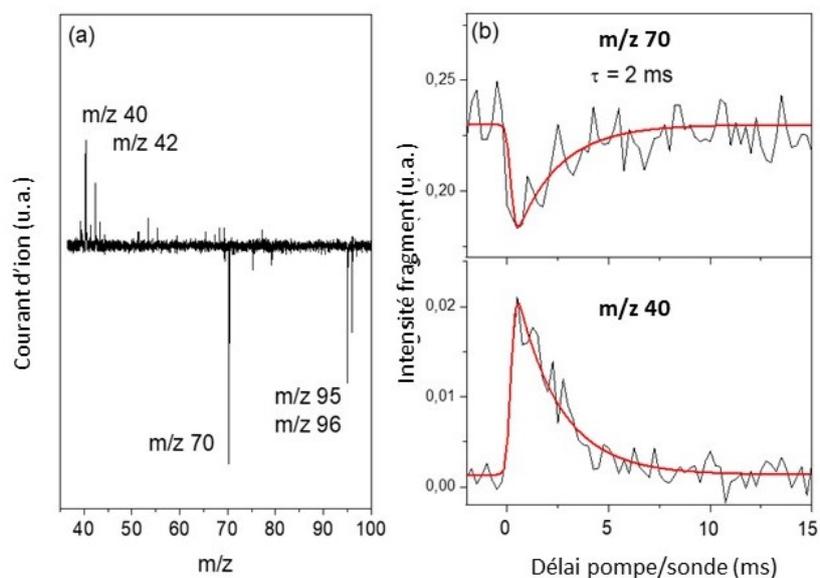


Figure 4.8 – Signaux pompe-sonde sur la bande origine du tautomère kéto de l'uracile protonée à l'échelle ms. a) Spectre de masse à deux couleurs de UH^+ excité sur la bande origine et sondé à 355 nm à l'échelle ms. Ce spectre de masse est obtenu en faisant la différence du spectre de masse avec les deux lasers, pompe et sonde, et le spectre de masse avec le laser de pompe seul. b) Signal transitoire sur les fragment m/z 70 et m/z 42 à l'échelle ms En rouge simulation avec une constante de temps de 2 ms.

avons mesuré des constantes de temps similaires en fixant la longueur d'onde du laser de pompe sur la transition vibronique à $+101 \text{ cm}^{-1}$ par rapport à la transition origine. Dans la suite de ce chapitre, nous verrons l'attribution de ces temps aux différents états électroniques impliqués dans les processus de relaxation, grâce notamment aux calculs théoriques, comme cela a été fait dans le cas de la cytosine protonée. [60] En effet, les trois constantes de temps sur les trois échelles de temps différentes, pour ces deux premières bandes du spectre, évoquent un mécanisme de désexcitation comparable à celui de la cytosine protonée. [60]

Des expériences pompe-sonde ont été réalisées sur plusieurs bandes plus hautes en énergie, à partir de 260 cm^{-1} d'excès d'énergie dans le système. Les fragments créés par un laser de sonde à 355 nm sont les fragments m/z 40 et m/z 44 et on observe une déplétion sur tous les fragments primaires. Les signaux pompe-

sonde de la figure 4.9 ont été réalisés avec un laser d'excitation à 306,95 nm et enregistrés sur le fragment m/z 40. A l'échelle ps le signal transitoire est similaire à celui observé sur la bande origine et la première transition vibronique. La longueur de la ligne à retard ne permettant pas d'explorer plus loin l'échelle ps on peut seulement estimer une durée de vie supérieure à 5 ns de l'état excité. A l'échelle microseconde, le signal sur le fragment m/z 40 est constant sur une échelle de 40 μs , ce qui diffère du signal transitoire observé avec le laser de pompe sur la bande origine à 314,05 nm. Les expériences pompe-sonde ont donc été poursuivies sur l'échelle ms. Aux temps longs, on peut observer un signal transitoire sur le fragment m/z 40 qui permet de mesurer une durée de vie de l'ordre de 2 ms, une durée de vie du même ordre de grandeur avait aussi été mesurée avec le laser de pompe à 314,05 nm.

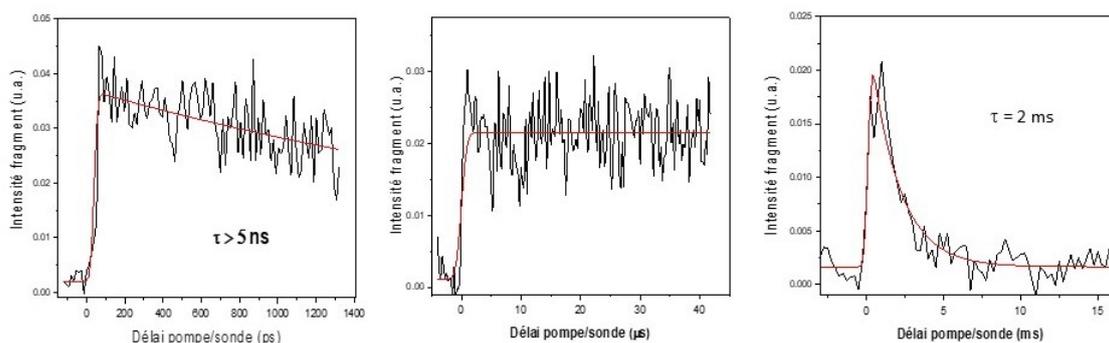


Figure 4.9 – Signaux pompe-sonde enregistrés sur le fragment m/z 40 avec un laser d'excitation à 306,95 nm à l'échelle ps, μs et ms.

En résumé, à partir de la deuxième bande vibronique ($+260 \text{ cm}^{-1}$) du spectre de photodissociation, les expériences pompe-sonde ont permis de mettre en évidence la disparition de la composante μs . Rappelons que les expériences de cinétique d'apparition des fragments ont permis de mettre en évidence un changement drastique à partir de cette bande vibronique à $+260 \text{ cm}^{-1}$ d'excès d'énergie par rapport à la bande origine.

4.1.4 . Calculs Coupled Cluster (CC2) des états excités du tautomère kéto

Des calculs *ab initio* ont été réalisés pour connaître la nature et la position énergétique des premiers états excités, singulets et triplets de UH^+ dans sa forme kéto. Un calcul vertical depuis l'état fondamental (forme plane, appartenant au groupe de symétrie C_s) permet de connaître la nature des premiers états excités accessibles optiquement (voir table 4.1). Le premier état excité S_1 est accessible à partir d'une transition $\pi \rightarrow \pi^*$, le second état excité S_2 a un caractère à transfert de charge ${}^1n_O\pi^*$. Cet état ${}^1n_O\pi^*$ peut être décrit par le transfert d'un électron d'une orbitale moléculaire localisée sur un doublet libre de l'oxygène du carbonyle vers une orbitale antiliante du cycle aromatique. La force d'oscillateur est très importante pour le ${}^1\pi\pi^*$ (0,1258) alors que l'état $n_O\pi^*$ présente une force d'oscillateur très faible (0,00002) ce qui semble suggérer que l'excitation de UH^+ kéto par un laser UV autour de la bande origine décrit principalement une transition vers l'état ${}^1\pi\pi^*$.

Les calculs CC2 permettent d'obtenir une bonne description de la géométrie optimisée à l'état fondamental et de l'état excité S_1 ainsi que l'énergie de la transition adiabatique, c'est-à-dire la différence en énergie entre l'état fondamental et l'état excité, corrigée de l'énergie de point zéro. Ce type de calcul a déjà été réalisé sur des systèmes de tailles similaires aux bases de l'ADN/ARN, la différence d'énergie de transition obtenue entre la valeur expérimentale et la valeur calculée est de l'ordre de $\pm 600 \text{ cm}^{-1}$ ($\pm 0,075 \text{ eV}$) sur ces systèmes. [59]

Les calculs SCS-CC2 (SCS pour Spin-Component Scaled) ont été réalisés en complément, car ils permettent une meilleure description des états à transfert de charge qu'avec la méthode CC2.[87] L'étude sur la cytosine protonée a montré l'importance de ces états dans le processus de relaxation, il est donc important de pouvoir bien les localiser.

L'énergie de la transition adiabatique, en SCS-CC2 est calculée à 3,88 eV, ce qui est très proche de la valeur expérimentale de 3,94 eV alors que la méthode CC2 semble sous-estimer légèrement cet état de 0,21 eV. D'après le tableau 4.1 l'ordre en énergie des optimisations de géométries de l'état ${}^1n_O\pi^*$ est différent en fonction de la méthode de calcul utilisée : le calcul SCS-CC2 donne l'état ${}^1n_O\pi^*$

	SCS-CC2	CC2
$^1\pi\pi^*$		
Energie en vertical	4,40(0,1258)	4,36
Energie adiabatique	3,88±0,2	3,73±0,2
$\Delta E_{pi\pi^*/0_0^0}$	-0,06	-0,21
$^1nO\pi^*$		
Energie en vertical	5,61(0,00002)	4,98
Energie adiabatique	4,05±0,2	3,23±0,2
$\Delta E_{n\pi^*/\pi\pi^*}$	+0,17	-0,5
$^3\pi\pi^*$		
Energie adiabatique	3,37	3,28

Table 4.1 – Energies d'excitation verticales et adiabatiques au niveau SCS-CC2 et CC2 avec comme base aug-cc-pVDZ de la forme kéto de l'uracile protonée. Les forces d'oscillateur sont données entre parenthèses. La valeur expérimentale de la transition 0_0^0 est de 3,94 eV.

à 0,17 eV plus haut en énergie que l'état $^1\pi\pi^*$, alors que le calcul CC2 donne une valeur optimisée de l'état $^1n_O\pi^*$ à 0,5 eV plus bas que l'état $^1\pi\pi^*$. Par contre, le calcul vertical donne toujours l'état $^1n_O\pi^*$ plus haut en énergie que l'état $^1\pi\pi^*$ indépendamment de la méthode, CC2 ou SCS-CC2. L'état $^1n_O\pi^*$ et $^1\pi\pi^*$ sont très proches en énergie, on peut donc penser qu'expérimentalement une population de l'état $^1\pi\pi^*$ pourrait peupler l'état $^1n_O\pi^*$.

A partir des géométries optimisées de l'état fondamental et du premier état excité, nous avons calculé les fréquences de chaque état avec les deux méthodes de calcul. Le calcul des fréquences permet de vérifier que nous sommes bien dans un minimum d'énergie potentielle (absence de fréquences négatives), mais aussi de simuler le spectre dans la région Franck-Condon (FC). Les spectres simulés comparés au spectre expérimental de l'uracile protonée dans la zone d'absorption du kéto sont représentés sur la figure 4.10.

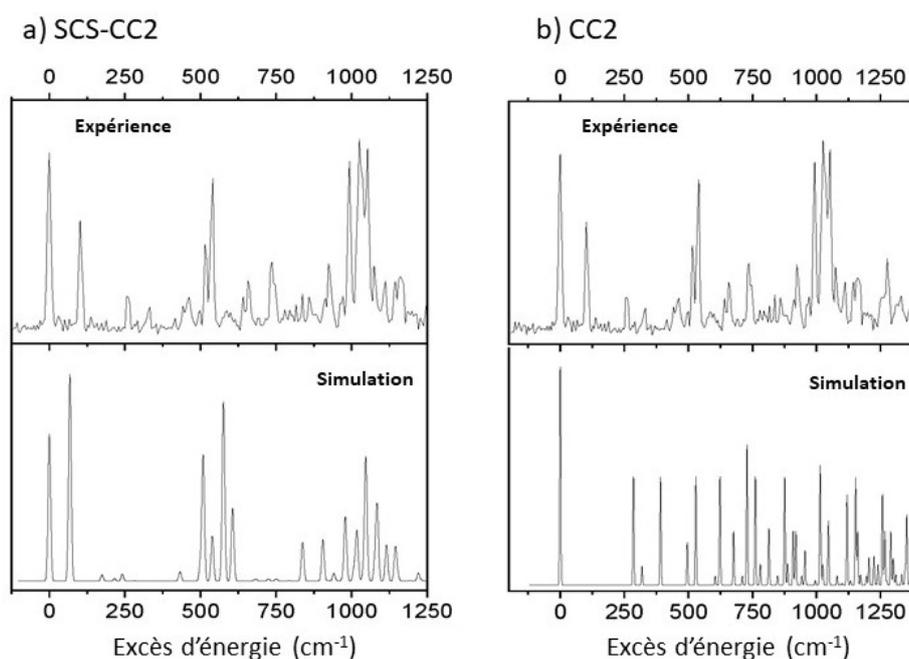


Figure 4.10 – Simulations Franck-Condon du spectre UV de la forme kéto de l'uracile protonée. a) Spectre expérimental comparé au spectre simulé au niveau SCS-CC2/aug-cc-pVDZ. b) Spectre expérimental comparé au spectre simulé au niveau CC2/aug-cc-pVDZ.

On peut voir que le spectre simulé au niveau SCS-CC2 est très proche du spectre

expérimental et reproduit précisément les deux premières transitions vibroniques : la bande origine et la bande à 100 cm^{-1} d'excès d'énergie. Les massifs vibroniques à $+500 \text{ cm}^{-1}$ et $+1000 \text{ cm}^{-1}$ d'excès d'énergie sont aussi reproduits dans la simulation. En revanche, la simulation Franck-Condon à partir des calculs CC2 est en désaccord avec le spectre expérimental. D'une part la bande à $+100 \text{ cm}^{-1}$ d'excès d'énergie n'est pas reproduite et d'autre part la simulation des bandes entre 250 et 1250 cm^{-1} d'excès d'énergie ne correspond pas au spectre expérimental. Au vue du faible écart entre l'énergie adiabatique calculée au niveau de calcul SCS-CC2 et la valeur expérimentale ainsi que de la simulation Franck-Condon qui permet d'obtenir une bonne reproduction du spectre expérimental, on peut donc en déduire que le niveau de calcul SCS-CC2 est une bonne approche pour représenter la structure des états excités de l'uracile protonée kéto. Comme cité précédemment la transition vibronique ν_1 à $+100 \text{ cm}^{-1}$ (figure a) 4.11) correspond à un mode de plissement du cycle aromatique. A partir de $+260 \text{ cm}^{-1}$, les transitions vibroniques observées correspondent à des modes de respiration du cycles aromatiques ainsi qu'à des déformations dans le plan de la molécule comme le montre la figure b) 4.11 représentant le mode ν_5 à $+260 \text{ cm}^{-1}$.

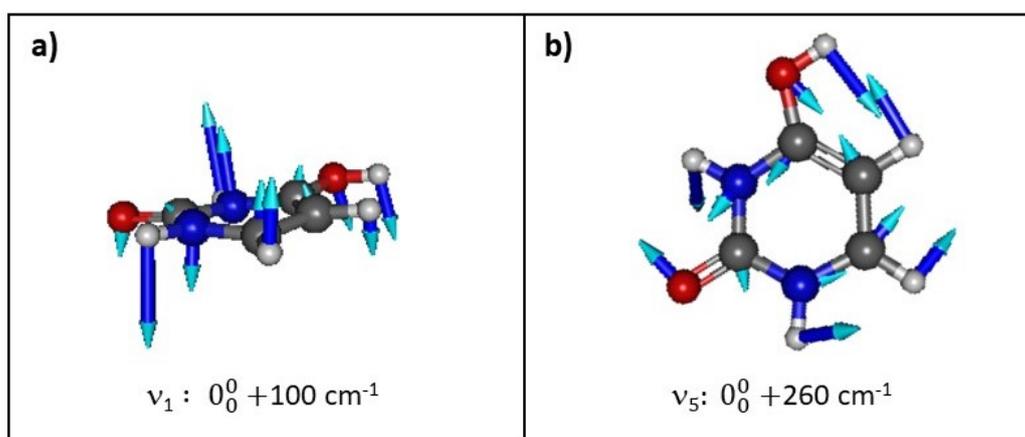


Figure 4.11 – Représentation des modes vibroniques à a)+100 et b)+260 cm^{-1} du tautomère keto de l'uracile protoné

Le bon accord entre le spectre simulé et le spectre expérimental permet entre

autre de confirmer la géométrie de l'état excité S_1 calculée en SCS-CC2. Les optimisations de géométrie réalisées au niveau SCS-CC2/aug-cc-pVDZ sont représentées sur la figure 4.12, l'état $^1\pi\pi^*$ présente une structure quasiment plane avec une légère distorsion du carbone en position 6 en dehors du plan. L'état $^1n_O\pi^*$ présente une structure complètement plane. L'état triplet $^3\pi\pi^*$ optimisé ressemble fortement à l'état singulet avec une légère distorsion hors plan du carbone 6 mais plus importante que pour l'état singulet.

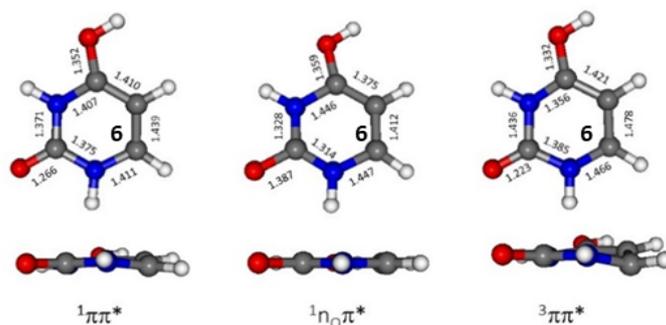


Figure 4.12 – Structures optimisées au niveau SCS-CC2/aug-cc-pVDZ des états excités $^1\pi\pi^*$, $^1n_O\pi^*$, $^3\pi\pi^*$.

4.1.5 . Processus de relaxation du tautomère kéto à l'état excité : bande origine et première bande vibronique à $+101\text{ cm}^{-1}$

Les calculs ont permis de s'assurer que l'état optiquement actif après une excitation UV à 314,05 nm (bande origine) correspond à une transition $\pi\pi^*$, d'une part car l'écart expérience/théorie est relativement faible et, d'autre part, parce que la simulation Franck-Condon est en accord avec le spectre de photodissociation.

Les optimisations de géométrie montrent que l'ordre en énergie entre l'état $^1\pi\pi^*$ et l'état $^1n_O\pi^*$ n'est pas franchement établi en fonction du niveau de calcul utilisé. Le calcul au niveau SCS-CC2 prédit la position de l'état $n_O\pi^*$ à 0,17 eV au dessus de l'état $^1\pi\pi^*$, ce qui devrait empêcher un possible transfert de population de l'état localement excité vers l'état à transfert de charge. Néanmoins, cet écart d'énergie est très proche des barres d'erreurs de ces niveaux de calculs (environ 0,2 eV [96]). Compte tenu des barres d'erreurs des calculs, on peut supposer que

les états $^1\pi\pi^*$ et $^1n_O\pi^*$ sont quasi-dégénérés et que la relaxation de l'état $^1\pi\pi^*$ vers l'état $^1n_O\pi^*$ est possible.

Le temps le plus court mesuré expérimentalement est un temps de plusieurs ns. Le spectre du tautomère kéto présente des bandes fines dont la largeur n'est limitée que par le contour rotationnel. Il convient de mentionner que la durée de vie radiative de l'état $^1\pi\pi^*$ est estimée à 12 ns tandis que celle de l'état $^1n_O\pi^*$ est de l'ordre de 50 μs , selon les forces d'oscillateur calculées des deux états.[97] Nous attribuons donc les constantes de temps ns et μs aux durées de vie de l'état localement excité $^1\pi\pi^*$ et de l'état $^1n_O\pi^*$, respectivement. Les expériences pompe-sonde à l'échelle μs , sur la bande origine et la première bande vibronique, montrent que la population évolue vers l'état à transfert de charge. Par ailleurs, la constante de temps ms révèle l'implication d'un état excité de longue durée de vie dans le processus de désactivation. Le croisement intersystème (ISC : Intersystem Crossing) de l'état $^1n_O\pi^*$ avec l'état $^3\pi\pi^*$ situé plus bas en énergie est autorisé selon les règles d'El-Sayed entre des états de symétries différentes.[98] Une fois la population piégée dans l'état triplet la dernière possibilité de relaxation est de retourner dans l'état fondamental par un croisement intersystème. La durée de vie mesurée ms semble être cohérente pour un état triplet puisque le passage d'un état $^3\pi\pi^*$ vers un état $^1\pi\pi^*$ est peu probable, le processus de retour au fondamental est donc très long et on peut attribuer la constante de temps ms à l'état $^3\pi\pi^*$. Nous proposons donc comme mécanisme de relaxation non-radiatif pour la forme kéto de l'uracile protonée sur la bande origine et la première bande vibronique : $^1\pi\pi^* \rightarrow ^1n_O\pi^* \rightarrow ^3\pi\pi^*$.

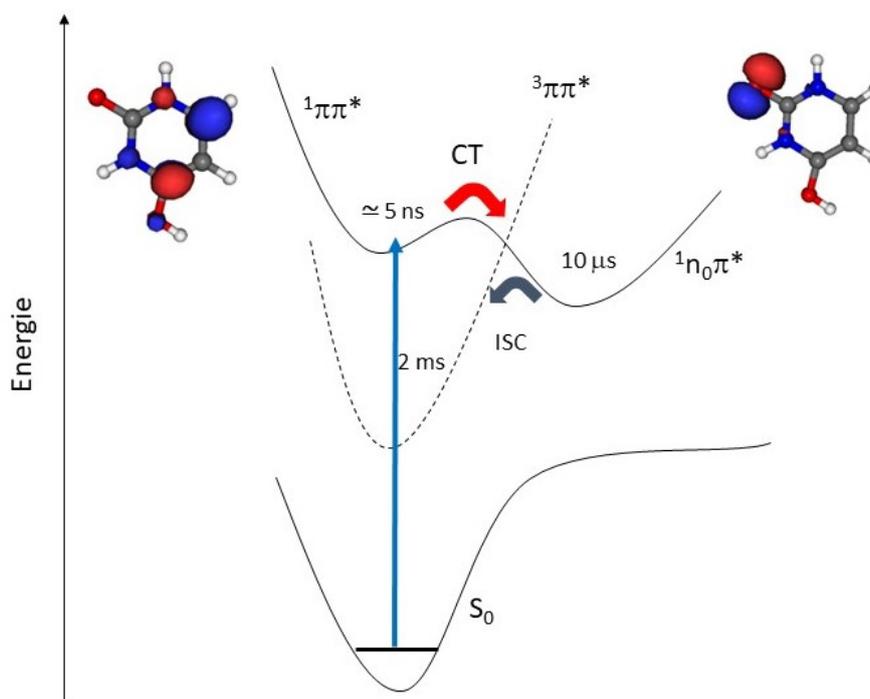


Figure 4.13 – Schéma du processus de relaxation proposé sur les deux premières bandes vibroniques du tautomère kéto de l'uracile protonée.

4.1.6 . Processus de relaxation du tautomer kéto à l'état excité : à partir de $+260 \text{ cm}^{-1}$ d'excès d'énergie

A partir de 260 cm^{-1} d'excès d'énergie dans l'état $^1\pi\pi^*$, l'absence de dynamique à l'échelle de temps μs traduit le fait que l'état $^1n_0\pi^*$ n'est plus impliqué dans le processus de désexcitation non-radiatif. Cependant, la constante de temps enregistrée sur l'échelle de temps ms à chaque bande vibronique révèle que la population à partir de l'état excité $^1\pi\pi^*$ se retrouve dans l'état excité $^3\pi\pi^*$ après un croisement intersystème. Bien que la probabilité d'un tel croisement entre états de même symétrie soit très faible en raison des éléments de couplage spin-orbite très faibles, les couplages spin-vibronique entre états presque dégénérés peuvent conduire à un transfert efficace de population vers le triplet. Par ailleurs, il convient de rappeler que la durée de vie de l'état localement excité est de l'ordre de la nanoseconde, ce qui ne nécessite donc pas des taux de croisement intersystème très élevés pour le transfert de population de l'état $^1\pi\pi^*$ vers l'état $^3\pi\pi^*$.

Pour pouvoir avoir un échange de population entre l'état $^1\pi\pi^*$ et l'état $^3\pi\pi^*$ il

faudrait que ces deux états soient dégénérés. Comme le montrent le tableau 4.1 et la figure 4.12, les états $^1\pi\pi^*$ et $^3\pi\pi^*$, dans la géométrie de l'état $^1\pi\pi^*$, sont très éloignés en énergie. Il faudrait donc un déplacement important sur la surface d'énergie potentielle pour trouver une région où ces deux états seraient dégénérés.

Pour explorer cette hypothèse, nous avons effectué des calculs MECP (Minimum Energy Crossing Points) avec le logiciel Turbomole pour localiser les régions de dégénérescence entre les états singulet et triplet $\pi\pi^*$. A la structure optimisée de l'état $^1\pi\pi^*$, l'état triplet se situe en dessous à 0,46 eV. Les calculs MECP conduisent à une structure avec un écart énergétique minimum de 0,04 eV entre les états singulet et triplet $^3\pi\pi^*$. A partir de cette géométrie, l'optimisation de la géométrie $^1\pi\pi^*$ conduit à un point de la surface d'énergie potentielle proche d'un croisement triple avec l'état triplet (écart en énergie de 0,12 eV) et l'état fondamental (écart en énergie de 0,95 eV). Cette structure est presque isoénergétique avec le minimum de la surface d'énergie potentielle de l'état $^1\pi\pi^*$ et ressemble beaucoup à celle calculée au niveau MS-CASPT2 pour l'uracile neutre[27] et notée **Eth-Col**. Ce chemin réactionnel optimisé au niveau SCS-CC2/aug-cc-pVDZ qui relie la structure optimisée de l'état $^1\pi\pi^*$ et la structure **Eth-Col** au voisinage du croisement triple $^1\pi\pi^*/^3\pi\pi^*/S_0$ est représenté sur la figure 4.14.

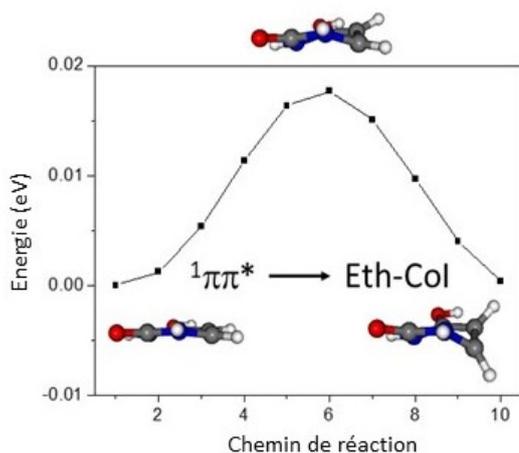


Figure 4.14 – Chemin réactionnel optimisé (SCS-CC2/aug-cc-pVDZ) reliant l'état $^1\pi\pi^*$ et la structure **Eth-Col** au voisinage du croisement triple $^1\pi\pi^*/^3\pi\pi^*/S_0$.

Cette structure **Eth-Col** présente une déformation hors plan avec une torsion

de la liaison $C_5=C_6$. Ce type de déformation est typique de la déformation de l'éthylène au niveau de l'intersection conique entre l'état $^1\pi\pi^*$ et l'état fondamental S_0 . Il convient de mentionner que les calculs CC2 ne peuvent pas tenir compte des croisements de courbes, de sorte que la surface d'énergie potentielle ne peut pas être décrite avec précision au niveau de la structure de l'intersection conique. Néanmoins, une intersection conique impliquant une déformation similaire de la liaison $C_5=C_6$ a été localisée pour UH^+ au niveau CASPT2 par Omidyan et al. [99], ce qui renforce notre résultat obtenu au niveau SCS-CC2. Les auteurs ont calculé la barrière permettant le passage à partir de la région Franck-Condon vers la région d'intersection conique en générant le chemin réactionnel par une interpolation linéaire des coordonnées internes. Le résultat du calcul donne une barrière d'environ 0,5 eV, ce qui représente une limite supérieure de la vraie barrière. Comme nous pouvons le voir sur la figure 4.14, le calcul au niveau SCS-CC2/aug-cc-pVDZ du chemin réactionnel optimisé reliant la structure du $^1\pi\pi^*$ à la structure **Eth-Col** présente une barrière très faible de 20 meV.

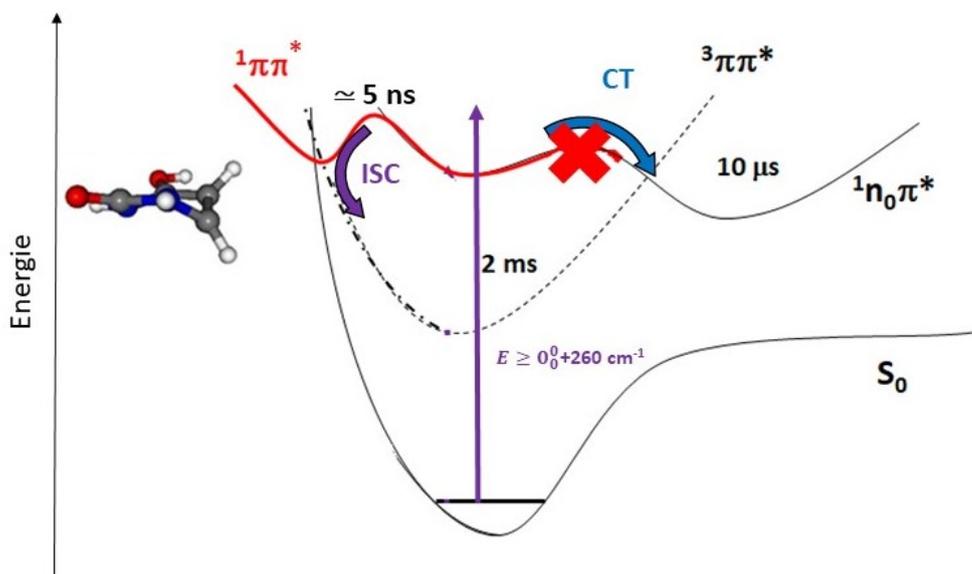


Figure 4.15 – Schéma du processus de relaxation proposé avec un excès d'énergie d'au moins $+260\text{ cm}^{-1}$, du tautomère kéto de l'uracile protonée.

A partir de $+260\text{ cm}^{-1}$ d'énergie en excès dans l'état localement excité, la population décroît à travers une petite barrière énergétique vers la région **Eth-Col**

de la surface d'énergie potentielle de l'état excité où se produit un croisement triple avec le triplet et l'état fondamental, permettant ainsi le croisement intersystème ou l'intersection conique vers l'état fondamental S_0 . La figure 4.15 présente ainsi le nouveau processus de relaxation observé avec une faible augmentation de l'énergie d'excitation.

4.1.7 . Processus de relaxation du tautomère kéto vers l'état fondamental

Nous avons déjà mentionné précédemment que la fragmentation se produit dans l'état fondamental après excitation électronique des bases protonées.[92] Il n'y a aucun signe de fragmentation directe à partir de l'état excité, tel que la perte d'un atome d'hydrogène, et les canaux de fragmentation sont ceux observés dans les expériences de collisions à basse énergie.

Rappelons que les temps d'apparition des photofragments sur la bande origine et la première transition vibronique à $+101 \text{ cm}^{-1}$ sont significativement plus longs que sur les bandes à partir de $+260 \text{ cm}^{-1}$. Ces temps d'apparition englobent ainsi la dynamique du processus de désactivation jusqu'au retour à l'état fondamental et l'évènement de fragmentation en lui-même. Le temps d'apparition des photofragments à partir de $+260 \text{ cm}^{-1}$ au dessus de la bande origine est d'environ 300 ns (limite expérimentale). Ces constantes de temps rapides sont en accord avec ce qui a été observé pour la cytosine émol protonée pour laquelle la fragmentation se produit à l'état fondamental après conversion interne directe à partir de l'état localement excité $^1\pi\pi^*$. [81]

Inversement, la constante de temps μs observée pour le temps d'apparition des photofragments sur la bande origine (voir figure 4.16(a)) et sur la première transition vibronique correspond à la durée de vie de l'état $^1n_O\pi^*$, révélant le temps passé dans cet état avant d'atteindre l'état fondamental où la dissociation se produit à l'échelle nanoseconde. Soulignons que l'absence de constante de temps ns sur la bande origine et la première transition vibronique met clairement en évidence que la conversion interne à partir de l'état localement excité ne se produit qu'à partir de $+260 \text{ cm}^{-1}$ d'excès d'énergie à l'état excité. En dessous de cet excès d'énergie, la conversion interne a lieu à partir de l'état $^1n_O\pi^*$.

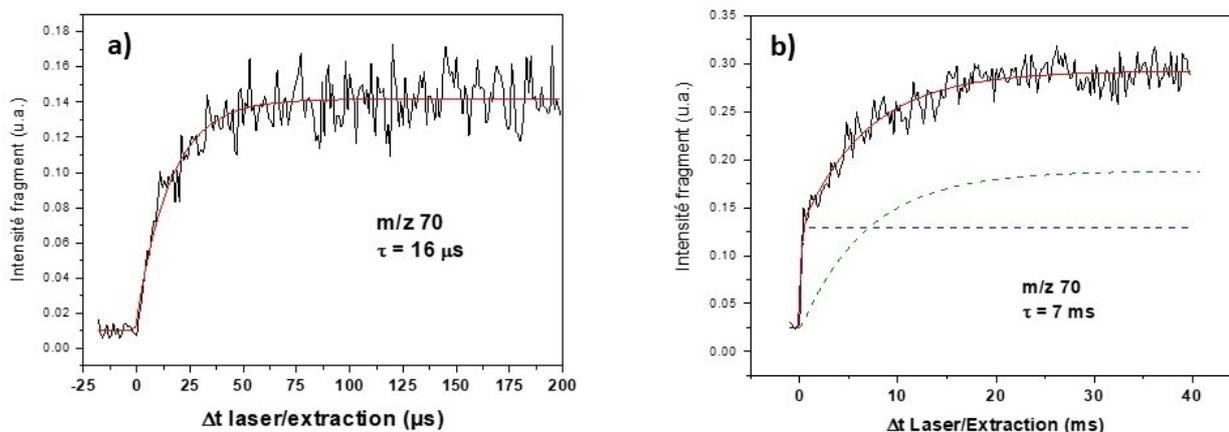


Figure 4.16 – Cinétique d'apparition du fragment m/z 70 à l'échelle μs et ms sur la bande origine à 314,05 nm. a) La courbe rouge représente la modélisation de l'exponentielle croissante avec une constante de temps $\tau = 16 \mu s$. b) La courbe en rouge représente la somme de la courbe bleue et de la courbe verte. La courbe en bleu permet de simuler la composante μs de la figure a) et la courbe en vert est une exponentielle croissante, avec une constante de temps $\tau = 7$ ms.

De plus, comme nous pouvons le voir sur la figure 4.16(b), l'évolution temporelle du signal de fragmentation sur l'échelle de temps de la milliseconde montre une seconde constante de temps, qui est présente à tout excès d'énergie. Le signal est composé d'une fonction exponentielle croissante telle qu'utilisée dans l'échelle de temps la plus courte mais avec une constante de temps de l'ordre de 6 ± 1 ms auquel s'additionne un signal constant tenant compte de l'intensité des photofragments produits sur l'échelle de temps μs (sur la bande origine et la première bande à $+101 \text{ cm}^{-1}$) ou ns (à partir de $+260 \text{ cm}^{-1}$ d'excès d'énergie). Notons par ailleurs que les canaux de fragmentation sont identiques à toutes les échelles de temps. Cette deuxième constante de temps, ms, reflète le temps de piégeage dans l'état triplet avant le croisement intersystème jusqu'à l'état fondamental où la dissociation a lieu rapidement, sur une échelle nanoseconde.

Enfin, il est intéressant de souligner le fait que les amplitudes des signaux aux temps d'extraction court (μs) et long (ms) sont similaires. Nous pouvons ainsi obtenir une estimation qualitative du processus de conversion interne à partir des

états singulets et du croisement intersystème de l'état triplet à l'état fondamental, respectivement. Bien que la cinétique d'apparition des photofragments puisse être modifiée (diminution de la cinétique d'apparition) par collision avec le résiduel du gaz tampon (He) à l'échelle milliseconde, nous pouvons tout de même estimer que le passage de l'état triplet à l'état fondamental représente la moitié du processus non-radiatif conduisant à la fragmentation.

Les différentes voies de relaxation conduisant à l'état fondamental dans le tautomère keto de l'uracile protonée sont résumées dans la figure 4.17.

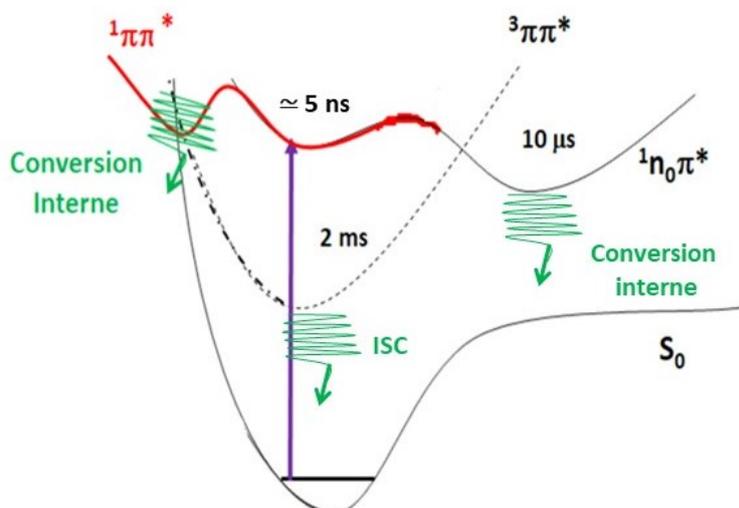


Figure 4.17 – Schéma des processus de relaxation permettant un retour vers l'état fondamental du tautomère kéto de l'uracile protonée.

4.1.8 . Spécificités des voies de fragmentation avec le laser de sonde

Un des aspects frappants des études pompe-sonde est la spécificité des voies de fragmentation avec le laser de sonde. Cette spécificité avait déjà été observée par le groupe dans le cas du 4-aminopyridine protonée, [100] dans laquelle la perte du groupement $-\text{NH}_2$ est spécifique à l'absorption du photon sonde à partir d'un état TICT (Twisted Intramolecular Charge Transfer). Comme nous l'avons vu ci-dessus, après excitation vers l'état $1\pi\pi^*$, le processus de désactivation fait intervenir un état $1n_o\pi^*$ et un état $3\pi\pi^*$. Nous avons montré qu'en fonction de la configuration électronique de l'état excité, différents fragments sont produits

suite à l'absorption du photon sonde : majoritairement m/z 43 de l'état $^1\pi\pi^*$ localement excité, m/z 57 et m/z 42 de l'état $^1n_O\pi^*$ et m/z 40 à partir de l'état $^3\pi\pi^*$. De plus, les fragments observés dépendent de la longueur d'onde de la sonde. Cela suggère fortement que différents états excités peuvent être atteints par absorption du photon sonde qui induit des photofragments spécifiques, comme l'ont récemment souligné Pitzer et al. [101] Ils ont établi des corrélations entre les états électroniques et les photofragments observés par excitation VUV à température ambiante de UH^+ . Il faut cependant rappeler que dans ce type d'expérience, aucune sélectivité des conformères ne peut être atteinte, le signal de photofragmentation englobe donc l'excitation des tautomères énol et kéto de UH^+ , ce qui complique l'analyse des résultats expérimentaux.

Il est intéressant de souligner que le fragment m/z 57, observé uniquement par excitation dans le visible à partir de l'état $^1n_O\pi^*$ n'a pas été détecté dans le schéma d'excitation VUV, soulignant la sélectivité d'excitation et de fragmentation à partir des états de transfert de charge. Nous avons calculé les énergies d'excitation verticale et les forces d'oscillateur (voir tableau 4.2) à partir de la structure optimisée de l'état $^1\pi\pi^*$, l'état $^1n_O\pi^*$ et l'état $^3\pi\pi^*$. Il convient de noter que les énergies d'excitation verticales entre les états excités doivent être considérées comme qualitatives car les méthodes CC2 sont moins précises pour ces états excités situés plus haut en énergie. Enfin, dans cette étude, nous ne nous sommes pas focalisés sur les mécanismes de fragmentation conduisant à la formation de photofragments spécifiques en fonction de la configuration électronique.

Les calculs montrent que la molécule maintient une forme plane (symétrie C_s) à la géométrie optimisée de l'état $^1n_O\pi^*$. D'après les règles de sélection, on ne peut donc envisager que des transitions vers des états $^1n_O\pi^*$ supérieurs. Une telle transition est prédite à 1,8 eV, ce qui est cohérent avec l'absorption du laser de sonde observée de 650 à 532 nm. Pour les états singulet et triplet $\pi\pi^*$, les structures présentent un *puckering* du cycle et une déformation hors du plan qui brisent la symétrie C_s . Cependant, on suppose une plus grande probabilité pour

$^1\pi\pi^*$			$^1n_O\pi^*$			$^3\pi\pi^*$		
Conf.	eV	f	Conf.	eV	f	Config.	eV	f
$n_O\pi^*$	0,68	0,0018	$\pi_{CO}\pi^*$	0,05	0	$n_O\pi^*$	1,97	0,0048
$n_O\pi^*$	2,02	0,0001	$n_O\pi^*$	1,8	0,0041	$\pi\pi^*$	2,40	0,0144
$\pi\pi^*$	2,26	0,07	$\pi\pi^*$	2,73	0	$\pi\pi^*$	2,64	0,040
$\pi\pi^*$	2,92	0,01	$\pi_{CO}\pi^*$	2,93	0	$\pi\pi^*$	2,96	0,107

Table 4.2 – Configuration électronique, énergies d'excitation en vertical (eV) et forces d'oscillateur (f) des formes optimisées $^1\pi\pi^*$, $^1n_O\pi^*$ et $^3\pi\pi^*$. En gras les transitions qu'il est possible d'observer expérimentalement.

les transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ en comparaison avec les transitions $n_O \rightarrow \pi^*$, comme indiqué dans le tableau 4.2. A partir de l'état localement excité, la première transition autorisée est calculé à 2,26 eV, ce qui est cohérent avec le début d'absorption du laser de sonde à 650 nm. Pour l'état triplet, il existe plusieurs transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ avec une force d'oscillateur croissante de 2,4 à 2,96 eV, ce qui pourrait expliquer pourquoi l'absorption de cet état n'est pas observée avec des longueurs d'onde de sonde dans le visible mais plutôt à 355 nm.

4.1.9 . Conclusions

Les expériences de photodissociation pompe-sonde de la forme kéto de l'uracile protonée ont permis de révéler les processus non-radiatifs complexes qui peuvent se produire dans cette base de l'ARN. Les photofragments sont issus d'une dissociation unimoléculaire à l'état fondamental après conversion interne. Une dynamique multi-échelle allant de la durée de vie nanoseconde de l'état localement excité $^1\pi\pi^*$ jusqu'aux durées de vie μs de l'état $^1n_O\pi^*$ et ms de l'état $^3\pi\pi^*$, respectivement, a été observée et attribuée à l'aide de calculs au niveau SCS-CC2. Nous observons également des spécificités dans les voies de fragmentation par absorption des photons sondes provenant de ces états électroniques spécifiques. L'analyse des cinétiques d'apparition des fragments suggère que le retour à l'état fondamental se fait à la fois à partir de l'état $^1n_O\pi^*$ et par croisement intersystème à partir de l'état $^3\pi\pi^*$, situé plus bas en énergie. Le passage par l'état à transfert

de charge $^1n_O\pi^*$ se ferme avec plus de 260 cm^{-1} d'excès d'énergie dans l'état excité. A partir de cet excès d'énergie, la population portée à l'état excité décroît à travers une région de la surface d'énergie potentielle où les états $^1\pi\pi^*$, $^1n_O\pi^*$ et $^3\pi\pi^*$ sont quasiment dégénérés avec l'état fondamental, où la structure de la forme kéto de l'uracile protonée est similaire à la structure **Eth-Col** proposée dans l'uracile neutre.

4.1.10 . Forme énoI de l'uracile protonée

Le tautomère énoI de l'uracile protonée absorbe dans un domaine plus bleu que le tautomère kéto comme nous pouvons le voir sur la figure 4.3. Nous pouvons aussi constater que les bandes du spectre de photodissociation du tautomère énoI sont beaucoup plus larges que celles de la forme kéto. L'élargissement des bandes est estimé à 170 cm^{-1} sur la bande origine centrée autour de 256 nm ($\sim 39060 \text{ cm}^{-1}$). En supposant que cet élargissement est dû à la durée de vie de l'état localement excité, nous pouvons obtenir une estimation de la durée de vie de cet état en utilisant le principe d'incertitude d'Heisenberg :

$$\Delta E \times \Delta t \geq \frac{h}{2\pi} \quad (4.1)$$

Un élargissement de 170 cm^{-1} correspond à une durée de vie de 30 fs. Cette durée de vie indique que la dynamique de relaxation de l'état localement excité est ultrarapide et qu'il n'est pas possible de la sonder avec un laser picoseconde comme nous l'avons fait pour le tautomère kéto, où nous avons pu extraire une limite de 5 ns. Néanmoins, nous avons effectué les expériences pompe-sonde multi-échelle que nous allons présenter dans la suite de cette partie.

Intéressons-nous tout d'abord au spectre de masse de la figure 4.18(a) enregistré avec un temps de piégeage de 30 ms après excitation laser sur la bande origine du tautomère énoI. Dans un premier temps, nous pouvons constater que nous avons les mêmes fragments m/z 70, m/z 95 et m/z 96 que dans le cas du tautomère kéto (voir figure 4.1). Cependant, la différence majeure par rapport au tautomère kéto est la présence du fragment m/z 43, ce fragment n'a pas été observé en excitant dans la région d'absorption du tautomère keto. Il est possible

que ce fragment provienne d'une voie de fragmentation spécifique du tautomère énol ou alors que cette voie est minoritaire dans le cas du tautomère kéto et ne peut pas être détectée.

Nous avons également enregistré un spectre de masse à deux couleurs, avec le laser de pompe à 256 nm et le laser de sonde à 355 nm. Comme nous pouvons le constater sur la figure 4.18(b), nous avons un signal pompe-sonde avec une déplétion de l'ensemble des fragments observés à une couleur, c'est-à-dire m/z 43, m/z 70, m/z 95 et m/z 96 et apparition des fragments m/z 44 et m/z 40.

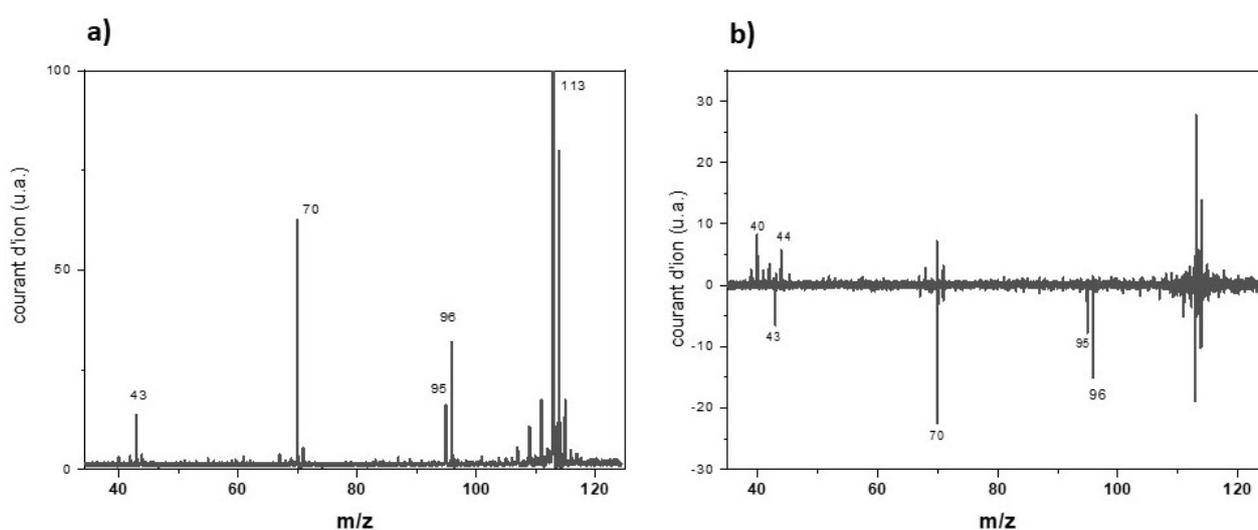


Figure 4.18 – Spectres de masse de l'uracile protonée excitée autour de la bande origine de la forme énol : (a) à une couleur avec un laser d'excitation à 256 nm et un temps de piégeage 30 ms après excitation laser (b) à deux couleurs : laser de pompe à 256 nm et laser de sonde à 355 nm, délai pompe/sonde de 1 ns.

Dans la suite de cette partie, nous avons suivi la même démarche que dans le cas du tautomère kéto. Dans un premier temps, nous avons effectué des expériences de cinétique d'apparition des fragments pour mieux les caractériser. Dans un deuxième temps, nous avons enregistré les signaux pompe-sonde sur différentes fenêtres temporelles. L'interprétation des données expérimentales a été effectuée à l'aide des calculs disponibles dans la littérature.[99]

4.1.11 . Cinétique d'apparition des fragments du tautomère énol de l'uracile

La cinétique d'apparition des fragments a été enregistrée sur l'ensemble des fragments observés sur le spectre de masse de la figure 4.18(a) avec le laser à 256 nm et un retard d'extraction maximum à 32 ms. Nous avons effectué ces mesures à deux pressions résiduelles, c'est-à-dire (a) $8,0 \times 10^{-7}$ mbar (b) $1,6 \times 10^{-6}$ mbar, dans la chambre où se situe le piège de Paul, en faisant varier la durée d'ouverture de la vanne pulsée qui introduit le gaz tampon au moment où les ions entrent dans le piège de Paul. Rappelons que le laser interagit avec les ions 40 ms après injection dans le piège afin de pomper le maximum de gaz tampon dans la trappe. Les traces obtenues sont présentées sur la figure 4.19 pour les fragments m/z 43, m/z 70 et m/z 96.

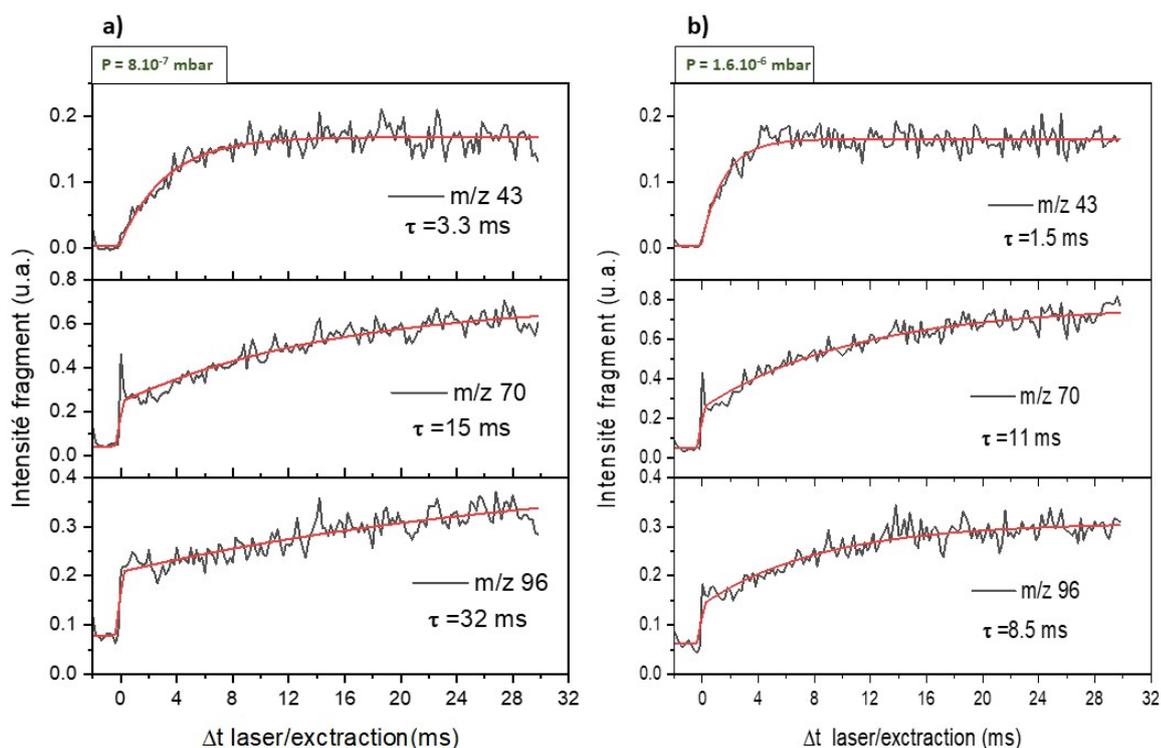


Figure 4.19 – Cinétique d'apparition des fragments avec un laser d'excitation à 256 nm, avec une pression résiduelle de (a) $8,0 \times 10^{-7}$ mbar (b) $1,6 \times 10^{-6}$ mbar.

On remarque sur les fragments m/z 70 et m/z 96, mais aussi m/z 95 non-représenté sur la figure, que le signal augmente très rapidement sur les premiers points puis l'augmentation est plus légère. Le fragment m/z 43 se forme quant à

lui, à l'échelle milliseconde : le signal augmente pour atteindre un palier à ~ 8 ms après l'excitation laser. Le signal du fragment m/z 43 peut être modélisé par une fonction exponentielle croissante avec une constante de temps de 3,3 ms. Pour les fragments m/z 70, m/z 95 et m/z 96, il faut ajouter une composante permettant de représenter la fragmentation rapide, et on peut en déduire des constantes de temps de 15 ms pour le fragment m/z 70 et 32 ms pour le fragment m/z 96.

La cinétique d'apparition des fragments m/z 70 et m/z 96 est très rapide, le temps est inférieur à la limite expérimentale. On peut aussi voir que la simulation ne permet pas de bien décrire le signal expérimental sur les premiers points. En particulier sur le fragment m/z 70, il semble que le signal du fragment soit très intense au début puis diminue, soit constant jusqu'à ~ 3 ms pour ensuite augmenter de façon exponentielle sur une échelle ms. L'explication la plus simple pour expliquer la diminution d'un fragment serait qu'il se fragmente à nouveau. Or le fragment 43 est considéré comme étant une voie de fragmentation du fragment m/z 70 [102] par perte de la molécule HCN. On peut ainsi expliquer pourquoi la cinétique du fragment m/z 43 est différente, il s'agit d'un fragment créé à partir du fragment m/z 70. Le signal du fragment m/z 43 qui est constant après quelques ms nous indique que la fragmentation du fragment m/z 70 n'a lieu qu'au temps court et pas à l'échelle ms. On peut donc identifier au moins deux voies conduisant à la formation du fragment m/z 70. En comparaison avec les cinétiques observés sur le fragment keto la voie de cinétique d'apparition rapide peut être associée à un processus de retour à l'état fondamental depuis l'état localement excité. Les fragments apparaissant à l'échelle milliseconde sont formés à partir d'une population dans un état excité à longue durée de vie qui se relaxe vers l'état fondamental. Toujours en comparaison avec les cinétiques réalisées sur le tautomère keto (cf figure 4.16) l'absence de composante microseconde semble correspondre à l'absence de relaxation d'une population d'un état à transfert de charge $n_O\pi^*$ vers l'état fondamental.

La même expérience a été réalisée pour enregistrer les cinétiques d'apparition des fragments mais en changeant, comme unique paramètre, la pression du gaz résiduel dans la chambre.

La première expérience a été réalisée avec une pression de $8,0 \times 10^{-7}$ mbar. En augmentant la durée d'ouverture de la vanne pulsé, qui introduit le gaz tampon pour piéger les ions, on peut légèrement augmenter la pression résiduelle dans la chambre. Dans la deuxième expérience, la pression résiduelle dans la chambre est multipliée par un facteur 2, c'est-à-dire à $1,6 \times 10^{-6}$ mbar. Les cinétiques d'apparition sont représentées sur la droite de la figure 4.19. On constate qu'en augmentant la pression, le pic de signal au temps court, qui est observé sur le fragment m/z 70 principalement, est conservé. La forme globale du signal de fragmentation ne change pour aucun des fragments, si ce n'est que le maximum en intensité est atteint plus rapidement aux temps longs à l'échelle ms. Notons que les intensités maximales sont les mêmes aux deux pressions résiduelles. La modélisation du signal par une fonction exponentielle croissante, à laquelle s'ajoute une fonction marche pour modéliser la fragmentation rapide observée pour les fragments m/z 70 et m/z 96, permet d'extraire une constante de temps de 1,5 ms pour le fragment m/z 43, 11 ms pour le fragment m/z 70 et 8,5 ms pour le fragment m/z 96. On constate que la pression a un effet important sur les fragments m/z 43 et m/z 96 où le temps d'apparition des fragments est divisé par 2 et 4, respectivement. Par contre, le fragment m/z 70 semble beaucoup moins impacté par l'augmentation de la pression.

L'augmentation de la pression du gaz entraîne une augmentation du nombre de collisions dans le piège à ions. Les fragments formés par photo-dissociation sont produits après une relaxation vers l'état fondamental d'une population excitée. Lors du retour à l'état fondamental cette population présente un important excès d'énergie qui permet lui notamment de franchir les barrière des dissociations. Or l'augmentation des collisions va "refroidir" cette population de molécules et diminuer son énergie interne, ceci à pour effet de ralentir l'apparition des fragments ce qui se traduit expérimentalement par des valeurs de constantes d'apparition de fragments plus grandes. Expérimentalement on observe pourtant une cinétique d'apparition de fragment plus rapide. L'augmentation du nombre de collisions a aussi pour effet de mieux confiner les ions au centre de la trappe, ce qui va augmenter la quantité d'ions extraits, on atteint donc le palier plus rapide-

ment, ce qui peut expliquer le raccourcissement de la constante de temps calculée. L'augmentation de la pression du gaz a un effet sur deux processus différents qui influent sur la cinétique d'apparition de fragments mais de façon opposée, il faut donc rester prudent sur l'interprétation de ces valeurs.

D'après ces expériences de cinétiques d'apparition on peut donc conclure que les fragments primaires m/z 70 et m/z 96 présentent deux voies distinctes de formation après absorption d'un photon UV. Les fragments m/z 70 et m/z 96 apparaissent très rapidement à l'échelle nanoseconde et possèdent une seconde croissance à l'échelle milliseconde. Ceci peut nous laisser supposer que l'on peuple un état à longue durée de vie, dont la population met plusieurs ms pour retourner au fondamental.

4.1.12 . Expériences pompe-sonde sur uracile éno

Les expériences pompe sonde multi-échelle ont été réalisées sur la bande origine du tautomère éno. Le spectre de masse à deux couleurs de la figure 4.18 présente l'apparition des fragments m/z 40 et m/z 44 ainsi que la déplétion des fragments m/z 43, m/z 70, m/z 95 et m/z 96. Le signal pompe-sonde enregistré à l'échelle picoseconde est présenté sur la figure 4.20. On peut observer un signal décroissant sur le fragment m/z 96 et un signal croissant sur le fragment m/z 44. Les deux signaux atteignent un plateau au bout de 400 ps. De la même manière, on observe un signal décroissant sur les fragments m/z 43, m/z 70 et m/z 95. Le signal du fragment m/z 40 suit le comportement croissant du fragment m/z 44 mais plus lentement. En modélisant le signal sur les nouveaux fragments par une fonction exponentielle croissante et le signal des fragments en déplétion par une fonction exponentielle décroissante, il est possible d'extraire une constante de temps de l'ordre de 150-200 ps. La simulation donne une incertitude sur les constantes de temps de l'ordre de 20 ps. Les valeurs sont donc suffisamment proches pour que l'on puisse considérer qu'on mesure le même processus. Néanmoins, on peut s'interroger sur le fragment m/z 40 dont la durée de vie mesurée est le double de celle mesurée sur le fragment m/z 96. Le signal pompe-sonde à cette échelle de temps suggère qu'un état est en cours de peuplement. Il s'agit donc de la popula-

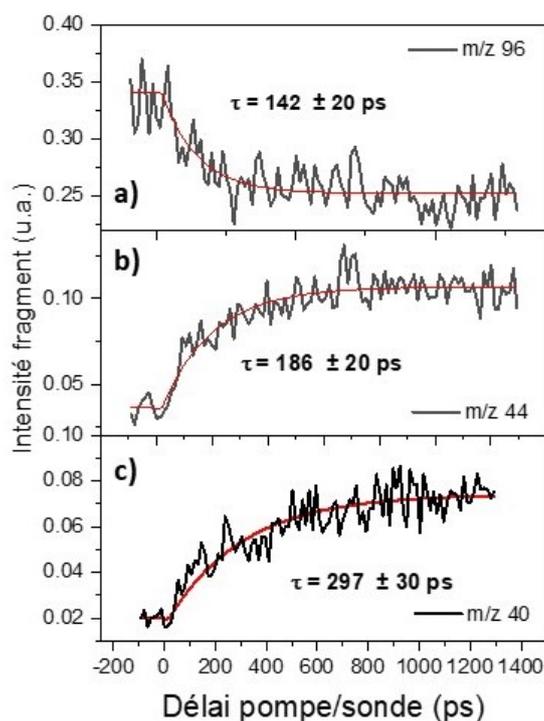


Figure 4.20 – Signaux pompe-sonde enregistrés à l'échelle picoseconde du tautomère énol de l'uracile protonée sur le fragment (a) m/z 96 (b) m/z 44 et (c) m/z 40. Le laser de pompe est sur la transition origine du tautomère énol à 256 nm et le laser de sonde est à 355 nm. Ces expériences sont réalisées avec une pression résiduelle dans la chambre de 8×10^{-7} mbar. En rouge la simulation des temps de montée/descente.

tion dans l'état en cours de peuplement qui est sondée par le laser à 355 nm et permet d'observer ce signal croissant sur les nouveaux fragments.

A l'échelle μs , le signal à deux couleurs présente une déplétion rapide suivie d'un plateau (signal constant) pour les fragments m/z 70 (voir figure 4.21(a)), m/z 95 et m/z 96. Sur le fragment m/z 40, le signal à deux couleurs présente à l'inverse une augmentation rapide suivie d'un plateau (voir figure 4.21(b)). Comme dans le cas de l'uracile kéto, on observe aussi la disparition de la voie de fragmentation m/z 44 à l'échelle ns (voir figure 4.21(c)). En effet, on observe seulement le signal d'auto-corrélation des lasers qui montre que cette voie de fragmentation est spécifique à l'échelle ps. Notons ici que nous avons observé le même comportement

dans le cas du tautomère kéto à partir de 260 cm^{-1} d'excès d'énergie dans l'état excité $^1\pi\pi^*$. Ces expériences pompe-sonde mettent en évidence l'absence de dynamique à l'échelle ns et μs dans le tautomère énol sur la bande origine, à l'inverse du tautomère kéto.

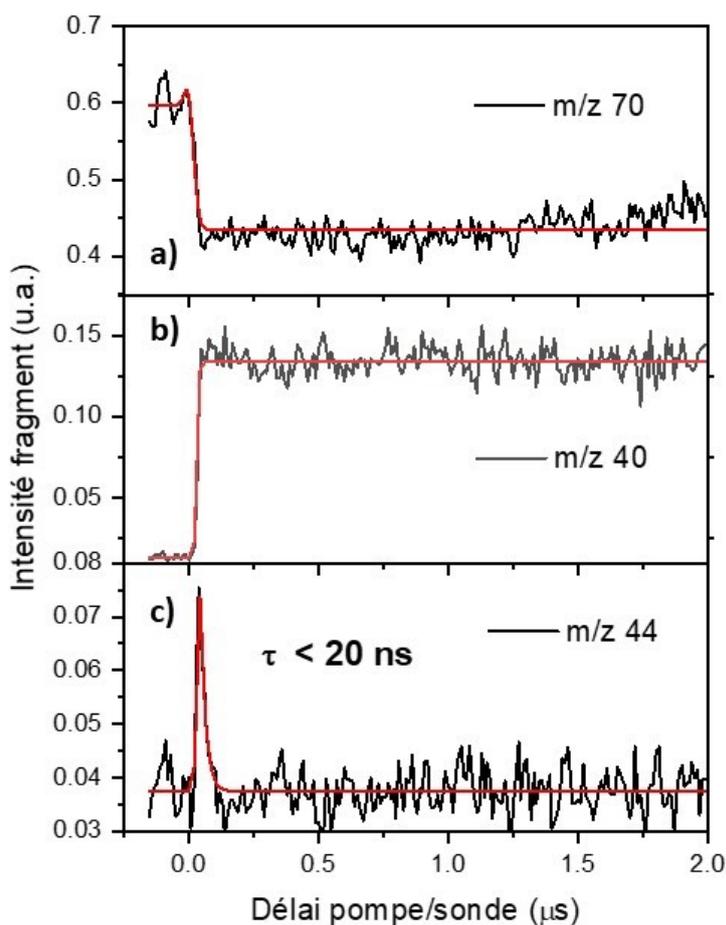


Figure 4.21 – Signaux pompe-sonde enregistrés à l'échelle microseconde du tautomère énol de l'uracile protonée : (a) m/z 70, (b) m/z 40 et (c) m/z 44.

Pour commencer à observer un signal transitoire, il faut poursuivre les expériences jusqu'à l'échelle milliseconde. En effet, le signal du fragment m/z 40 disparaît en quelques ms, tandis que les signaux sur les autres fragments m/z 43, m/z 70, m/z 95 et m/z 96 reviennent à leurs valeurs d'origine. La figure 4.22 montre les signaux pompe-sonde enregistrés sur les fragments m/z 96, m/z 70 et m/z 40 à

deux pressions résiduelles différentes. Pour les expériences réalisées à une pression résiduelle de 8×10^{-7} mbar, la modélisation par une fonction exponentielle décroissante des signaux transitoires permet d'extraire une constante de temps de $\sim 2,6$ ms pour les fragments m/z 96 et m/z 40. Cependant, la modélisation du signal transitoire enregistré sur le fragment m/z 70 donne une constante de temps plus longue, c'est-à-dire 4,8 ms, ce qui représente à peu près le double du temps mesuré sur les fragments m/z 96 et m/z 40. L'incertitude estimée est au maximum de 0,4 ms, ce qui implique que l'on peut considérer ces deux valeurs temporelles comme l'évolution de deux populations distinctes. Avec une pression résiduelle deux fois plus élevée, c'est-à-dire $1,6 \times 10^{-6}$ mbar, les constantes de temps extraites des différents fragments sont environs deux fois plus petites que les constantes de temps mesurées avec une pression de 8×10^{-7} mbar.

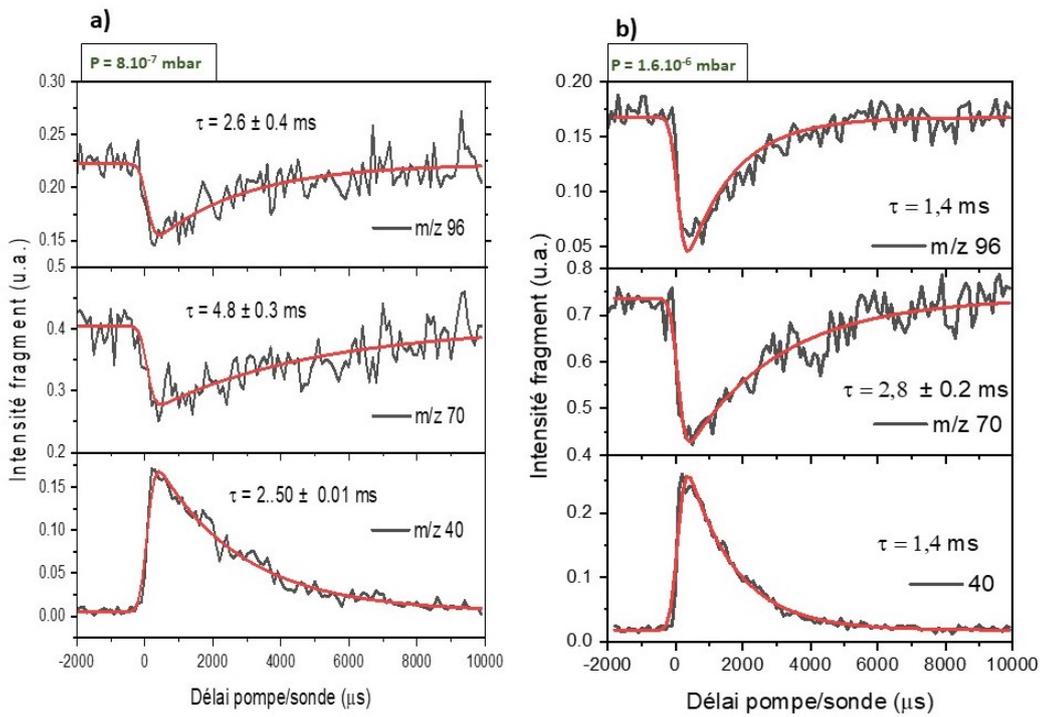


Figure 4.22 – Signaux pompe-sonde enregistrés à l'échelle milliseconde du tautomère énol de l'uracile protonée sur les fragments m/z 96, m/z 70, m/z 40 à une pression résiduelle de 8×10^{-7} mbar (figure de gauche) et $1,6 \times 10^{-6}$ mbar (figure de droite). Le laser de pompe est sur la transition origine du tautomère énol à 256 nm et le laser de sonde est à 355 nm.

Comme dans le cas des cinétiques d'apparitions de fragments, l'augmentation de la pression du gaz augmente le nombre de collisions dans le piège de Paul. L'augmentation du nombre de collisions "refroidit" non seulement la population de molécules qui retourne à l'état fondamental mais aussi la population encore excitée. C'est à dire que les population dans des états excités vont dissiper une partie de leurs énergie interne par collisions, ce qui a donc pour conséquence d'augmenter la durée de vie de ces états excités. Or expérimentalement on observe un raccourcissement de la constante de temps mesurée avec une augmentation de la pression du gaz.

Il faut donc prendre en compte que la population que l'on sonde à l'échelle milliseconde est probablement dans un état triplet chaud. Il est possible que lorsque la population se relaxe dans l'état triplet, à partir d'un certain moment, on ne soit plus capable de sonder cette population encore présente dans le triplet si le laser de sonde n'est plus résonant avec un état plus haut en énergie. Or précédemment on a montré que l'augmentation de la pression du gaz entraîne une diminution de l'énergie interne dans les états excités et expérimentalement on observe des constantes de temps plus faibles. On peut donc les expliquer par une diminution plus rapide de l'énergie interne de la population présente l'état triplet, ainsi on peut sonder moins longtemps la population présente dans l'état triplet lorsque la pression de gaz est plus importante.

4.1.13 . Processus de relaxation à l'oeuvre dans le tautomère énol sur la bande origine

L'ensemble des expériences de cinétique d'apparition des fragments et pompe-sonde multi-échelle permet d'avoir une idée du processus de relaxation après excitation du tautomère énol avec un laser UV sur la bande origine à 256 nm. A partir de l'élargissement de cette bande origine, qu'on attribue à la durée de vie de l'état localement excité, on peut déduire un temps de 30 fs en utilisant le principe d'incertitude d'Heisenberg comme on l'a vu précédemment. Les expériences pompe-sonde ont permis de mesurer (i) un temps de ~ 200 ps à l'échelle picoseconde et (ii) un temps ~ 1 à 5 ms à l'échelle milliseconde. On peut souligner ici

l'absence de composante μs sur la bande origine.

Omidyan[99] et al. ont réalisé une étude théorique et ont proposé un processus de relaxation ultra-rapide invoquant le passage par une intersection conique entre l'état $^1\pi\pi^*$ (état S_1) et l'état fondamental (état S_0). Comme on l'a vu dans le cas du tautomère kéto, l'existence d'une intersection conique ne signifie pas forcément que la conversion interne vers l'état fondamental est l'unique voie de relaxation du système. En effet, ce n'est qu'à partir de $+260 \text{ cm}^{-1}$ d'excès d'énergie à l'état excité que la conversion interne devient possible depuis l'état S_1 . Donc, l'accès vers une zone de l'intersection conique de la surface d'énergie potentielle ne se fait pas forcément sans barrière. C'est justement le point mis en avant par Omidyan et al. pour justifier leur approche. Dans leur article, ils ont utilisé la méthodologie LIIC (pour *Linearly Interpolated Internal Coordinate*) pour explorer la surface d'énergie potentielle qui relie la région Franck-Condon des états S_1 et S_0 et les régions des intersections coniques. C'est ainsi que les auteurs ont trouvé au moins trois intersections coniques (voir figure 4.23). Les géométries optimisées au niveau *CASSCF(8,8)/aug-cc-pVDZ* présentent toutes une déformation hors-plan (*ring puckering*) d'un atome de carbone, et plus précisément le C_6 , C_2 et C_4 . Parmi ces trois structures, seule la déformation hors-plan du C_6 amène vers une intersection conique avec l'état fondamental sans barrière d'énergie à franchir. L'absence de barrière le long de ce chemin réactionnel est en faveur d'une relaxation très rapide du système vers la géométrie de l'intersection conique, compatible avec une durée de vie de l'état $^1\pi\pi^*$ de $\sim 30 \text{ fs}$. Rappelons que les expériences pompe-sonde à l'échelle picoseconde ont aussi mis en évidence une constante de temps de 200 ps . D'après l'étude théorique de Omidyan et al, on pourrait émettre l'hypothèse que cette constante de temps est le temps nécessaire au système pour accéder à cette région de la surface d'énergie potentielle. Ce passage vers l'intersection conique avec l'état fondamental S_0 est sans doute à l'origine de la fragmentation très rapide observée sur les fragments $m/z 70$, $m/z 95$ et $m/z 96$.

Ce chemin que nous venons de mentionner n'explique pas le temps long ms observé lors des expériences pompe-sonde à l'échelle ms. Les auteurs ont aussi cherché à mettre en évidence une géométrie de la surface d'énergie potentielle

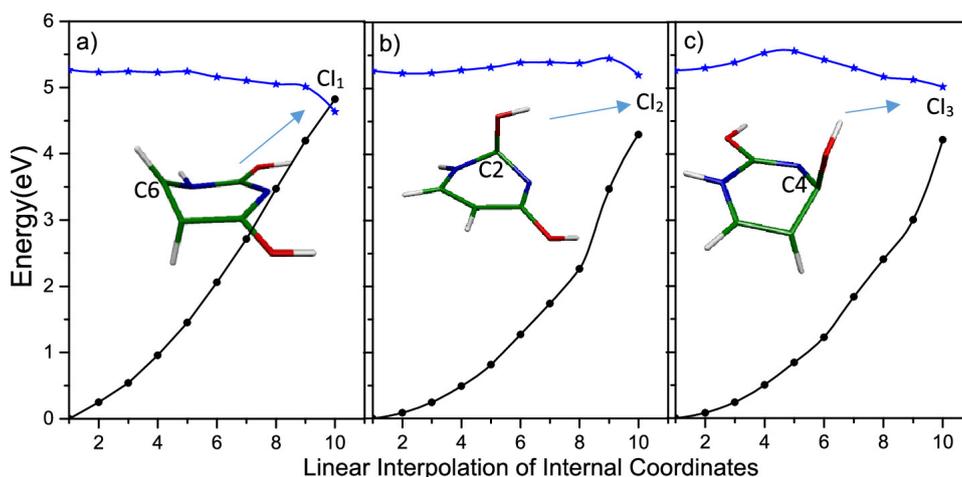


Figure 4.23 – Interpolation linéaire des coordonnées internes calculée par Omidyan[99] au niveau ADC(2)/aug-cc-pVDZ et géométrie des intersections coniques au niveau CASSCF(8,8)/aug-cc-pVDZ.

de l'état S_1 qui serait dégénérée avec la surface d'un état ${}^3\pi\pi^*$ pour explorer la possibilité d'un croisement intersystème. Il se trouve que la structure de l'intersection conique présentant une déformation hors plan du C_6 est aussi très proche en énergie de l'état triplet à la même géométrie. Tous ces éléments suggèrent la présence d'un point triple où l'état S_1 , l'état triplet et l'état fondamental sont dégénérés.

Le temps de 200 ps mesuré peut donc être attribué au temps nécessaire à la population excitée pour atteindre cette région de la surface d'énergie potentielle. Le fragment m/z 44 observé à deux couleurs semble être une sonde de cet état.

Outre la possibilité de faire une conversion interne vers l'état fondamental, la population portée à l'état excité a la possibilité de se retrouver à l'état triplet pour ensuite retourner à l'état fondamental par un deuxième croisement intersystème. Le fragment m/z 43 pourrait être le fragment spécifique du passage par l'état triplet car c'est le seul fragment qui ne présente pas de temps court lors des expériences de cinétique d'apparition.

En résumé, l'excitation UV du tautomère énol correspond à une transition $\pi \rightarrow \pi^*$. Le système se relaxe très rapidement vers la géométrie du point triple où les états S_1 , S_0 et l'état triplet sont dégénérés. Une fois le point triple atteint

la population peut se séparer dans deux directions différentes : (i) une partie de la population retourne directement vers l'état fondamental via l'intersection conique et (ii) une autre partie de la population peut se retrouver à l'état triplet par un premier passage intersystème où la population va rester piégée pendant au moins $\sim 1-4$ ms avant de se relaxer à nouveau par un deuxième passage intersystème vers l'état fondamental. Ce processus de relaxation est schématisé dans la figure 4.24.

Tout en gardant une certaine réserve, les différences de temps de peuplements observées à l'échelle ps, et des durées de vie mesurées à la ms en fonction des fragments pourraient être la signature d'un point triple différent permettant l'accès vers l'état triplet.

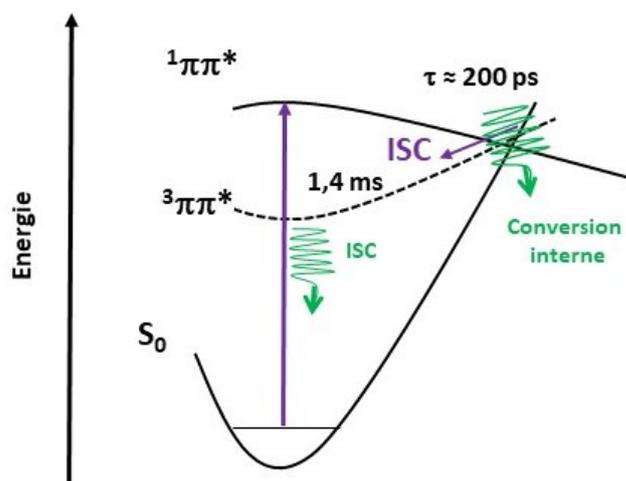


Figure 4.24 – Schéma de relaxation proposé pour le tautomère enol de l'uracile protoné

4.2 . Thymine protonée - forme énol

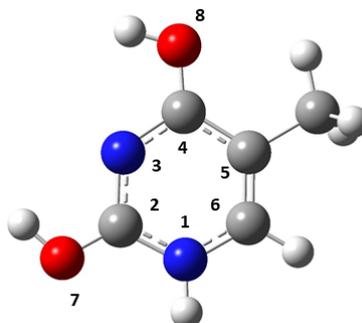


Figure 4.25 – Représentation de la forme énol de la thymine protonée.

La thymine est très proche au niveau de sa structure de l'uracile, avec la substitution en C_5 d'un atome d'hydrogène par un groupement méthyle (voir figure 4.25). Cette molécule possède donc une différence de 14 unités de masse atomique par rapport à l'uracile, avec un m/z 127 pour la thymine protonée (TH^+). Le schéma de fragmentation de TH^+ est identique à celui de UH^+ après absorption d'un photon UV. Les fragments majoritaires observés sont la perte de NH_3 donnant le fragment m/z 110, la perte de H_2O donnant le fragment m/z 109 et la perte de $HNCO$ donnant le fragment m/z 84 (voir figure 4.26).

Le spectre de la thymine protonée a été enregistré entre 37000 et 41000 cm^{-1} (244 nm et 270 nm). Ce spectre est assez similaire au spectre de photodissociation de UH^+ dans la zone d'absorption du tautomère énol avec des bandes d'absorption relativement larges entre 100 et 200 cm^{-1} . La bande origine est située à 37431 cm^{-1} et on peut observer deux bandes vibroniques à 37931 cm^{-1} et 38159 cm^{-1} avant une zone d'absorption relativement large et peu structurée située plus haut en énergie. Berdakin et al [92] ont attribué ce spectre de photodissociation au tautomère énol, le plus stable présenté dans la figure 4.25, en se basant sur des calculs théoriques. La transition électronique $^1\pi\pi^*$ est calculée à $4,57\text{ eV}$, ce qui est très proche de la bande origine expérimentale à $4,64\text{ eV}$ (37431 cm^{-1}). Contrairement à l'uracile protonée et la cytosine protonée, le tautomère kéto n'est pas observé dans le spectre de photodissociation. Ce tautomère est moins stable par

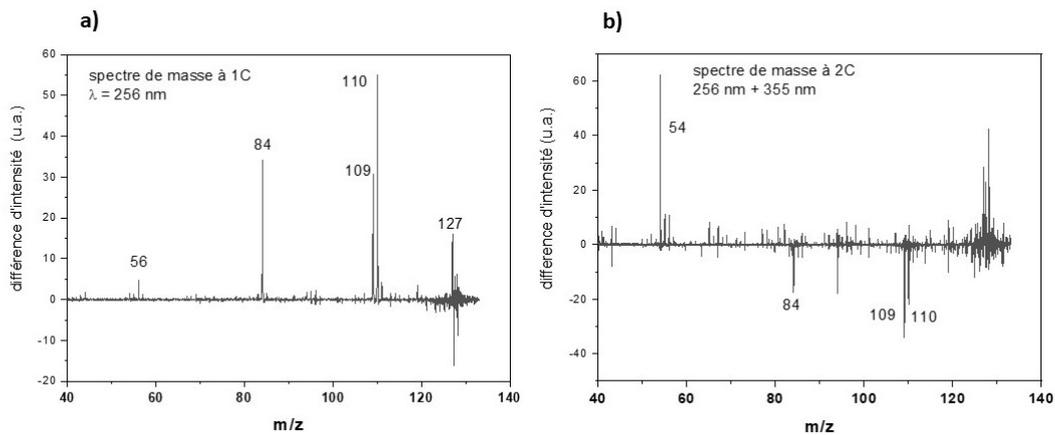


Figure 4.26 – Spectres de masse à une et deux couleurs de la thymine protonée. (a) à une couleur (1C) avec le laser d’excitation à 256 nm et (b) à deux couleurs (2C) avec le laser de pompe à 256 nm et le laser de sonde à 355 nm, avec un délai de $1 \mu\text{s}$ entre les deux lasers.

rapport à la forme énol d’environ 0,1 eV (en fonction du niveau de calcul utilisé). Si le tautomère kéto est présent au sein du piège sa signature spectrale en UV devrait se situer autour 3,55 eV (350 nm), une région spectrale que l’on ne peut pas couvrir avec nos lasers. La présence de ce tautomère ne peut donc pas être vérifiée avec les lasers à notre disposition.

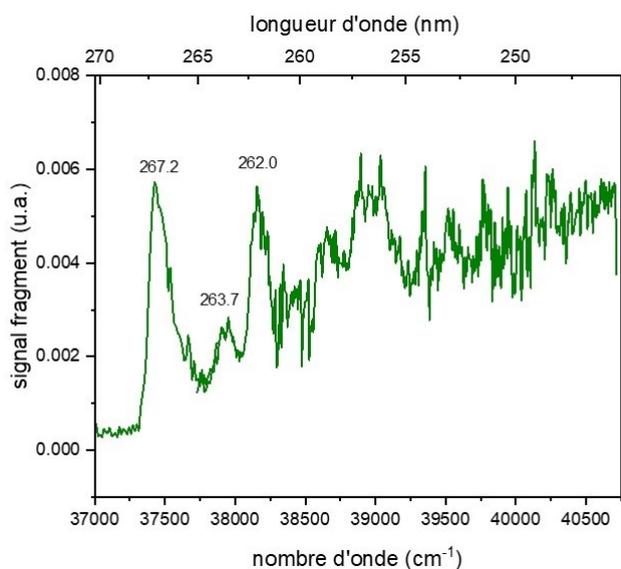


Figure 4.27 – Spectre de photodissociation UV de la thymine protonée, enregistré et moyenné sur l’ensemble des fragments.

4.2.1 . Cinétique d'apparition des fragments sur la thymine

La cinétique d'apparition des fragments formés à partir de la bande origine est présentée dans la figure 4.28 sur deux échelles de temps. Les trois fragments m/z 84, m/z 109 et m/z 110 présentent le même comportement cinétique. Sur une échelle de temps de 0 à 3 μs (voir figure 4.28(a)), la cinétique d'apparition du fragment m/z 110 peut être modélisée par une fonction exponentielle croissante avec une constante de temps de 670 ns sur la bande origine. En augmentant l'énergie d'excitation, on observe une diminution de ce temps jusqu'à 360 ns (temps mesuré sur la bande à 257 nm).

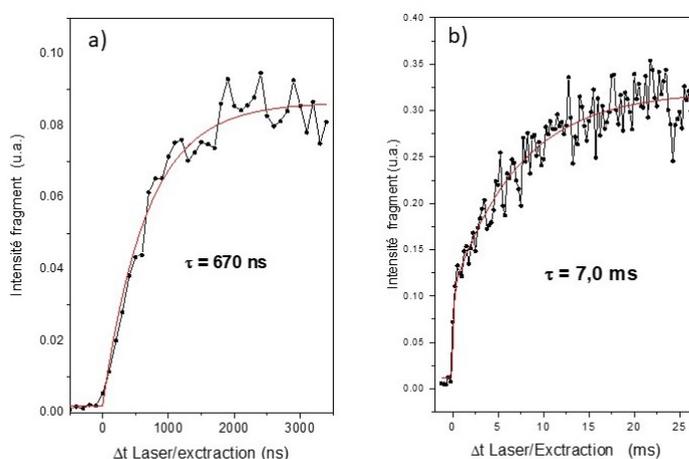


Figure 4.28 – Cinétique d'apparition du fragment m/z 110 sur une échelle de (a) 3 μs et (b) 25 ms, en excitant la bande origine à 267,2 nm. La courbe en rouge sur la figure (a) est une modélisation du signal avec une fonction exponentielle avec une constante de temps de 670 ns et sur la figure (b) est une modélisation du signal avec une fonction marche pour tenir compte du signal produit à l'échelle sub- μs et une fonction exponentielle croissante avec une constante de temps de 7 ms.

Sur une échelle de temps de 0 à 25 ms (voir figure 4.28(b)) on observe une augmentation rapide du signal qui correspond au signal produit à l'échelle sub- μs et une composante de formation du fragment plus lente que l'on simule avec une fonction exponentielle croissante avec une constante de temps de 7 ms.

Les expériences de cinétique nous indiquent qu'il existe au moins deux voies permettant à une population excitée de retourner à l'état fondamental pour ensuite se fragmenter. Le temps mesuré de quelques ms peut être la signature d'une population provenant d'un état triplet en comparaison avec les expériences réalisées sur l'uracile protonée. Le comportement des fragments m/z 110 aux temps d'extraction les plus courts est la signature d'une fragmentation rapide après retour à l'état fondamental.

4.2.2 . Expériences pompe-sonde sur la thymine

Le spectre de masse à deux couleurs de la figure 4.26(b) avec un laser d'excitation à 256 nm et un laser de sonde à 355 nm montre la création du fragment m/z 54 et la diminution des fragments m/z 84, m/z 109 et m/z 110. Le délai entre les deux lasers est de $1 \mu s$. Des expériences pompe-sonde ont été réalisées avec un laser de pompe fixé sur la bande origine à 267,2 nm et un laser de sonde à 355 nm. Les résultats des expériences pompe-sonde à l'échelle ps sont présentés sur la figure 4.29.

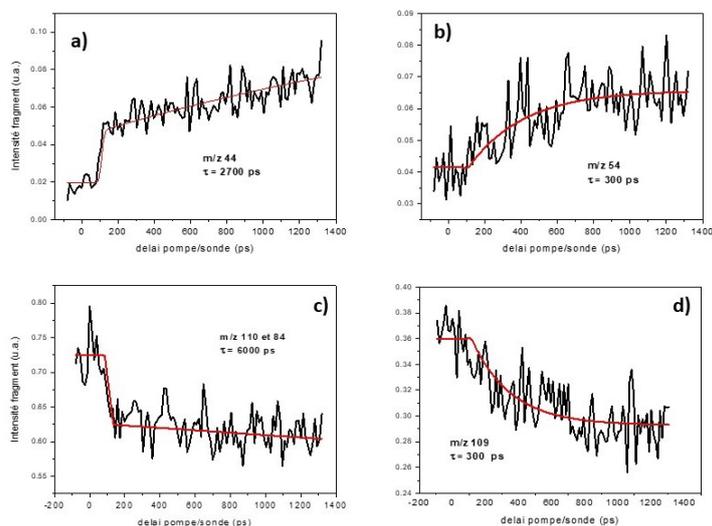


Figure 4.29 – Signal pompe-sonde à l'échelle picoseconde avec la thymine protonée enregistré sur le fragment : (a) m/z 44, (b) m/z 54, (c) m/z 110 et m/z 84 et (d) m/z 109, avec un laser de pompe à 267,2 nm et un laser de sonde à 355 nm. La courbe en rouge est une modélisation du signal (voir texte).

On peut voir, en comparaison avec le spectre de masse à deux couleurs de la figure 4.26, qu'à cette échelle de temps, on observe à la fois l'apparition du fragment m/z 54 et du fragment m/z 44. Il apparait que suivant le fragment observé on ne mesure pas le même signal pompe-sonde. Les fragments m/z 44, m/z 84 et m/z 110 suivent le même processus, c'est-à-dire qu'on observe une augmentation (ou une diminution) très rapide du signal puis un temps de montée (ou de descente) jusqu'à la fin de l'expérience. Pour modéliser ce signal, on utilise une fonction marche pour simuler la montée rapide et une exponentielle croissante avec un temps de 2,7 ns pour simuler la croissance du signal.

Sur le fragment m/z 54 on observe un signal qui monte en une centaine de ps avant d'atteindre un palier. La modélisation de ce signal par une fonction exponentielle croissante permet d'extraire un temps de 300 ps. Le même comportement est observé sur le fragment m/z 109 mais en déplétion du signal.

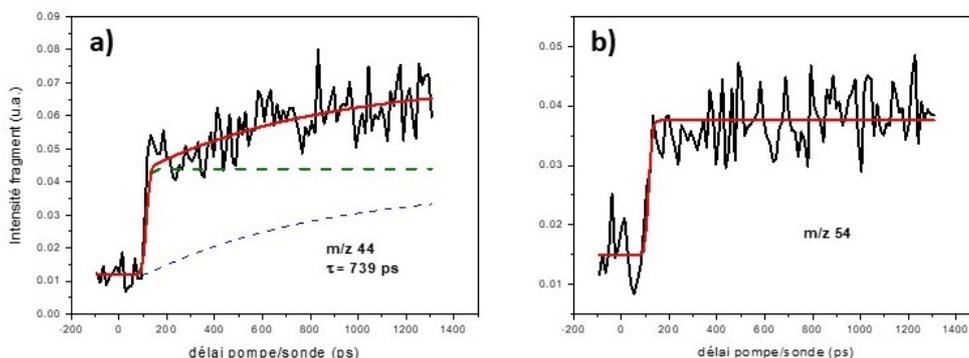


Figure 4.30 – Signal pompe-sonde à l'échelle picoseconde avec la thymine protonée enregistré sur le fragment : a) m/z 44 et b) m/z 54, avec un laser de pompe à 257 nm et un laser de sonde à 355 nm. Les courbes en rouge sont les modélisations : pour le fragment m/z 44, c'est une somme de deux contributions avec une fonction marche en vert et une fonction exponentielle croissante ($\tau = 739$ ps) en mauve, et seulement une fonction marche pour le fragment m/z 54.

On s'est ensuite intéressé à l'évolution de ces signaux pompe-sonde à l'échelle ps en augmentant l'excès d'énergie à l'état excité. La figure 4.30 présente les résultats en excitant TH^+ sur la bande à 257 nm du spectre UV (voir figure 4.27). A cette

énergie d'excitation, on augmente l'énergie interne de $+1485 \text{ cm}^{-1}$. Les fragments m/z 44 et m/z 110 présentent encore le même comportement avec une composante du signal rapide et un temps de montée (et de descente) croissant. A partir de la simulation, on voit que l'augmentation d'énergie interne conduit à la diminution du temps de montée observé jusqu'à environ 739 ps. Un effet similaire est observé sur le temps de montée du fragment m/z 54 ce temps est fortement raccourci comparé à celui observé en excitant à 267,2 nm, à tel point qu'il n'est plus mesurable avec notre laser.

L'évolution de la durée de vie ns mesurée à l'échelle ps sur les fragments m/z 44, m/z 84 et m/z 110 a été étudiée sur les différentes bandes qui apparaissent au dessus du fond continu d'absorption à 267,2 nm, 263,7 nm, 262,0 nm et 257 nm. La figure 4.31 montre l'évolution linéaire de cette durée de vie en fonction de l'excès d'énergie par rapport à la bande origine dans un repère semi-logarithmique.

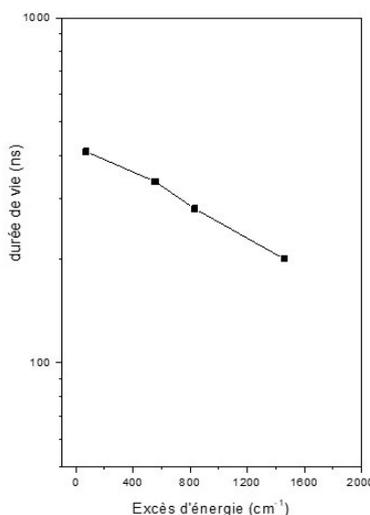


Figure 4.31 – Durées de vie nanoseconde de TH^+ mesurées sur les fragments m/z 44, m/z 84 et m/z 110 en fonction de l'excès d'énergie d'excitation (cm^{-1}).

En conclusion, des expérience pompe-sonde à l'échelle ps, on peut dénombrer trois constantes de temps différentes : un temps inférieur à 12 ps (limite expérimentale avec le laser ps), un temps de l'ordre de grandeur de quelques ns et un temps de 300 ps qui correspondent à des états en cours de peuplement.

Sur les signaux pompe-sonde à l'échelle de quelques μs , la première remarque importante est la disparition du fragment m/z 44 à l'échelle μs . Le fragment m/z 54 (voir la figure 4.32(a)) présente un signal croissant sur quelques μs avant d'atteindre un palier. Le fragment m/z 109 suit le même comportement que le fragment m/z 54 mais en déplétion. En modélisant le signal expérimental de ces fragments, on peut extraire une constante de temps de 400 ns. Le signal du fragment m/z 110 est constant sur 4 μs et ne présente pas de dynamique sur la suite de l'échelle microseconde. La partie (b) de la figure 4.32 présente le signal pompe-sonde observé à une échelle ms. Le fragment m/z 54 diminue jusqu'à disparaître avec un temps caractéristique de 4 ms. On voit que le fragment m/z 109 (de même que les fragments m/z 84 et m/z 110) revient à sa valeur d'origine.

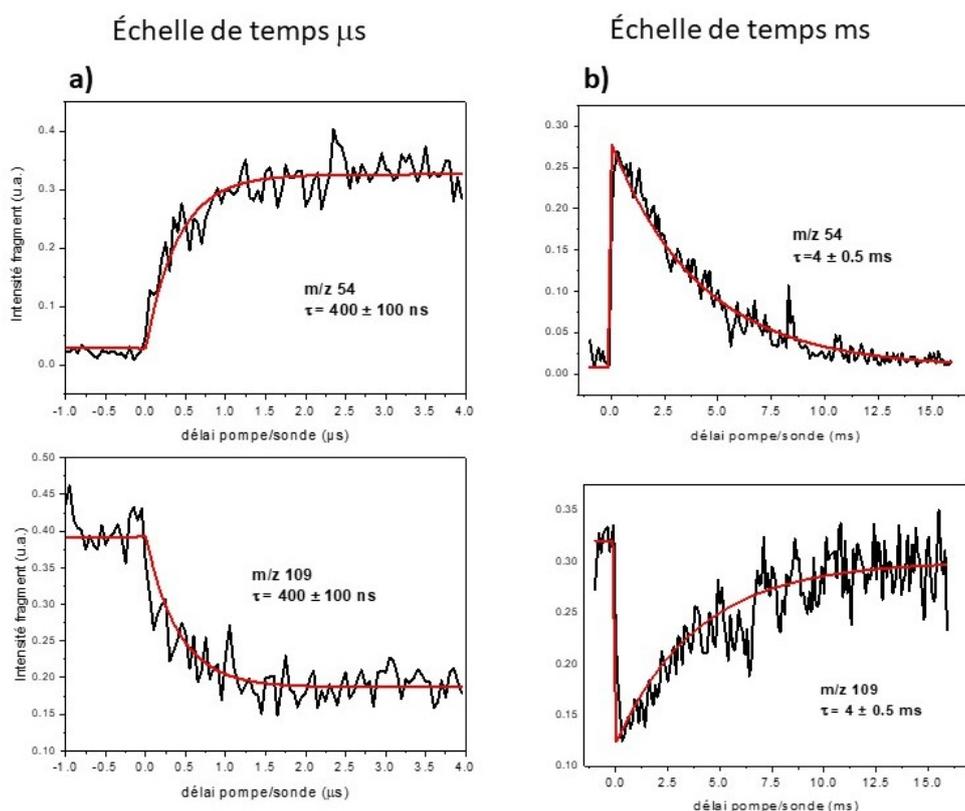


Figure 4.32 – Signal pompe-sonde à l'échelle microseconde avec la thymine protonée à 267,2 nm : a) à l'échelle μs et b) à l'échelle ms sur les fragment m/z 54 et m/z 109 avec un laser d'excitation à 267,2 nm et un laser de sonde à 355 nm. Les courbes en rouge sont les simulations du signal avec les constantes de temps τ .

Les expériences pompe-sonde multi-échelle sur la thymine protonée ont permis d'observer trois temps différents sur le fragment m/z 54. Contrairement au cas de l'uracile éinol, le fragment m/z 44 ne présente pas le même comportement temporel que le fragment m/z 54, l'attribution des constantes de temps observées est donc plus difficile à réaliser. Dans la suite de cette partie, nous essayerons de nous appuyer sur les calculs pour proposer un chemin de relaxation.

4.2.3 . Calculs théoriques

Des calculs en CC2/aug-cc-pVDZ ont été réalisés sur la forme éinol de TH^+ . Le calcul vertical prédit une première transition électronique vers un état ${}^1\pi\pi^*$ à 5,07 eV avec une force d'oscillateur de 0,1127. Cette transition est plus susceptible d'être attribuée au bandes du spectre expérimental de la figure 4.27, la valeur estimée expérimentalement est de 4,64 eV. Le second état calculé en vertical est de nature ${}^1n_N\pi^*$ et est localisé à 5,85 eV avec une force d'oscillateur beaucoup plus faible de 0,0019. Cette transition se caractérise par la transition d'un électron d'une paire libre de l'azote vers une orbitale moléculaire π antiliante. Une représentation des ces états électroniques est donnée dans la figure 4.33.

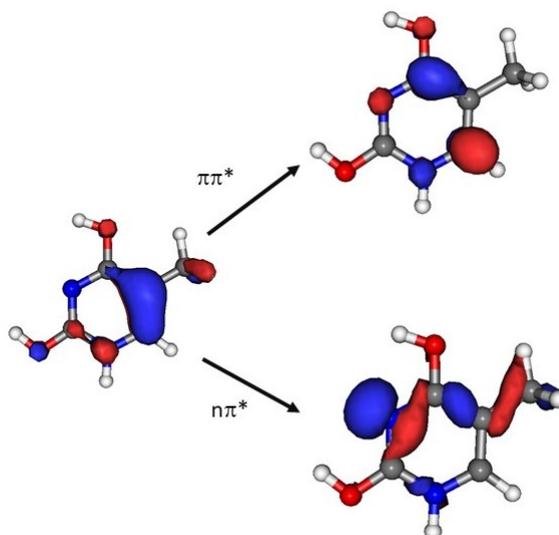


Figure 4.33 – Représentation des orbitales moléculaires impliquées dans les transitions électroniques de la thymine protonée, obtenues par un calcul CC2/aug-cc-pVDZ.

Enol TH ⁺	
Etat	Energie
T_1 $^3\pi\pi^*$	3,80
S_1 $^1\pi\pi^*$	4,81
T_2 $^3\pi\pi^*$	5,14
T_3 $^3\pi\pi^*$	6,01
T_4 $^3\pi\pi^*$	6,28
S_2 $^1n_N\pi^*$	6,47

Table 4.3 – Energie des transitions électroniques (en eV) vers les états singulets et triplets de la thymine protonée dans la géométrie C_s de l'état $^1\pi\pi^*$, avec la méthode SCS-CC2/aug-cc-pVDZ.

La structure de l'état $^1\pi\pi^*$ a été optimisée en conservant la symétrie C_s . Le tableau 4.3 présente les énergies de transition vers chaque état dans la géométrie optimisée de l'état $^1\pi\pi^*$. L'optimisation de l'état S_1 ($^1\pi\pi^*$) conduit à une énergie de transition de 4,81 eV. En tenant compte de la correction de l'énergie de point zéro, la transition adiabatique est de 4,61 eV, ce qui est en très bon accord avec la valeur expérimentale de 4,64 eV.

En conservant la géométrie de l'état $^1\pi\pi$, le second état singulet $^1n_N\pi^*$ est localisé environ 1,5 eV plus haut en énergie à 6,47 eV (tableau 4.3). L'optimisation de géométrie de cet état $^1n_N\pi^*$ est calculée à 5,12 eV en conservant la symétrie C_s . Au vu de l'écart énergétique avec l'état $^1\pi\pi^*$, on peut supposer qu'aucun croisement n'existe entre l'état $^1n_N\pi^*$ et l'état $^1\pi\pi$. L'état $^1n_N\pi^*$ ne joue donc pas un rôle dans le processus de relaxation autour de la bande origine.

Le premier état triplet est localisé 1 eV plus bas dans la géométrie de l'état $^1\pi\pi^*$. La relaxation vers cet état semble donc possible comme dans le cas de l'uracile protonée.

De la même façon que l'uracile énol, la structure optimisée en symétrie C_s de l'état $^1\pi\pi^*$ n'est pas un minimum de la surface d'énergie potentielle et présente une fréquence négative (-73 cm^{-1}) sur un mode hors plan de la liaison

$C_5H-C_6CH_3$. En enlevant la contrainte sur la symétrie, la structure se déforme et évolue vers une intersection conique. Cette région de croisement S_1/S_0 est estimée à 0,2 eV en dessous de l'état $^1\pi\pi^*$. La géométrie de l'intersection conique présente une structure de type éthylène comme dans l'intersection conique de l'uracile énoil. La présence de cette intersection conique offre une voie de relaxation directe entre l'état $^1\pi\pi^*$ et l'état fondamental.

4.2.4 . Processus de relaxation dans le tautomère énoil de la thymine protonée

Au vu des résultats théoriques et expérimentaux on perçoit des points communs avec le cas de l'uracile énoil. On peut donc penser que le processus de relaxation est similaire. L'élargissement spectral permet d'estimer la durée de vie de l'état $^1\pi\pi^*$ à environ 60 fs. Les calculs prédisent qu'à partir de cet état, le système devrait évoluer vers au moins une intersection conique. Shahrokh et al [103] ont aussi réalisé une étude théorique avec des méthodes multiconfigurationnelles sur la thymine protonée afin d'étudier l'accès vers différentes intersections coniques de la surface d'énergie potentielle. Ils ont mis en évidence l'accès à une intersection conique sans barrière entre l'état S_1 et S_0 . Comme dans le cas de l'uracile énoil, la géométrie de cette intersection conique présente une déformation du carbone C_6 hors du plan de la molécule. Ils ont localisé cette intersection conique à 0,18 eV plus bas en énergie que la géométrie de la transition verticale du $^1\pi\pi^*$. Toutefois, une différence se présente par rapport à l'uracile énoil : dans ce dernier, ils ont déterminé qu'à la géométrie de l'intersection conique l'état triplet $^3\pi\pi^*$ est quasiment dégénéré avec l'état $^1\pi\pi^*$, ce qui permet à une partie de la population d'accéder à l'état triplet. Dans le cas de TH^+ , l'étude ne discute pas de la présence d'un état triplet à proximité de l'intersection conique. Or, expérimentalement, on mesure un temps de 4 ms et, par comparaison avec l'uracile énoil, il pourrait être attribué à l'état $^3\pi\pi^*$.

En observant la dynamique multi-échelle du fragment m/z 54 on peut proposer un mécanisme de relaxation similaire à celui de l'uracile énoil. L'état localement excité a une durée de vie de ~ 60 fs avant d'évoluer vers une région de la surface

d'énergie potentielle en 300 ps, où l'état excité $^1\pi\pi^*$ et l'état $^3\pi\pi^*$ seraient dégénérés et permettraient de se relaxer vers le triplet. La constante de temps de 400 ns mesurée sur ce fragment impliquerait une autre région de dégénérescence qui permettrait à la population de se relaxer ensuite vers l'état triplet dont la durée de vie est mesurée à 4 ms.

Au vu des résultats des cinétiques d'apparition des fragments, la population de l'état triplet se relaxerait par croisement inter-système vers l'état fondamental et fragmenterait. Avec les résultats théoriques dont on dispose, il n'est pas possible d'affirmer catégoriquement la nature de l'état conduisant la population excitée vers l'état triplet.

Au vu des expériences pompe-sonde à l'échelle ps, il semble que le processus de relaxation soit un peu plus complexe dans le cas de la thymine protonée, les deux temps observés sur le fragment m/z 44 sont nettement différents du temps de 300 ps mesuré sur le fragment m/z 54. On aurait donc deux autres régions de la surface d'énergie potentielle $^1\pi\pi^*$ à peupler, une région peuplée à un temps inférieur à la ps et une région peuplée avec un temps de quelques ns. On peut supposer que la composante la plus rapide correspond au peuplement de la région de l'intersection conique (déformation de l'atome de carbone C₆ calculé par Shahrokh et al) qui s'effectue sans barrière.

Shahrokh et al[103] ont aussi simulé les trajectoires que pouvait prendre la population excitée pour se relaxer vers le fondamental. Sur l'ensemble des trajectoires, la grande majorité suit l'intersection conique du C₆, mais ils ont aussi observé que environ 10% des trajectoires se relaxaient via l'intersection conique présentant une déformation sur le carbone C₄. Selon leur calcul, le passage vers cette intersection conique doit passer par une barrière, ce qui pourrait expliquer la constante de temps de quelques ns. Il faudrait donc plus de temps à cette population pour atteindre la région de l'intersection conique liée à la déformation du carbone C₄.

En conclusion, dans les tautomères enol (uracil et thymine) on peut clairement identifier un processus de relaxation où la population excitée accède depuis la région Franck-Condon à une intersection conique sans barrière, où les états

$^1\pi\pi^*/^3\pi\pi^*/S_0$ sont dégénérés. La géométrie de cette intersection conique est caractérisé par une déformation hors du plan du carbone C_6 . A partir de cette région de la surface d'énergie potentielle la population excitée se relaxe soit vers l'état fondamental S_0 soit vers un état triplet $^3\pi\pi^*$. La durée de vie de l'état triplet est de l'ordre de quelques millisecondes. La population présente dans l'état triplet se relaxe ensuite vers l'état fondamental par passage inter-système. L'observation de plusieurs constantes de temps différentes à l'échelle picoseconde suggère la présence d'autres intersections coniques entre l'état $^1\pi\pi^*$, l'état $^3\pi\pi^*$ et/ou l'état fondamental. La détermination de ces intersections coniques nécessiterait l'appui supplémentaire de calcul multi-configurationnelle.

4.3 . Guanine protonée

4.3.1 . Spectroscopie de photodissociation

La guanine est une purine, elle possède un cycle à 6 atomes proches de la cytosine dans lequel la double liaison C=C appartient aussi à un cycle à 5 atomes de type imidazole. La molécule protonée est représentée sur la figure 4.34. Le tautomère le plus stable de la guanine neutre est la forme possédant un atome d'hydrogène sur l'azote N₉. A partir de ce tautomère Chandra et al. [104] ont estimé le site de protonation le plus favorable sur l'atome d'azote N₇.

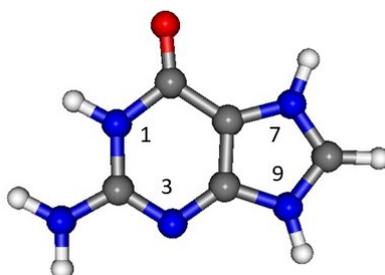


Figure 4.34 – Structure de la guanine protonée avec numérotation des atomes d'azote.

La spectroscopie de la guanine protonée a été publiée précédemment par Berdakin et al.[92] Le spectre présente une succession de bandes vibroniques à partir de 32665 cm^{-1} (306,1 nm, 4,05 eV) puis présente une large bande d'absorption plus haut en énergie.

Le spectre de masse de la guanine protonée après photoexcitation à 292,95 nm est présenté sur la figure 4.35. Gregson et al[105] ont proposé plusieurs mécanismes pour attribuer les fragments observés par CID. Le fragment majoritaire correspond à la perte de la molécule de NH₃. Les fragments m/z 110 et m/z 109 proviennent de la perte des molécules neutres NH₂CN et HNCO. Un pic de masse de faible intensité est observé à m/z 43 qui correspond à la même voie de fragmentation que l'ion m/z 110 mais avec un transfert de proton pour former l'ion NH₂CNH⁺.

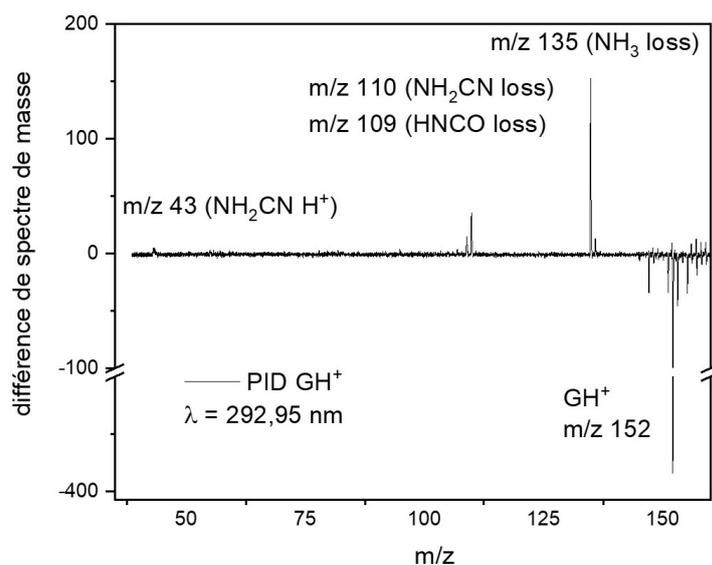


Figure 4.35 – Différence de spectre de masse de la guanine protonée avec un laser d'excitation à 292,95 nm.

Le spectre de photodissociation UV à une couleur présenté sur la figure 4.36 a été enregistré dans la région 308-290 nm. Sur le fragment m/z 135 (perte de NH_3) on observe deux bandes assez faibles en intensité à 301.85 et 302.5 nm suivies par la présence de plusieurs bandes résolues qui sont superposées à un fond qui débute autour de 300 nm. Le spectre de photodissociation enregistré sur le fragment m/z 43 est assez différent du fragment m/z 135. On a principalement une bande large dans la région 300 - 290 nm, ce qui correspond à la région où on observe le fond d'absorption sur le fragment m/z 135. On perçoit très faiblement quelques bandes vibroniques qui ressortent de ce fond continu.

La figure 4.37 présente la spectroscopie enregistrée avec deux couleurs (un laser accordable UV + 532 nm avec un retard de 1 ns). On peut observer sur le fragment m/z 135 l'apparition de nouvelles bandes dans la région des basses fréquences qui n'étaient pas observées à une couleur entre 306 et 303 nm. La bande à 305.5 nm correspond à la bande origine. On observe également une augmentation de l'intensité des bandes à 302.6 et 301.85 nm par rapport au spectre à une couleur. Le signal sur le fragment m/z 135 après 300 nm est identique au signal à une couleur. On observe le même comportement sur le fragment m/z 43.

A partir de la spectroscopie UV on peut déjà avoir des informations sur le pro-

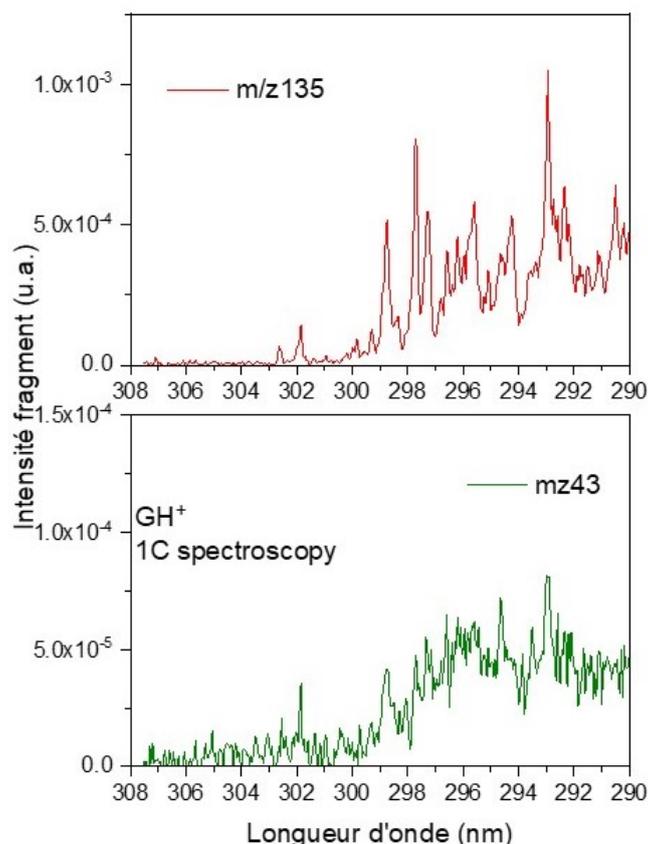


Figure 4.36 – Spectroscopie de photodissociation UV de la guanine protonée à 1 couleur enregistré sur le fragment m/z 135 et m/z 43

cessus de relaxation. On n'observe pas de signal de photofragmentation à une couleur sur les premières bandes du spectre. Pour observer un signal de photofragmentation, il est nécessaire de rajouter un deuxième photon. Cela montre que le premier laser UV a bien excité une population de l'état fondamental vers une bande de l'état excité, mais il semble que la population portée à l'état excité ne conduit pas à la fragmentation. On peut proposer plusieurs hypothèses pour l'expliquer.

Premièrement, il est possible que lors du retour à l'état fondamental la molécule n'ait plus assez d'énergie pour franchir les barrières de dissociation et donc ne puisse pas se fragmenter. Cette hypothèse semble néanmoins relativement faible dans la mesure où l'absorption d'un photon à ~ 300 nm ($\sim 4,13$ eV) représente un

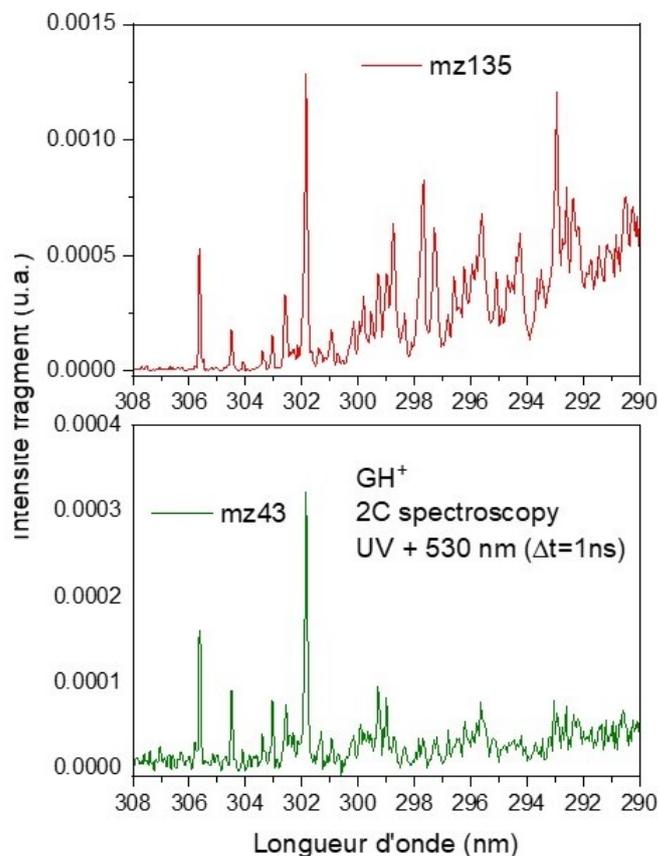


Figure 4.37 – Spectre de photodissociation de la guanine protonée à deux couleurs enregistré sur le fragment m/z 135 et m/z 43

apport en énergie qui doit être suffisant pour être au dessus des barrières de dissociation à l'état fondamental.

Deuxièmement, la population excitée se retrouve piégée dans un état excité à très longue durée de vie, et le retour à l'état fondamental est beaucoup plus long que ce que nous pouvons mesurer expérimentalement, c'est-à-dire au delà de plusieurs dizaines de millisecondes. Toutefois, sur les échelles de temps les plus longues avec les bases pyrimidiques, on a mesuré des temps de l'ordre de quelques millisecondes à une dizaine de millisecondes. Cela peut donc paraître surprenant au premier abord.

Une dernière hypothèse serait un processus de relaxation radiatif à l'œuvre

sur les premières bandes vibroniques.

Pour les longueurs d'onde inférieures à 300 nm, on remarque que le signal de photofragmentation obtenu à deux couleurs est identique à celui obtenu à une couleur. On peut noter que l'absence d'un effet à deux couleurs se manifeste dans la même gamme d'énergie que l'apparition du fond d'absorption continu observé.

Ces changements drastiques dans la spectroscopie de photodissociation sur une gamme énergétique aussi restreinte, sont le signe d'une dynamique complexe de l'état localement excité. Ce type de comportement a déjà été observé sur l'uracile Kéto, comme vu précédemment [106] et plus particulièrement, l'absence de fragmentation à une couleur quand on excite la bande origine a déjà été observée sur les aminopyridines protonées [100].

4.3.2 . Spectroscopie nanoseconde

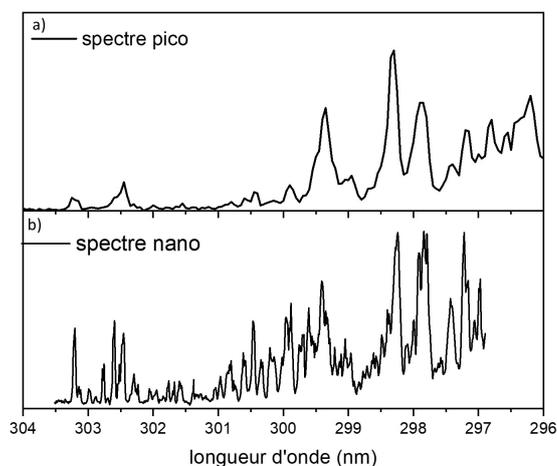


Figure 4.38 – Spectres UVPD de la guanine protonée obtenu avec (a) le laser picoseconde et (b) le laser à colorant nanoseconde.

Afin de vérifier si la largeur des bandes vibroniques est limitée par la résolution du laser ps ($8\text{-}10\text{ cm}^{-1}$), on a enregistré le spectre UVPD avec un laser à colorant pour avoir une meilleure résolution dans la région 304-296 nm. Le spectre obtenu avec le laser à colorant nanoseconde est comparé au spectre obtenu avec le laser picoseconde dans la figure 4.38.

Dans la région 303,5-302 nm, on observe plusieurs bandes vibroniques très fines qui ne sont pas discernables sur le spectre UVPD à une couleur obtenu avec le laser picoseconde. On résout parfaitement les bandes à 303,2 nm et 302,5 nm et on peut donc conclure que ces bandes sont constituées de plusieurs bandes vibroniques.

On peut aussi se demander s'il n'y avait pas la possibilité d'avoir plusieurs tautomères de la guanine présents au sein du piège bien que la spécificité N₉/N₇ de la guanine neutre disparaisse avec la protonation. Pour vérifier cette hypothèse, on a effectué des expériences de *hole-burning* (voir figure 4.39(b)). La spectroscopie *hole-burning* a été enregistrée dans la région 303,5-302,2 nm et dans la région 301-299 nm.

Puisque toutes les bandes du spectre UVPD apparaissent dans le spectre *hole-burning*, on peut conclure que le spectre enregistré entre 296-303 nm est celui d'un seul et même tautomère dans la région de la bande origine de la guanine. Berdakin et al ont attribué ce spectre au conformère présentant un hydrogène sur l'atome N₉ et un proton sur l'atome N₇[92]

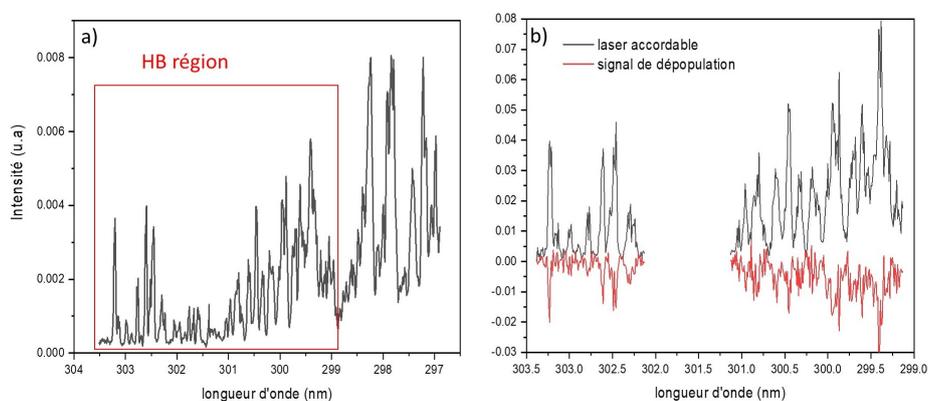


Figure 4.39 – Spectroscopie *hole burning* de la guanine protonée : (a) région du spectre nano balayée pour la spectroscopie *hole burning* (b) spectroscopie *hole-burning* enregistrée sur le fragment m/z 135. Le spectre en noir est obtenu en balayant le laser à colorant, le signal en rouge est celui de dépopulation obtenu en excitant avec un laser *burn* à 299,5 nm et en balayant le laser à colorant.

4.3.3 . Cinétique d'apparition

La bande origine ne présentant pas de voie de fragmentation avec un photon UV, la cinétique d'apparition des fragments sur une échelle μs a été obtenue en excitant la bande à 301,85 nm (figure 4.40).

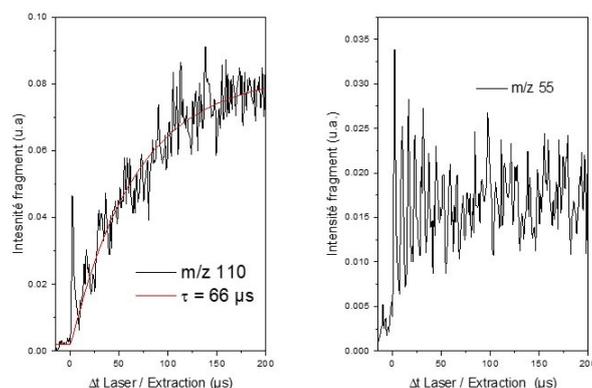


Figure 4.40 – Cinétique d'apparition des fragments à l'échelle μs de la guanine protonée en excitant la bande à 301.85 nm enregistrée sur les fragments m/z 110 et m/z 55

La cinétique d'apparition des fragments enregistrée sur le fragment m/z 110 ou m/z 135 présente une composante très rapide mais qui diminue très rapidement en quelques μs , puis le signal augmente de façon plus lente sur 200 μs . La composante lente est simulée avec une exponentielle croissante comprenant une constante de temps de 66 μs à la longueur d'onde d'excitation de 301,85 nm. Le fragment m/z 55 est aussi présenté sur la figure 4.40, on voit que la formation du fragment m/z 55 est très rapide, on ne peut pas la mesurer expérimentalement (inférieure à la centaine de ns), mais le fragment m/z 55 ne présente pas de composante μs . On peut expliquer l'apparition du pic "très court" dans la cinétique d'apparition du fragment m/z 110 par une relaxation très rapide vers l'état fondamental permettant une fragmentation rapide (inférieure à la centaine de ns). Ce fragment a ensuite la possibilité de se dissocier également rapidement pour former des fragments plus petits tels que le fragment secondaire m/z 55, c'est pourquoi on observe une diminution de son signal. En effet Gregson, à partir d'expériences de dissociation induite par collisions, a proposé un mécanisme

de formation de l'ion m/z 55 à partir du fragment m/z 110.[105]. A l'échelle μs , on continue à produire du fragment m/z 110, alors que le signal sur le fragment m/z 55 n'évolue plus, signe que plus aucun fragment m/z 55 est formé. A cette échelle temporelle, le fragment m/z 110 n'a pas assez d'énergie interne pour se fragmenter et donner du m/z 55. On peut émettre alors l'hypothèse que ce comportement est la signature de deux processus de fragmentation conduisant à la formation du fragment m/z 110, un à l'échelle ns et l'autre à l'échelle μs . L'augmentation de l'énergie d'excitation de 400 cm^{-1} par rapport à la bande origine permet d'ouvrir deux voies de relaxation différentes.

4.3.4 . Expériences pompe-sonde.

Bande origine à 305,65nm.

La figure 4.41 présente le signal pompe-sonde enregistré sur le fragment m/z 135 en excitant la bande origine à 305,65 nm et en sondant la population excitée avec un laser à 532 nm à l'échelle ps.

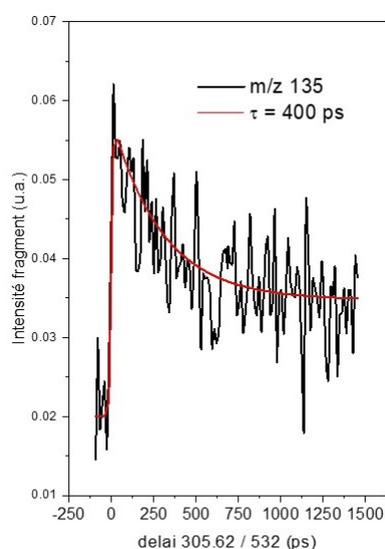


Figure 4.41 – Expérience pompe-sonde sur la bande origine à 305,65 nm avec un laser de sonde à 532 nm sur l'échelle ps

Comme sur le spectre de photodissociation UV à deux couleurs on observe l'apparition du fragment m/z 135 après absorption à 532 nm. Ce signal transitoire

diminue en une centaine de ps pour atteindre un palier. On extrait une constante de temps de 400 ps.

la figure 4.42 montre le signal pompe-sonde sur une échelle μs obtenu en excitant la bande origine avec un laser de sonde de 532 nm. Le signal enregistré sur le fragment m/z 55 montre que l'on a un signal très intense qui diminue très rapidement, puis qui présente une diminution plus lente que l'on simule par une exponentielle décroissante avec une constante de temps de $16 \mu s$. Le signal reste ensuite sur un palier d'intensité. La composante rapide du signal est associée à l'auto corrélation des lasers consécutive à une population qui se désexcite sur une échelle nanoseconde. La présence du palier est encore incertaine, nous n'avons pas vraiment vu ce palier décroître mais des expériences à une échelle ms pourraient le confirmer.

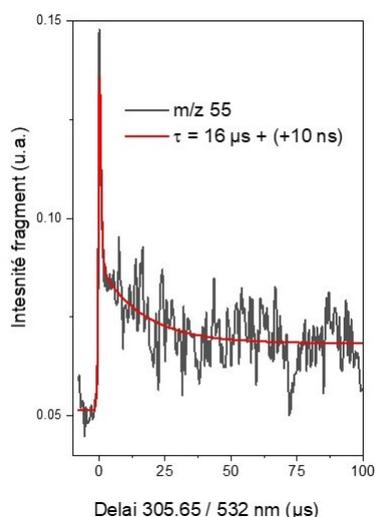


Figure 4.42 – Expérience pompe-sonde sur la bande origine à 305,65 nm avec un laser de sonde à 532 nm sur une échelle μs enregistrée sur le fragment m/z 55

Bande à 301,85 nm.

La figure 4.43 présente les signaux pompe-sonde obtenus sur une échelle μs en utilisant un laser de sonde à 532 nm. Sur le fragment m/z 135 on observe une augmentation du signal très rapide au temps zéro puis une déplétion du signal. Le fragment m/z 135 retrouve sa valeur d'origine avec une constante de temps que

l'on estime aussi de l'ordre de $12\mu\text{s}$. Sur le fragment m/z 82 on observe le signal d'un fragment en apparition qui décroît en quelques dizaine de μs , une simulation par une exponentielle décroissante permet d'obtenir une constante de temps de $12\mu\text{s}$.

Le signal en augmentation au début du signal pompe/sonde sur le fragment m/z 135 est en accord avec le spectre de photo-dissociation à 2 couleurs puisque la bande à $301,85\text{ nm}$ augmentait fortement avec l'ajout du laser à 532 nm . Ce signal est caractéristique d'une population qui se désexcite avec un temps inférieur à 10 ns .

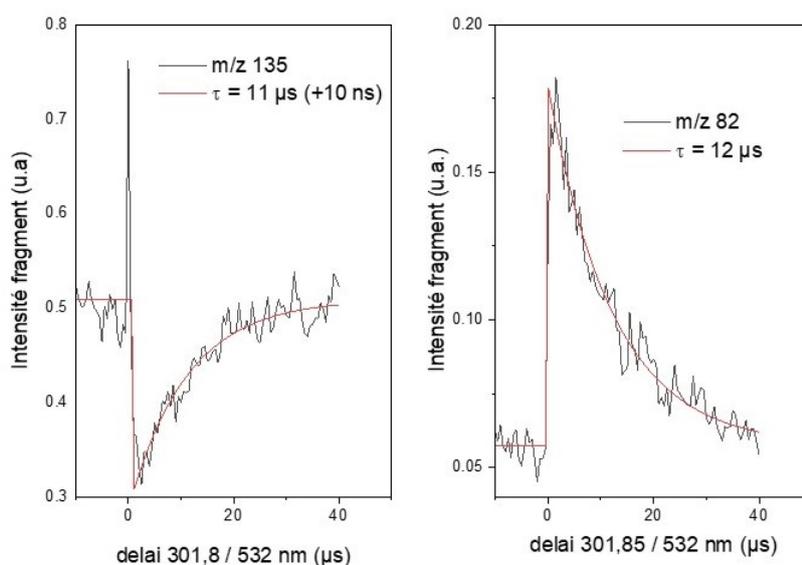


Figure 4.43 – Expériences pompe-sonde sur la bande à $301,85\text{ nm}$ avec un laser de sonde à 532 nm sur une échelle μs enregistrées sur les fragments m/z 135 et m/z 82

La constante de temps mesurée d'une dizaine de μs à la fois sur la bande origine ou sur la bande à $301,85\text{ nm}$ indique qu'à partir de l'état localement excité, on atteint un état caractérisé par un temps d'une dizaine de μs . La durée de vie de cet état raccourcit avec l'augmentation de l'excès d'énergie, ce qui est attendu.

Région d'énergie supérieure à 300 nm.

Dans cette région spectrale où la spectroscopie de photofragmentation à une ou deux couleurs est identique, aucun signal pompe-sonde n'a été obtenu sur les bandes situées à 298,75, 297,35 et 292,95 nm quand on les sonde avec un laser à 532nm. Pour de nouveau obtenir un signal pompe-sonde, il faut utiliser un laser de sonde à 355 nm. Les signaux pompe-sonde sur les bandes à 298,75, 297,35 et 292,95 nm sont présentés sur la figure 4.44

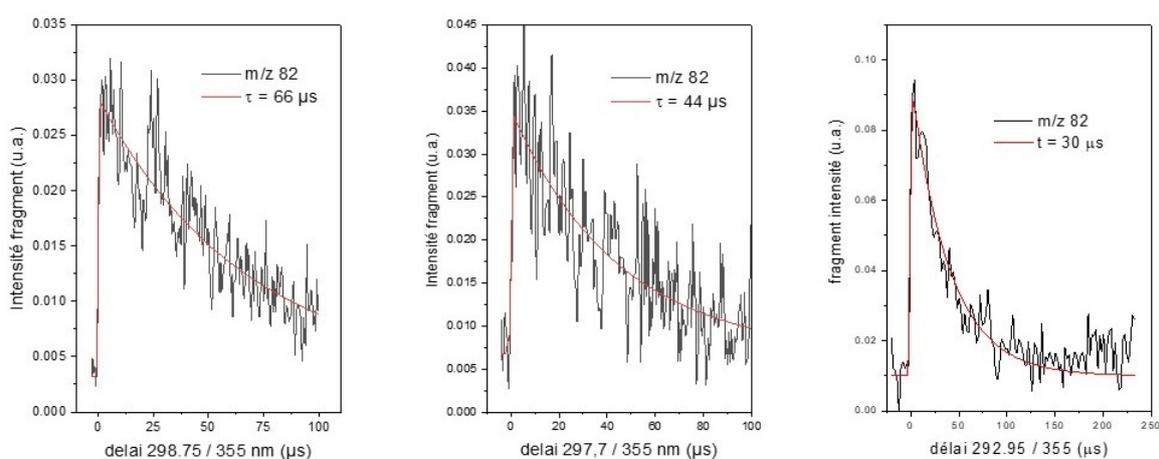


Figure 4.44 – Expériences pompe-sonde à l'échelle μs sur les bandes à 298,75 nm, 297,35nm et 292,95 nm avec un laser de sonde à 355 nm enregistrées sur le fragment m/z 82

En excitant la bande à 298.75 nm on observe sur le fragment m/z 82 un signal décroissant sur 100 μs qui s'approche de zéro. En simulant avec une mono-exponentielle décroissante on obtient une constante de temps de 66 μs . En augmentant l'énergie d'excitation on voit que la constante de temps estimée diminue à 44 μs pour $\lambda = 297,7$ nm et 30 μs pour $\lambda = 292,95$ nm. Lorsqu'on réalise l'expérience avec la sonde à 355 nm les expériences pompe-sonde sur la bande origine et celle située à 301.85 nm, les signaux obtenus présentent toujours une composante ns et une composante de 11 μs comme mesurée avec la sonde à 532 nm, auxquelles se rajoute une composante plus longue que nous n'avons pas mesurée.

Dans cette région spectrale, on mesure une constante de temps ($> 30 \mu\text{s}$) beaucoup plus longue que la 16-12 μs mesurée à plus basse énergie d'excitation. Cela révèle que deux états à longue durée de vie entrent en jeu dans le processus de relaxation de la guanine protonée et que leur accessibilité dépend de la longueur d'onde d'excitation de l'état localement excité.

Les données spectroscopiques à deux couleurs, l'absence de signal pompe-sonde avec une sonde à 532 nm et l'allongement de la durée de vie à 30-60 μs dans la région spectrale 300-290 nm indiquent qu'une nouvelle voie de désexcitation est ouverte et qu'elle semble conduire vers un état excité différent de l'état sondé à l'échelle μs sur les premières bandes.

4.3.5 . Calculs théoriques

Les calculs théoriques ont été réalisés pour essayer d'identifier les états excités impliqués dans le processus de relaxation. Des calculs verticaux et des optimisations de géométries ont été réalisés avec la méthode SCS-CC2/aug-cc-pVDZ. Les résultats des calculs verticaux sont présentés dans le tableau 4.4.

Le premier état accessible est l'état S_1 (état $^1\pi\pi^*$, ou L_a dans la littérature) localisé à 4,68 eV. Le second état excité à +0,39 eV est aussi un état $^1\pi\pi^*$ (L_b) mais dont la densité électronique est transférée d'un cycle à l'autre. Un état à transfert de charge $^1n_O\pi^*$ est aussi calculé comme étant le troisième état excité possible à +0,59 eV. Le quatrième état excité est un état de type $^1\pi\sigma^*$ calculé à +1,50 eV. Les calculs verticaux prédisent ainsi trois états excités relativement proches en énergie qui pourraient intervenir dans le processus de relaxation.

Des optimisations de géométrie avec la même méthode de calcul ont été réalisées sur ces états. Les structures obtenues après optimisation et leur énergies adiabatiques sont données dans la figure 4.45 et ???. La structure optimisée de l'état $^1\pi\pi^*$ présente une légère distorsion hors du plan de la liaison N₇ – H. La transition adiabatique entre l'état fondamental et l'état S_1 est calculée à 4,03 eV, ce qui est très proche de la valeur expérimentale de 4,05 eV (La valeur expérimentale est déterminé à partir de la spectroscopie deux couleurs figure 4.37). En conservant la

	Energie (eV)	Force d'oscillateur
${}^1\pi\pi^*(L_a)$	4,68	$1,4 \times 10^{-1}$
${}^1\pi\pi^*(L_b)$	5,07	$2,9 \times 10^{-1}$
${}^1n_O\pi^*$	5,27	1×10^{-5}
${}^1\pi\sigma^*$	6,18	5×10^{-5}

Table 4.4 – Energies des transitions (calculs verticaux) de la guanine protonée en SCS-CC2/aug-cc/pVDZ.

géométrie de la structure de l'état ${}^1\pi\pi^*$ optimisée, l'état ${}^1n_O\pi^*$ est localisé +1,55 eV plus haut en énergie et le deuxième état ${}^1\pi\pi^*$ est localisé +1,83 eV.

L'optimisation de l'état ${}^1n_O\pi^*$ donne un minimum à 4,20 eV soit +0,17 eV par rapport au minimum de l'état S_1 . La géométrie est aussi quasiment plane avec une déformation hors du plan de la liaison N_1-H . Dans cette géométrie l'état ${}^1\pi\pi^*$ est situé à +0,72 eV on peut donc avoir un croisement entre ces deux états entre +0,17 et +0,72 eV.

Le deuxième état ${}^1\pi\pi^*$ ne peut pas être optimisé avec la méthode SCS-CC2. Au cours de l'optimisation, cet état devient dégénéré avec l'état S_1 et empêche la convergence du calcul. Il y a donc un croisement possible entre les états ${}^1\pi\pi^*$. Mais pour connaître la position de cette intersection il faudrait employer des méthodes de calcul multi-configurationnelles. Le premier état triplet ${}^3\pi\pi^*$ est optimisé à 3,01 eV, soit 1 eV plus bas en énergie que l'état ${}^1\pi\pi^*$ optimisé.

Etat	${}^1\pi\pi^*$	${}^1n_O\pi^*$	${}^3\pi\pi^*$
Energie adiabatique (eV)	4,03	4,20	3,01
Valeur expérimentale (eV)	4,05		

Table 4.5 – Energies de transition adiabatique de la guanine protonée calculée au niveau SCS-CC2/aug-cc-pVDZ

Les tableaux 4.6 et 4.7 donnent les transitions électroniques des états $n_O\pi^*$ et ${}^3\pi\pi^*$ depuis leur géométrie optimisée. On peut voir que l'état à transfert de charge a la possibilité d'absorber à la fois un laser de sonde à 532 nm (excitation du S_2) et

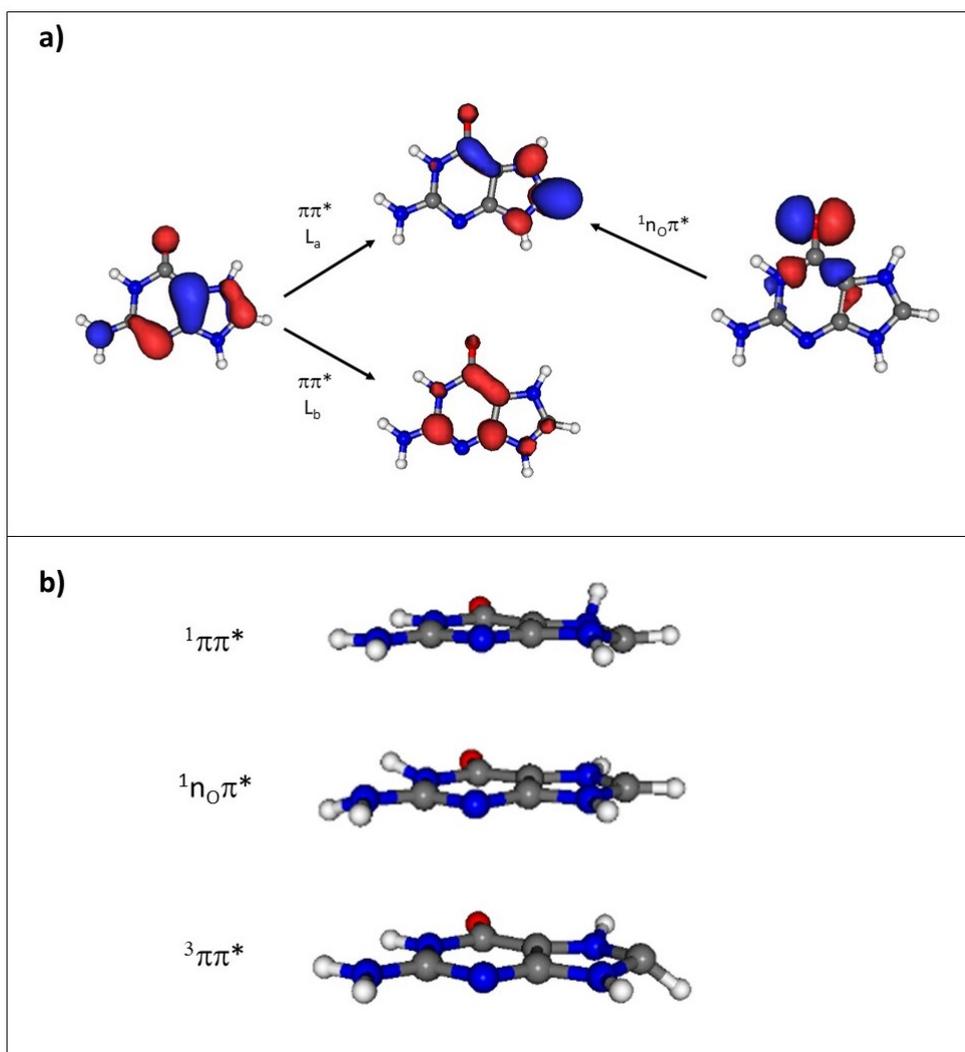


Figure 4.45 – a) Orbitales moléculaires impliquées dans les transitions électroniques de la guanine protonée. b) Structures optimisées des états excités calculées au niveau SCS-CC2/aug-ccpVDZ

un laser de sonde à 355 nm (excitation du S₅) L'état triplet ne peut pas absorber un photon à 532 nm, il peut cependant absorber un photon à 355 nm. Ceci permet de proposer une attribution des états excités impliqués dans les signaux pompe-sonde enregistrés : l'état à durée de vie 16-11 μ s est l'état $n\pi^*$ qui absorbe à 532 nm et 355 nm, alors que l'état à durée de vie 60-30 μ s est l'état triplet $^3\pi\pi^*$ qui absorbe uniquement à partir de 355 nm.

Transition	Energie(nm)
S1→S2	1714 (1,7.10 ⁻⁶)
S1→S3	876 (3,2.10 ⁻⁶)
S1 → S4	687 (5,8.10 ⁻²)
S1 → S5	592 (8,0.10 ⁻⁵)
S1 → S6	498 (7,4.10 ⁻²)

Table 4.6 – Transitions électroniques (nm) dans la géométrie optimisée de l'état $n_O\pi^*$ avec la méthode SCS-CC2/aug-cc-pVDZ , (en parentheses les forces d'oscillateur les plus importantes)

Transition	Energie (nm)
T1 → T2	539 (1,1.10 ⁻⁴)
T1 → T3	513 (1,1.10 ⁻²)
T1 → T4	447 (1,4.10 ⁻²)
T1 → T5	413 (1,5.10 ⁻²)

Table 4.7 – Transitions électroniques verticales (nm) dans la géométrie optimisée de l'état ${}^3\pi\pi^*$ avec la méthode SCS-CC2/aug-cc-pVDZ

4.3.6 . Processus de relaxation

La transition adiabatique calculée à 4,03 eV est très proche de la valeur expérimentale de 4,05 eV. Le premier état excité optiquement actif est bien l'état ${}^1\pi\pi^*$. Dans un premier temps, je vais discuter du processus de relaxation sur la bande origine, l'information importante est qu'aucune voie de relaxation non radiative n'est ouverte vers l'état fondamental car aucun signal de fragmentation n'est observé à une couleur sur cette bande. Il doit donc exister une voie de relaxation radiative. Ce type de processus a déjà été observé sur les aminopyridines protonées[100]. Les bandes origines du 3-aminopyridine et du 4-aminopyridine ne sont pas visibles dans le spectre de photodissociation UV. Dans le cas du 3-aminopyridine, l'unique voie de relaxation possible est la désexcitation par fluorescence. Dans le cas du 4-amynopyridine, après excitation UV, la population ex-

citée se relaxe vers un état à transfert de charge où elle se retrouve piégée sans possibilité d'effectuer de conversion interne vers l'état fondamental. Dans la guanine protonée, une durée de vie de 400 ps a été mesurée par des expériences pompe-sonde que l'on peut attribuer au premier état $^1\pi\pi^*$ (L_a). Les expériences pompe-sonde ont permis de mesurer une constante de temps de 16 μs , cette valeur est trop grande pour l'attribuer à la durée de vie d'un état $^1\pi\pi^*$. La durée de vie de la guanine est estimée à 10 ns (à partir de la force d'oscillateur de l'état $^1\pi\pi^*$). Comme dans le cas de l'uracile kéto un état $^1n_O\pi^*$ est estimé 0.17 eV au dessus en énergie, on est donc proche des barres d'erreur. Par analogie au mécanisme proposé pour l'uracile kéto, il est possible que l'état $^1\pi\pi^*$ soit couplé à l'état $^1n_O\pi^*$. L'absence de signal de fragmentation indique que l'état localement excité $^1\pi\pi^*$ et l'état $^1n_O\pi^*$ ne sont pas couplés à l'état fondamental. Il y a forcément un processus de fluorescence qui a lieu au niveau de la bande origine mais pour l'instant il est difficile de savoir depuis quel état se réalise la relaxation radiative, mais certainement pas depuis l'état localement excité $^1\pi\pi^*$ (L_a).

Quand on excite la bande à 301.85 nm on augmente l'énergie interne d'environ 400 cm^{-1} , cet excès d'énergie semble suffisant pour que l'on voie apparaître une compétition entre la voie radiative et la conversion interne. Sur cette bande nous avons aussi mesuré une durée de vie de 12 μs , la population doit donc aussi rejoindre l'état $^1n_O\pi^*$. La composante ns observée avec l'apparition de fragments primaires quand on excite à une couleur indique qu'il existe un croisement accessible entre l'état $^1\pi\pi^*$ et l'état fondamental, la composante μs montre aussi un croisement entre l'état $^1n_O\pi^*$ et l'état fondamental.

Le processus de relaxation dans la région d'énergie plus haute que 300 nm semble différent. Les expériences pompe-sonde indiquent que la population initialement excitée atteint une région ou un état qui n'absorbe plus le 532 nm avec une durée vie différente et non compatible avec la durée de vie de l'état $^1n_O\pi^*$. De plus, la spectroscopie à une couleur dans la région 300-290 nm présente une bande large d'absorption que l'on caractérise facilement sur le fragment m/z 43 qui est peut être le signe de l'absorption d'un autre état électronique. Les calculs

théoriques nous indiquent que l'état $^1\pi\pi^*$ (L_b) est très proche en énergie. Ainsi dans cette région spectrale, la voie de relaxation vers l'état $^1n_O\pi^*$ se ferme au profit d'une autre voie qui semble impliquer l'état L_b permettant d'accéder à un point triple de la surface d'énergie potentielle entre un état $^1\pi\pi^*$, un état triplet et le fondamental. En effet les calculs indiquent que seule une sonde à 355 nm peut sonder l'état triplet $^3\pi\pi^*$. De nouveaux calculs seront nécessaires pour localiser les croisements et couplages entre les différents états électroniques. Il faudra utiliser des méthodes multiconfigurationnelles pour déterminer les structures de la molécule aux points de croisement (singulet/triplet/So).

4.4 . Conclusion sur les bases de l'ADN protonées

Dans ce chapitre, nous avons pu mettre en évidence différents processus de relaxation permettant d'accéder à des états triplets à longues durées de vie. Dans le cas de l'uracile kéto nous avons pu mettre en évidence deux mécanismes permettant d'y accéder. Avec très peu d'excès d'énergie, la voie menant au triplet nécessite un passage par un état à transfert de charge, le changement de symétrie permet ensuite de faciliter le passage inter-système vers l'état triplet. Nous avons pu observer qu'en augmentant l'énergie d'excitation, on ouvrait une nouvelle voie de relaxation conduisant à l'intersection conique Eth-Col déjà mentionnée dans la littérature comme une voie de relaxation vers le fondamental. Nous avons pu montrer que dans la géométrie de l'intersection conique, une partie de la population pouvait se transférer vers l'état triplet au lieu de se désexciter vers le fondamental.

Les tautomères énol de l'uracile et de la thymine présentent des processus de relaxation relativement similaires. Dans les deux cas, une relaxation ultra-rapide depuis la région FC conduit vers l'intersection conique déjà observée Eth-Col. Dans la région de l'intersection conique, on retrouve encore une compétition entre la relaxation vers l'état fondamental par conversion interne ou le passage inter-système vers l'état triplet. Dans le cas de la thymine les différentes constantes de temps mesurées à l'échelle ps semblent suggérer que plusieurs intersections coniques pourraient être peuplées à partir de la région Franck-Condon.

Dans le cas de la guanine protonée, il apparait que l'excitation UV proche de la bande origine conduit à des régions de la surface d'énergie potentielle très difficiles à décrire. La présence de plusieurs états excités proches en énergie, potentiellement couplés à l'état localement excité offre plusieurs chemins de relaxation possibles. L'état $^1n_O\pi^*$ est impliqué dans la relaxation de la guanine protonée excitée à l'origine de la bande. Avec $400-500\text{ cm}^{-1}$ d'excès d'énergie, il existe une voie de relaxation vers l'état fondamental qui rentre en compétition avec le transfert vers l'état $^1n_O\pi^*$. Plus haut en énergie, la conversion interne vers le fondamental ainsi que le passage aux états triplets (inter system crossing) sont dominants. Bien

que notre dispositif expérimental ne nous permet pas d'étudier précisément les processus de relaxation radiatif, dans le cas de la guanine protonée nous avons pu mettre en évidence la présence d'un processus de relaxation radiatif en excitant la bande origine. A partir des résultats actuels on ne peut pas conclure si ce processus radiatif est toujours présent lorsque l'on augmente l'énergie de transition électronique.

5 - Spectroscopie et exploration conformationnelle sur les bases de l'ADN protonées monohydratées

Dans ce chapitre, je vais m'intéresser à l'étude des bases de l'ADN protonées mono-hydratées. Les bases de l'ADN présentent de nombreux sites permettant d'interagir avec une molécule d'eau par liaison hydrogène ou interaction électrostatique. Ceci complique fortement le paysage conformationnel de ces espèces. Dans cette partie, je vais donc présenter les résultats des expériences de photodissociation UV et IR obtenus sur les monohydrates de la cytosine et de la guanine protonée. Des recherches conformationnelles et des calculs ab initio ont été utilisés pour interpréter les résultats expérimentaux.

5.1 . Cytosine protonée et mono-hydratée

Les formes tautomères de la cytosine protonée piégées dans le piège de Paul ont déjà été déterminées par Broquier et al[81] et sont présentées dans la figure 5.1.

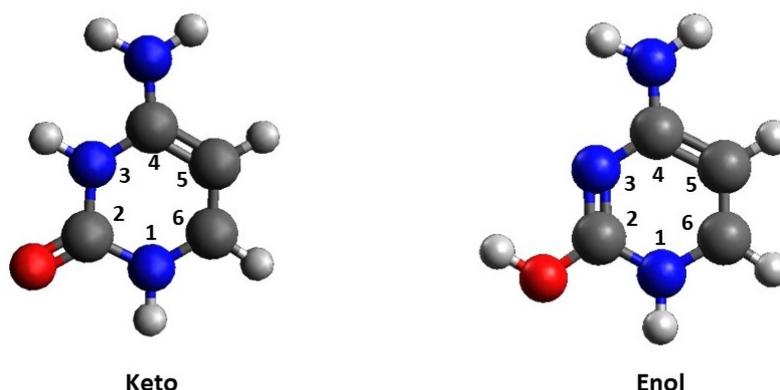


Figure 5.1 – Représentation des formes tautomères de la cytosine protonée présentes dans le pièges.

L'octopole refroidi à 80 K permet de former des complexes avec des molé-

cules d'eau avant de les piéger une nouvelle fois dans le piège de Paul refroidie à 10 K. Le spectre de masse de la figure 5.2 montre la distribution en taille des espèces hydratées avec l'octopole maintenu à une température de 80 K. On peut constater sur ce spectre de masse que l'ion majoritaire est la cytosine protonée et représente 45% du signal. On observe ensuite une distribution assez homogène pour les complexes $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_{1-5}$, chacun de ces complexes représente entre 8 à 15% des ions piégés au sein de la trappe. Les plus gros complexes observés sur le spectre de masse ne représentent que 3 à 1%, pour $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_6$ et $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_7$ de la population du piège. On a ainsi accès à une distribution en taille d'hydrates qu'il est possible de contrôler, d'une part en travaillant typiquement sur un domaine de température compris entre 80 et ~ 200 K et, d'autre part, sur la quantité de gaz tampon, l'hélium, qui contient également une portion de vapeur d'eau, pour piéger et former les hydrates dans l'octopole.

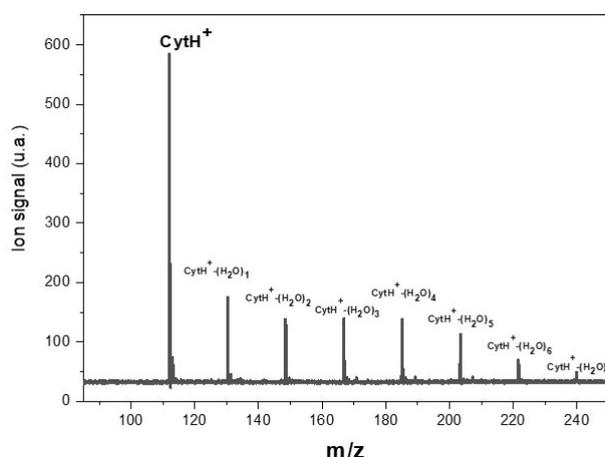


Figure 5.2 – Spectre de masse des complexes hydratés de la cytosine protonée formés à 80 K dans l'octopole refroidi et piégés dans le piège de Paul à 10 K. Le pic majoritaire correspond à la cytosine protonée suivi d'une distribution d'hydrates $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_n$ avec $n = 1$ à 7.

Nous nous sommes intéressés principalement au complexe monohydraté. Comme nous le verrons dans la suite de cette partie, l'absorption dans le domaine UV aussi bien que dans le domaine de l'IR entraîne la fragmentation du complexe avec comme unique fragment la perte de la molécule d'eau complexée pour donner

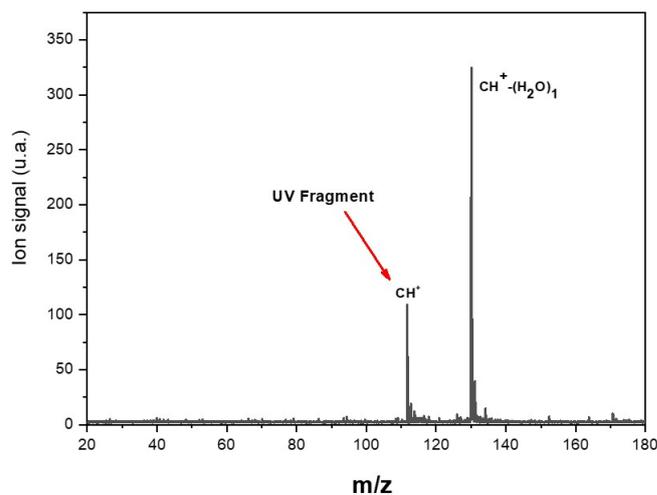


Figure 5.3 – Spectre de masse après photodissociation UV de $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ avec une longueur de 290 nm.

comme fragment CH^+ , comme le montre le spectre de masse figure 5.3. Avant les expériences de photodissociation, il s'agit d'abord de conserver uniquement l'espèce $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ dans le piège de Paul. Comme décrit précédemment dans la partie expérimentale du manuscrit, on utilise une séquence de radiofréquences, appelé *tickle*, pour éliminer toutes les autres espèces du piège. La séquence d'extraction utilisée consiste à extraire les complexes les plus gros par ordre décroissant avant d'éliminer le monomère CH^+ . La durée de la radiofréquence générée pour extraire un complexe ionique est d'une milliseconde. En général, le monomère nécessite un temps d'excitation plus long avec la radiofréquence car il est plus difficile à extraire, probablement à cause d'une fragmentation partielle des complexes hydratés éjectés du piège. Pour se débarrasser complètement du monomère, la durée de la radiofréquence générée est au minimum de 2 millisecondes. L'amplitude de la radiofréquence est aussi ajustée pour éliminer le monomère tout en gardant un maximum de signal sur le complexe monohydraté. L'ordre de grandeur de cette amplitude est 1,9 V.

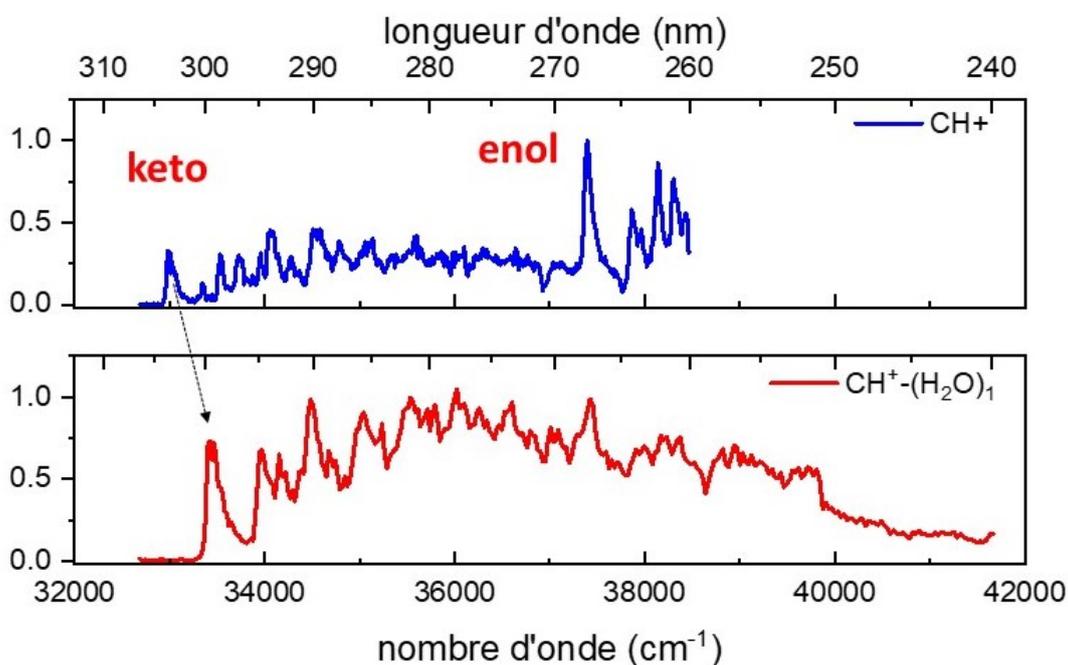


Figure 5.4 – Spectre de photodissociation de la cytosine protonée (trait bleu) enregistré sur les fragments de la cytosine et du complexe monohydraté (trait rouge) enregistré sur le fragment m/z 112.

Le spectre de photodissociation du complexe $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ est donc obtenu en traçant l'intensité du fragment CH^+ m/z 112 en fonction de la longueur d'onde du laser. Le spectre de photodissociation du complexe monohydraté, $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$, est comparé au spectre de la cytosine protonée dans la figure 5.4 entre 32000 cm^{-1} et 42000 cm^{-1} . Pour rappel, la cytosine protonée présente deux tautomères, kété et énol, piégés au sein du piège, et absorbant dans des régions spectrales différentes.

Le spectre de photodissociation du complexe hydraté présente une bande origine à 33444 cm^{-1} . La suite du spectre présente un fond continu d'absorption dès la bande origine jusqu'à la fin du spectre. Plusieurs bandes vibroniques sortent du fond d'absorption à 33967 , 34153 , 34482 et 35014 cm^{-1} . Après 35500 cm^{-1} , il n'est pas vraiment possible de discerner de bande excepté à 37425 cm^{-1} . En comparant le spectre du complexe monohydraté avec le spectre de la cytosine protonée, il apparait que, pour le complexe, l'origine de la transition du $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ se situe

dans une zone d'absorption du tautomère kéto avec un décalage de 450 cm^{-1} dans le bleu.

Le changement drastique avec l'ajout d'une molécule d'eau est l'absence de bandes intenses dans le bleu, c'est-à-dire dans la région des bandes très intenses attribuées au tautomère énoI autour de 37000 cm^{-1} . La bande à 37425 cm^{-1} pourrait être associée à la bande origine d'une forme énoI du complexe étant très proche de la bande origine du tautomère énoI à 37397 cm^{-1} . Cependant, après cette bande, le signal du fragment diminue fortement dans la suite du spectre contrairement au tautomère énoI de la cytosine dont le signal de photodissociation augmente après sa bande origine et continue d'absorber très intensément jusqu'à 43000 cm^{-1} comme l'a montré Berdakin en 2014[92].

Le spectre de photodissociation du complexe monohydraté peut paraître surprenant au premier abord car on ne s'attend pas à ce que le processus d'hydratation favorise un unique tautomère. Perderson et al ont montré que les molécules d'eau se lieraient plus facilement au tautomère kéto[68], mais les tautomères énoI devraient aussi être formés. En effet, Bakker et al[67] ont attribué une bande de leur spectre IR à un tautomère énoI où la molécule d'eau forme une liaison hydrogène avec l'un des groupes hydroxyles. Si on suppose que le complexe monohydraté issu de la forme énoI absorbe dans la même région que le tautomère énoI de la cytosine protonée, plusieurs possibilités pourraient expliquer l'absence de bande caractéristique de l'énoI dans la région supérieure à 37000 cm^{-1} .

Une première possibilité serait que toutes les formes hydratées, énoI ou kéto, absorbent dans la même région spectrale. Ceci impliquerait un décalage important dans le rouge de la transition origine du tautomère énoI, ce qui indiquerait un changement important de la structure électronique induit par l'hydratation. Une deuxième possibilité serait le processus inverse avec un déplacement très important de la transition électronique des tautomères énoI dans le bleu, en dessous de 240 nm . Une autre possibilité serait un mauvais facteur de recouvrement Franck-Condon qui conduirait à l'excitation d'un grand nombre d'états vibroniques de l'état excité, ce qui se traduirait par la présence d'une bande large qui serait responsable du fond continu d'absorption. L'excitation de plusieurs états vibroniques

est possible si l'état fondamental et l'état excité présentent des changements de géométries importants. Mais cela impliquerait que la molécule d'eau complexée ait un effet très important sur la géométrie de l'état excité comparé à l'état fondamental.

5.1.1 . Spectroscopie de photodissociation infrarouge

Afin d'attribuer le spectre de photodissociation UV obtenu pour le complexe monohydraté $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$, il est nécessaire de connaître le paysage conformationnel des espèces hydratées dans le piège de Paul. Pour ce faire, nous disposons d'un laser infrarouge qui permet de réaliser des expériences de photodissociation infrarouge (IRPD pour infrared photodissociation) et à deux couleurs IR-UV. L'attribution finale des conformères observés est réalisée par comparaison avec les spectres issus des calculs de chimie quantique. (théorie de la fonctionnelle de la densité, DFT).

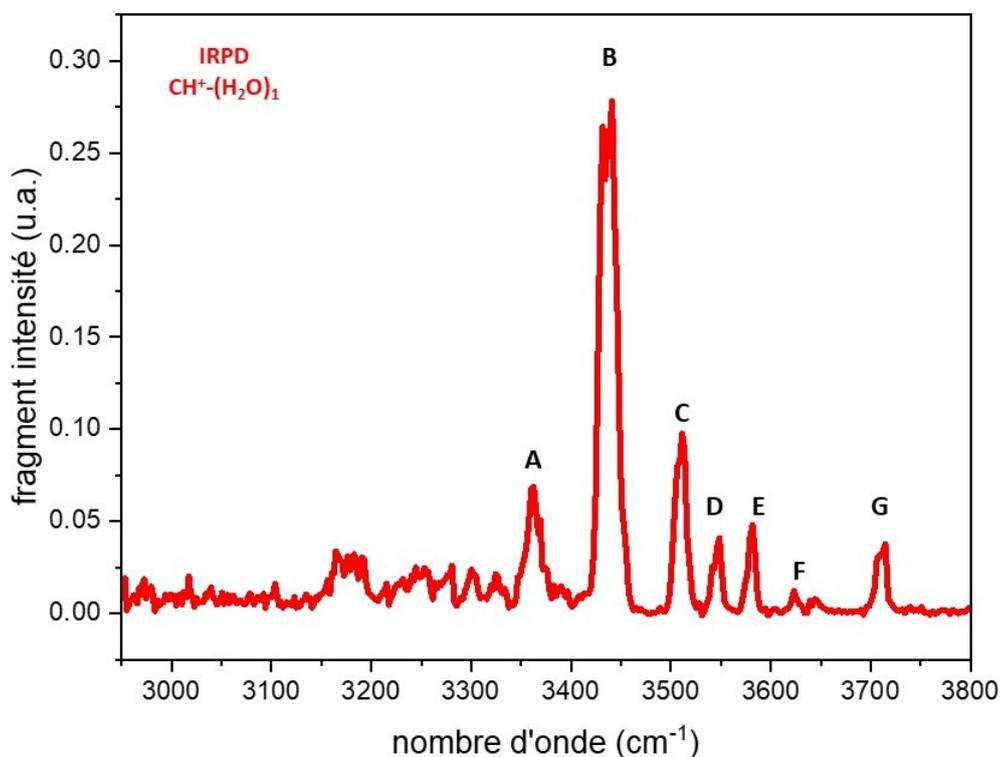


Figure 5.5 – Spectre de photodissociation IR de $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ dans la région 2950-3800 cm^{-1} , enregistré avec le laser LiNbO_3

La spectroscopie infrarouge est un bon outil qui permet d'obtenir des informations sur la structure et la conformation de molécules isolées. Dans le cas des espèces hydratées, la spectroscopie infrarouge dans le domaine du proche infrarouge devrait apporter des informations sur la position de la molécule d'eau qui doit perturber les modes de vibrations des liaisons N-H et O-H formant une liaison hydrogène avec la molécule d'eau.[67]

Le spectre IR du complexe $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ a été obtenu par deux techniques différentes (voir les figures 5.5 et 5.6). Il apparaît que la seule utilisation du laser IR est suffisante pour fragmenter le complexe et perdre la molécule d'eau. On a enregistré le spectre IR en mesurant l'apparition de ce fragment entre 2900 et 38000 cm^{-1} . Deux régions d'absorptions différentes sont identifiées. Entre 3150 et 3330 cm^{-1} (figure 5.5) on observe une bande large non résolue et d'intensité très faible. Au dessus de 3300 cm^{-1} , 7 bandes sont clairement observées jusqu'à 3800 cm^{-1} . Notons que ce spectre obtenu avec l'octopole à 180 K est similaire, à l'exception de la bande (A) à 3350 cm^{-1} , au spectre obtenu par Bakker et al.[67] à température ambiante (300 K), ces auteurs ont proposé au moins 3 structures différentes pour attribuer l'ensemble des bandes observées. Les structures proposées sont : (i) le tautomère énol de la cytosine avec une molécule d'eau liée par une liaison hydrogène au groupement -OH, forme la plus stable en énergie (ii) le tautomère kéto de la cytosine avec une molécule d'eau intercalée entre le groupement amine -NH₂ et le groupement -NH voisin, structure qui est quasiment dégénérée, à 0,6 kJ.mol^{-1} , avec la précédente et (iii) le tautomère kéto de la cytosine avec une molécule d'eau en interaction avec le groupement -NH du cycle qui est à l'opposé du groupement -NH₂, forme calculée à 6,5 kJ.mol^{-1} par rapport à la structure la plus stable. En conclusion, ce spectre IR n'est pas spécifique à un conformère et présente les bandes d'absorption de tous les conformères présents dans le piège de Paul.

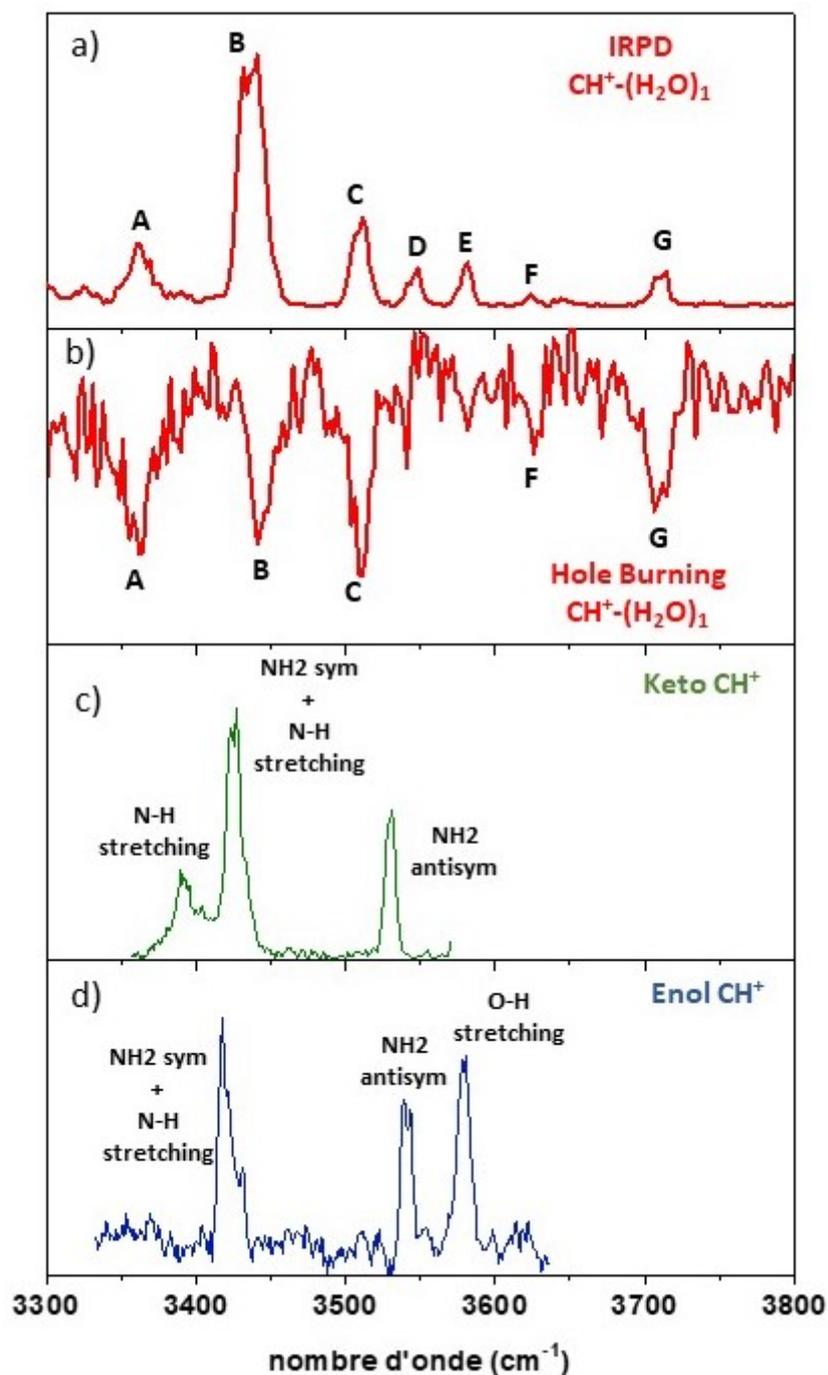


Figure 5.6 – a) Spectre de photodissociation infrarouge (IRPD) de $\text{CH}^+(\text{H}_2\text{O})_1$ avec le laser IR équipé d'un cristal de niobate de lithium (LiNbO_3), b) Spectre *hole-burning* IR-UV de $\text{CH}^+(\text{H}_2\text{O})_1$ avec un laser UV à 289 nm, c) spectre IR du tautomère kéto de la cytosine protonée obtenu avec la combinaison d'un photon IR et d'un photon UV non-résonnant à 305 nm, d) spectre IR du tautomère énol de la cytosine protonée obtenu avec la combinaison d'un photon IR et d'un photon UV non-résonnant à 269,5 nm.

Dans l'objectif d'être plus sélectif en conformère, on a enregistré le spectre IR avec la technique de *hole-burning*, dans la région 3300-3800 cm^{-1} avec le laser IR comme laser de *burn* et un laser de *sonde* à 289 nm, c'est-à-dire sur une bande vibronique du spectre du complexe, dans la région d'absorption du tautomère kéto de la cytosine. Le spectre obtenu est présenté sur la figure 5.6b). On peut aisément constater que ce spectre de *hole-burning* IR-UV ne présente pas un signal de dépopulation sur l'ensemble des bandes. Seules les bandes A,B,C,F et G présentent un signal de dépopulation, cela implique que les bandes D et E appartiennent à un/des conformères différents qui ne sont pas sondés par le laser UV à 289 nm.

L'ajout de la molécule d'eau pour former $CH^+ - (H_2O)_1$ va perturber les modes de vibrations des liaisons au voisinage ou en interaction avec celle-ci. A priori, les modes de vibration des liaisons qui ne sont pas directement en interaction avec la molécule d'eau ne vont pas être perturbés du monomère à l'hydrate. C'est pourquoi le spectre IR des deux tautomères de la cytosine protonée ont été enregistrés et sont présentés sur les figures 5.6 (c) et (d). Ces spectres sont obtenus avec un laser IR (accordable) qui est envoyé en premier suivi d'un laser UV non-résonant avec une transition vibronique et légèrement dans le rouge de la transition de la bande origine du tautomère, c'est-à-dire 305 nm pour le tautomère kéto et 269,5 nm pour la forme éno. Les deux lasers sont décalés temporellement de 1 μs . Le laser IR réalise une transition vibrationnelle à partir du niveau $\nu = 0$ de l'état fondamental du tautomère et le laser UV permet d'obtenir le signal de fragmentation. Notons que le laser UV seul ne permet pas d'obtenir un signal de fragmentation car il est non-résonant et dans le rouge de la bande origine du tautomère sondé (kéto ou éno). L'absorption du laser IR permet de préparer le tautomère dans un état vibrationnellement excité à l'état fondamental et par conséquent le laser UV peut être absorbé et donner lieu à l'apparition de fragments. On peut obtenir le spectre IR spécifique à un tautomère en particulier puisque les deux tautomères absorbent dans des régions bien distinctes du spectre UV. Les deux spectres IR présentent des bandes très proches en énergie, à 3425 cm^{-1} et 3530 cm^{-1} . Ces bandes correspondent aux modes d'élongation de $N_1 - H$ et de NH_2 symétrique

et anti-symétrique et $N_1 - H$, puisque ces liaisons sont conservées entre les deux formes tautomères. La bande large à 3390 cm^{-1} est spécifique au tautomère kéto et peut être aisément attribuée à l'élongation de la liaison $N_3 - H$. L'énol possède aussi une bande spécifique à 3580 cm^{-1} correspondant à l'élongation de la liaison $O - H$.

5.1.2 . Sonder la tautomérie des fragments de $CH^+ - (H_2O)_1$ formés par IRPD

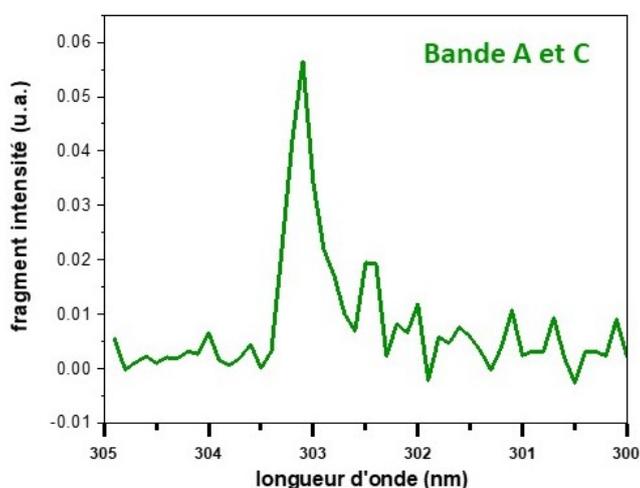


Figure 5.7 – Spectroscopie de CH^+ formé à 3489 cm^{-1} (Bande C) après dissociation de $CH^+ - (H_2O)_1$ enregistré sur le fragment m/z 69.

Comme vu précédemment le laser IR seul permet de fragmenter le complexe monohydraté. Cependant l'attribution des bandes est complexe, du fait que le spectre est composé de l'ensemble des tautomères piégés dans le piège de Paul. Sachant que les tautomères énol et kéto absorbent dans des domaines disjoints de l'UV, il est possible d'identifier la forme tautomère de la cytosine dans le complexe dissocié par le laser IR. Pour ce faire, le laser IR est envoyé dans le piège juste après l'injection du gaz tampon de manière à ce que les fragments créés par le laser IR puissent être aussi refroidis par le gaz avant d'être évacués du piège, avant d'interagir avec le laser UV pour créer de nouveaux fragments provenant de CH^+ . Le laser UV quant à lui est balayé soit autour de la bande origine du tau-

tomère kéto entre 300 et 305 nm, soit autour de la bande origine du tautomère énol entre 265 et 269 nm. Cette expérience répétée sur chacune des bandes du spectre IRPD de la figure 5.5 permet ainsi de caractériser la forme tautomère de la cytosine dans le complexe $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ par spectroscopie UVPD.

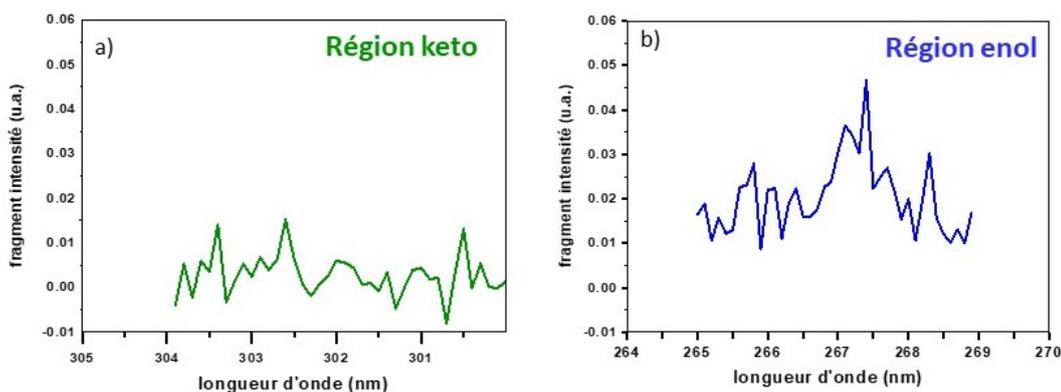


Figure 5.8 – Spectroscopie de CH^+ formé à 3524 cm^{-1} (Bande D) après dissociation de $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ enregistré sur le fragment m/z 69.

On a étudié la tautomérie des fragments créés en excitant les bandes infrarouge A, C, D et E puis en balayant la longueur d'onde dans la région de la bande origine des différents tautomères énol et kéto. La figure 5.7 présente le résultat observé sur la bande C. En formant la cytosine protonée avec le laser fixé sur la longueur d'onde de la bande C et en balayant le laser UV entre 300 et 305 nm, on observe une bande de photodissociation qui correspond à la bande origine du tautomère kéto. La région de la bande origine de l'énol n'a pas été sondée sur cette bande car le tautomère kéto présente encore un fond d'absorption dans cette région, ce qui provoque un faible rapport signal sur bruit. En formant le fragment à partir de la bande A, on observe aussi la bande origine du tautomère kéto ce qui implique que les bandes A et C sont des bandes spécifiques d'une forme tautomère kéto hydratée.

Le fragment formé à partir de la bande D (figure 5.8) présente un signal d'absorption dans la région de la bande origine de l'énol entre 265 et 269 nm (b), mais aucune absorption dans la région du tautomère kéto (a). Donc, la bande D est

spécifique d'une forme tautomère énol hydratée. La bande E présente elle aussi cette spécificité de produire un fragment qui n'absorbe que dans la région du tautomère énol.

5.1.3 . Preuve de la conservation de la tautomérie au cours de l'hydratation

Les expériences de la section précédente ont montré la présence des deux formes tautomères hydratées au sein de le piège, il faut donc ensuite déterminer quels sont les conformères formés à partir de ces tautomères, c'est-à-dire déterminer la position de la molécule d'eau en interaction avec le tautomère. Avec la spécificité de certaines bandes du spectre IR de l'espèce hydratée et des bandes IR caractéristiques observées dans le spectre expérimental des deux tautomères isolés, il est possible de définir une pré-attribution des bandes du spectre IRPD de $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$.

La bande B, la plus intense du spectre centrée autour de 3430 cm^{-1} et relativement large, est probablement composée des modes de vibrations de plusieurs conformères de tautoméries différentes. En effet, elle est très proche en énergie des modes d'élongation symétrique du groupement NH_2 et de $\text{N}_1 - \text{H}$ des tautomères kéto (3425 cm^{-1} et 3434 cm^{-1} , respectivement) et énol (3418 cm^{-1} et 3428 cm^{-1} , respectivement) isolés. Ainsi tous les conformères dont les modes ne sont pas perturbés par la molécule d'eau vont se retrouver dans cette bande.

La bande la plus simple à attribuer est la bande E, cette bande est spécifique du tautomère énol et si l'on compare au spectre IR du tautomère énol de la cytosine protonée isolée, elle correspond parfaitement au mode d'élongation de la liaison O-H à 3580 cm^{-1} . On peut donc conclure à la présence d'un tautomère hydraté possédant une liaison O-H libre.

La bande D est aussi spécifique d'une forme tautomère énol, cette bande peut être attribuée au mode d'élongation anti-symétrique du groupement NH_2 . C'est assez surprenant de ne pas observer de signal dans la région d'absorption de l'énol, puisque le mode d'élongation anti-symétrique est identique dans les deux formes tautomères isolées. Pour expliquer que cette bande n'appartient pas à un conformère kéto, on peut supposer que les potentiels conformères kéto formés

dans le piège présentent une molécule d'eau proche du groupement NH_2 . Ainsi ce mode normal devrait être décalé dans le rouge. Cela permet d'apporter aussi une autre information sur la structure, cette bande implique qu'une conformation hydratée du tautomère énol ne présente pas de molécule d'eau à proximité du groupement NH_2 .

La bande C est spécifique au tautomère kéto. Au vu de sa position dans le spectre, on peut aisément l'attribuer au mode d'élongation anti-symétrique du groupement NH_2 mais présentant un léger décalage (40 cm^{-1}), probablement le résultat de la présence d'une molécule d'eau proche du groupement NH_2 . Ce qui est en accord avec l'attribution de la bande D.

La bande A est plus incertaine à attribuer. En première approximation, on pourrait supposer qu'il s'agit du mode d'élongation du $\text{N}_3 - \text{H}$ du tautomère kéto, mais le décalage d'environ 35 cm^{-1} (par rapport au mode d'élongation $\text{N}_3 - \text{H}$ du tautomère kéto isolé), ne permet pas de l'assurer, sachant que ce mode pourrait aussi provenir d'un mode d'élongation symétrique du groupement NH_2 ou de $\text{N}_1 - \text{H}$ décalé par la présence d'une molécule d'eau près de ces groupements.

Les derniers modes à attribuer correspondent aux modes des élongations symétriques et asymétriques de la molécule d'eau à 3624 et 3709 cm^{-1} , respectivement.

5.1.4 . Recherche conformationnelle et optimisation de géométrie

Pour pouvoir attribuer les spectres de photodissociation IR et UV il est nécessaire de connaître tous les conformères possibles du complexe monohydraté qui peuvent être piégés au sein du piège de Paul. Dans un premier temps, je me suis appuyé sur les conformères calculés par Bakker et al. [67], qui avait déjà identifié, à l'aide d'expériences IRPD à température ambiante, deux conformères provenant du tautomère kéto et un conformère provenant du tautomère énol. Le nombre de conformations calculées a été un peu élargi par une recherche conformationnelle en utilisant le programme CREST. Les quatre conformères les plus stables de chaque tautomère, optimisés par XTB, ont été sélectionnés pour les calculs de chimie quantique.

	CONF-K01	CONF-K02	CONF-K03	CONF-K04
wB97XD	-	11,6	11,6	12,5
B3LYP	-	8,6	10,1	9,4
CC2	-	10,6	12,5	11,6

Table 5.1 – Structures optimisées des quatre conformères kéto de plus basse énergie du complexe monohydraté de la cytosine protonée $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ calculées aux niveaux wB97XD/6-311++G(3df,2p), B3LYP/6-311++G(3df,2p) et CC2/aug-cc-pVDZ. Les énergies relatives par rapport au conformère le plus stable (différence des énergies électroniques corrigées de l'énergie de point zéro) sont données en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Les formes CONF-K01 et CONF-K04 sont les formes calculées par Bakker avec une molécule d'eau impliquée dans deux liaisons hydrogène avec le $\text{N}_3 - \text{H}$ et le NH_2 de la cytosine protonée. Dans le CONF-K04, la molécule d'eau forme une liaison hydrogène avec le $\text{N}_1 - \text{H}$. Le conformère CONF-K02 est similaire au CONF-K04 avec la molécule d'eau aussi localisée le long de la liaison $\text{N}_3 - \text{H}$ mais cette fois elle se trouve dans le plan de la molécule. Dans le CONF-K03, la molécule d'eau se trouve le long d'une liaison $\text{N} - \text{H}$ du groupement amino.

L'optimisation de géométrie des conformères kéto a été réalisée en DFT avec deux fonctionnelles différentes, B3LYP et wB97XD, ainsi qu'avec la méthode CC2. CONF-K01 est la conformation la plus stable d'après les trois méthodes utilisées. CONF-K02, CONF-K03 et CONF-K04 sont très proches en énergie à $\sim 10 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ par rapport à CONF-K01. L'ordre en énergie des conformères varie peu en fonction de la méthode d'optimisation utilisée et reste dans un intervalle d'énergie relativement proche.

Les conformères de la forme énol obtenus par recherche conformationnelle

sont résumés dans le tableau 5.2. Le conformère CONF-E01 est le plus stable et correspond au conformère énol calculé par Bakker et al[67], avec la molécule d'eau localisée sur le groupement O-H. Le conformère CONF-E01 est calculé $3,52 \text{ kJ.mol}^{-1}$ au dessus du CONF-K01. Trois autres conformères formant une liaison hydrogène avec la molécule d'eau sont répertoriés dans ce tableau. Nous excluons les conformères où la molécule d'eau est localisée à proximité d'une liaison C-H ou en interaction verticale avec le cycle aromatique. Toutes ces structures sont calculées à plus de 20 kJ.mol^{-1} par rapport à la forme la plus stable. Nous conservons uniquement les conformères avec la molécule d'eau impliquée dans une liaison hydrogène comme c'est le cas pour les conformères du tautomère kéto. L'optimisation des structures à l'état fondamental des quatre conformères sélectionnés a été réalisée en DFT avec les fonctionnelles B3LYP et wB97XD avec la même base 6-311++G(3df,2p). Le conformère le plus stable est CONF-E01, suivi de CONF-E02 à $\sim 4 \text{ kJ.mol}^{-1}$ (en DFT) avec la molécule formant une liaison hydrogène avec la liaison N-H disponible. Dans CONF-E03 et CONF-E04, la molécule d'eau est localisée de part et d'autre du groupement amino -NH₂. Ces deux structures sont calculées à $\sim 13 \text{ kJ.mol}^{-1}$ et $\sim 18 \text{ kJ.mol}^{-1}$, respectivement, par rapport à CONF-E01. Notons que (i) les conformères hydratés du tautomère énol sont plus dispersés en énergie que les hydrates du tautomère kéto, (ii) les calculs DFT avec les fonctionnelles B3LYP et wB97XD donnent le même ordre avec les mêmes énergies relatives à $\sim 1 \text{ kJ.mol}^{-1}$ pour les quatre conformères et (iii) avec la méthode CC2, CONF-E01 et CONF-E02 sont quasiment dégénérés.

	CONF-E01	CONF-E02	CONF-E03	CONF-E04
wB97XD	-	3,62	11,8	18,1
B3LYP	-	4,62	13,0	18,1
CC2	-	0,75	8,37	14,5

Table 5.2 – Structures optimisées des quatre conformères émol de plus basse énergies du complexe monohydraté de la cytosine protonée $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ calculées aux niveaux wB97XD/6-311++G(3df,2p), B3LYP/6-311++G(3df,2p) et CC2/aug-cc-pVDZ. Les énergies relatives par rapport au conformère le plus stable (différence des énergies électroniques corrigées de l'énergie de point zéro) sont données en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Spectres IR théoriques

Les fréquences et les intensités des modes normaux de vibration à l'état fondamental après optimisation des structures des différents conformères ont été calculées en DFT (B3LYP/6-311++G(3df,2p)) ainsi que les deux formes tautomères de la cytosine protonée de manière à observer l'évolution des bandes en fonction de la position de la molécule d'eau. Le spectre IR simulé d'une conformation est obtenu après convolution du spectre bâton (intensité en fonction des fréquences de vibration) par une fonction gaussienne avec une largeur à mi-hauteur de 5 cm^{-1} (comparable à la résolution du laser IR utilisé). Chaque fréquence calculée est corrigée d'un facteur d'échelle de 0,964 [107]. Les spectres IR simulés sont présentés dans les figures 5.10 et 5.9

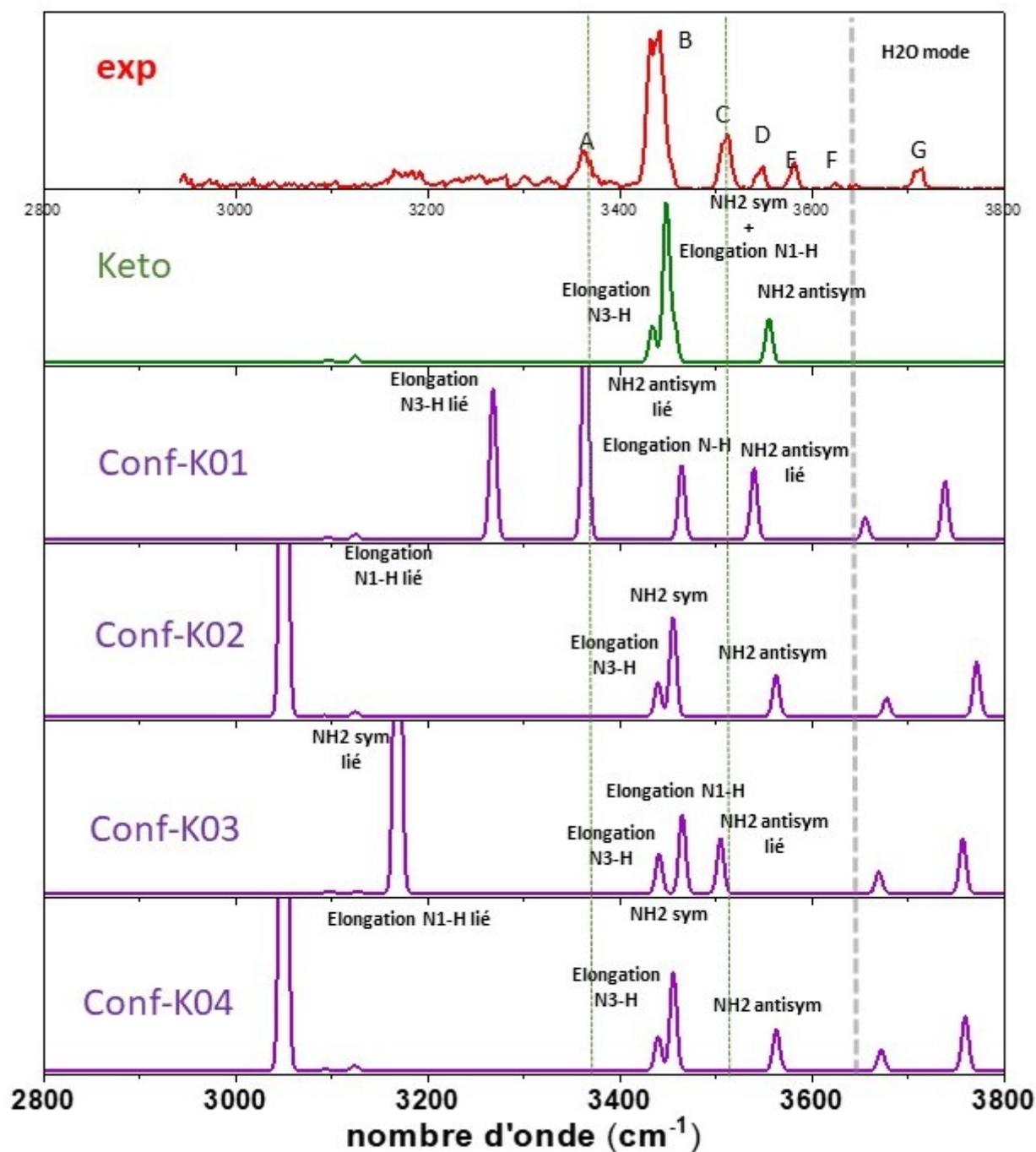


Figure 5.9 – Spectres IR simulés des formes kéto isolées et monohydratées, de la cytosine protonée. Les fréquences des modes normaux de vibration sont issues de calculs DFT (B3LYP/6-311++G(3df,2p)) avec un facteur d'échelle de 0,964.

La complexation avec la molécule d'eau fait apparaître des bandes supplémentaires dans le spectre IR de l'hydrate comparé à sa forme isolée. Pour tous les conformères, les modes de vibrations de la molécule d'eau sont localisés entre 3650 et 3800 cm^{-1} . Les bandes de la molécule d'eau n'ont aucune spécificité conformationnelle car la molécule d'eau possède le même rôle d'accepteur dans la liaison hydrogène formée dans tous les conformères.

On peut clairement observer l'effet très important sur la fréquence du mode de vibration d'élongation de la liaison covalente ayant un atome d'hydrogène impliqué dans la liaison hydrogène avec la molécule d'eau. Les fréquences de ces modes d'élongations, N-H lié et O-H lié, sont fortement décalées entre 2800 et 3350 cm^{-1} et sont calculées avec une très forte intensité. Notons qu'aucune de ces bandes n'est observée aussi intensément dans le spectre expérimental obtenu par IRPD. Néanmoins, des bandes large mais très faible en intensité (~ 10 fois plus faible que les modes d'élongations N-H libre ou O-H libre) sont observées expérimentalement dans la région 2800 et 3350 cm^{-1} . Ces bandes pourraient ainsi être attribuées aux modes normaux d'élongation des liaisons covalentes liées à la molécule d'eau. Ces modes seraient ainsi beaucoup moins bien calculés théoriquement.

L'attribution des bandes expérimentales à partir des modes d'élongation liés à la molécule d'eau est donc difficile à réaliser. Par contre, la spécificité tautomérique de certaines bandes observées expérimentalement va nous permettre d'identifier certains conformères.

L'attribution du conformère kéto (figure 5.9) semble assez difficile du fait de l'absence de liaison caractéristique de la forme kéto dans cette région. Néanmoins, on peut tenter d'apporter une réponse en regardant les décalages des bandes A et C de l'hydrate par rapport à la forme isolée.

Dans le cas de CONF-Ko1, deux atomes d'hydrogène forment une liaison hydrogène avec l'oxygène de la molécule d'eau, ce qui perturbe trois modes de vibration. Le mode de vibration de N_3-H est décalé dans le rouge à 3267 cm^{-1} . Si ce conformère est présent, ce mode correspondrait à une bande large et peu intense. Le mode d'élongation symétrique de $-NH_2$ se retrouve aussi décalé dans

le rouge et peut très bien correspondre à la bande A. Le mode d'élongation anti-symétrique de $-NH_2$ présente un décalage dans le rouge moins important mais qui peut correspondre à la bande C, le mode d'élongation de N_1-H n'est pas modifié et pourrait aussi être présent dans la bande B.

Les autres conformères ne présentent pas de bande avec un décalage important pouvant être attribué à la bande A. Il est peu probable que la bande C appartienne à CONF-Ko2 et CONF-Ko4. Nous pouvons émettre l'hypothèse que ces deux conformères ne sont pas présents dans le piège. La présence de CONF-Ko3 est aussi peu probable car aucune bande calculée ne simule la bande A.

Le ou les conformères de l'énol sont plus faciles à attribuer avec la présence caractéristique du mode d'élongation O-H libre que l'on a associé à la bande E du spectre expérimental. De ce fait, CONF-Eo1 n'est pas à l'origine de cette bande. Les trois autres conformères énol présentent ce mode de vibration. La bande D est elle-aussi caractéristique d'un tautomère énol mais correspondant à l'élongation anti-symétrique du groupement $-NH_2$ libre. Cela implique que la molécule d'eau n'est pas non plus au voisinage du groupement $-NH_2$ sinon cette bande serait décalée dans le rouge. Ceci exclut CONF-Eo3 et CONF-Eo4. On peut donc aisément supposer que le CONF-Eo2 est présent au sein du piège, les différents modes IR calculés peuvent être attribués de cette façon :

- Bande B : élongation symétrique $-NH_2$ libre
- Bande D : élongation anti-symétrique $-NH_2$ libre
- Bande E : élongation O-H libre

D'après les calculs, CONF-Eo2 n'est pas le conformère le plus stable et se trouve à $\sim 4 \text{ kJ.mol}^{-1}$ plus haut en énergie que la conformation la plus stable, CONF-Eo1. On peut donc émettre l'hypothèse que ce dernier est également présent dans le piège de Paul et contribue au spectre IRPD à travers les bandes B et D. Toutefois, d'après les calculs, le seul mode spécifique de ce conformère est au-delà du domaine de longueur d'onde accessible par le laser IR. Donc, il est difficile d'en apporter une preuve expérimentale. Cependant, les modes d'élongation symétrique $-NH_2$ et N_1-H peuvent participer au signal de la bande B. Aussi, le mode d'élongation anti-symétrique $-NH_2$ peut se retrouver dans celui de la bande D. Cela

apporterait une explication pour la différence d'intensité expérimentale entre la bande D et la bande E. En effet, la bande D est nettement plus intense que la bande E alors que les calculs donnent la bande d'élongation O-H libre comme étant plus intense. La présence de deux conformères avec un groupement où les modes d'élongation symétrique de $-NH_2$ sont libres de toute présence de molécule d'eau pourrait expliquer l'intensité de cette bande.

En conclusion, la comparaison des spectres IR simulés avec le spectre expérimental a permis d'identifier la présence de deux conformères : CONF-E02 et CONF-K01. Comme CONF-E02 n'est pas le conformère énol le plus stable, on suppose que CONF-E01 est aussi présent dans le piège et que ses bandes IR se superposent aux bandes du CONF-E02.

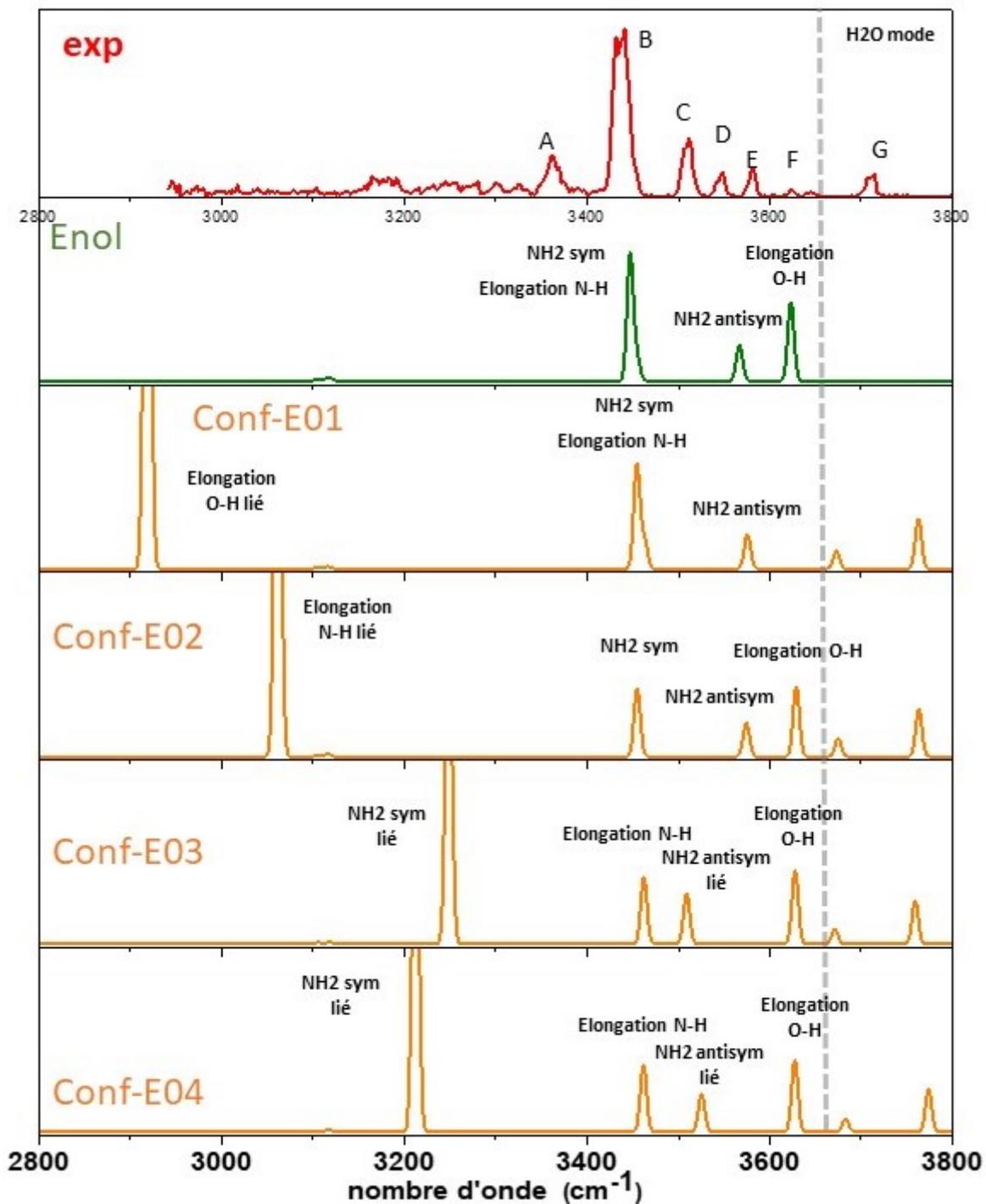


Figure 5.10 – Spectres IR simulés des formes énol isolées et monohydratées, de la cytosine protonée. Les fréquences des modes normaux de vibration sont issues de calculs DFT (B3LYP/6-311++G(3df,2p)) avec un facteur d'échelle de 0,964.

Calculs des états excités

La spectroscopie IR et les calculs ont permis de déterminer les structures des complexes $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ présents dans le piège de Paul. Nous avons ensuite effectué des calculs des états excités pour attribuer le spectre UV dans le but de comprendre l'influence de l'environnement sur les propriétés intrinsèques des espèces protonées isolées. Le tableau 5.3 dresse une comparaison des énergies de transition verticale calculées pour les quatre premiers états électroniques à partir de la structure optimisée de CONF-K01 et du tautomère kéto isolé selon quatre méthodes de calcul (CC2, SCS-CC2, wB97XD et CAM-B3LYP) avec la même base aug-cc-pVDZ. Les calculs verticaux montrent que la molécule d'eau du conformère CONF-K01 n'affecte que très légèrement les transitions électroniques. Le premier état électronique optiquement actif est toujours un état $^1\pi\pi^*$. La transition $\pi \rightarrow \pi^*$ est calculée en CC2 à 0,05 eV (400 cm^{-1}) plus haut en énergie dans le cas du complexe hydraté par rapport au monomère. Rappelons que nous avons observé expérimentalement un décalage de la transition origine du complexe dans le bleu de 450 cm^{-1} en comparaison avec le tautomère kéto isolé. L'énergie de la transition verticale en CC2 est au-dessus de la valeur expérimentale de la transition origine (33444 cm^{-1} , 4,15 eV) de $\sim 0,4$ eV. Les valeurs obtenues en DFT ont un écart encore plus important, à $\sim 0,7$ eV.

Au premier abord, il semble cohérent que l'état $\pi\pi^*$ soit faiblement impacté par la présence de la molécule d'eau qui forme des liaisons hydrogène dans le plan de la molécule. En effet, ces liaisons sont dans le plan nodal du système π de la molécule et donc l'effet de la molécule d'eau doit être négligeable sur la transition $\pi \rightarrow \pi^*$.

La transition $n_O \rightarrow \pi^*$ est encore moins perturbée par la molécule d'eau. En effet, cet état présente une forte densité électronique sur l'oxygène, mais comme la molécule d'eau est située entre le $\text{N}_3 - \text{H}$ et le groupement $-\text{NH}_2$, elle ne perturbe en aucun cas cet état.

Deux autres états $\pi\pi^*$ et $n_O\pi^*$ sont plus hauts en énergie, à $\sim 0,5$ eV du premier état excité. Ces états ne sont pas impliqués dans le processus de relaxation de

la cytosine protonée isolée. Etant donné que l'impact de la molécule d'eau est négligeable sur ces états, ces derniers ne devraient pas être impliqués d'avantage dans le processus de relaxation autour de la bande origine.

	CC2	SCS-CC2	wBP97XD	CAM-B3LYP
${}^1\pi\pi^*$	4,55	4,64	4,88	4,87
	<i>4,50</i>	<i>4,58</i>	<i>4,83</i>	<i>4,82</i>
${}^1n_O\pi^*$	5,28	5,95	5,97	6,00
	<i>5,27</i>	<i>5,93</i>	<i>5,94</i>	<i>5,97</i>
${}^1\pi\pi^*$	5,90	6,10	6,38	6,39
	<i>6,03</i>	<i>6,22</i>	<i>6,51</i>	<i>6,57</i>
${}^1n_O\pi^*$	6,14	6,30	6,31	6,30
	<i>6,17</i>	<i>6,32</i>	<i>6,33</i>	<i>6,31</i>

Table 5.3 – Energies de transition verticales calculées à partir de la structure optimisée du complexe $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ CONF-Ko1 et du tautomère kéto isolé (en italique) avec différentes méthodes (CC2, SCS-CC2, wB97XD et CAM-B3LYP) et la base aug-cc-pVDZ. Les énergies sont données en eV.

L'état S_1 a ensuite été optimisé dans le but de calculer l'énergie de la transition adiabatique et d'effectuer une simulation du spectre vibronique de CONF-Ko1. Les optimisations de géométrie ont été réalisées avec les méthodes CC2 et DFT. Les énergies adiabatiques entre l'état S_1 optimisé et l'état fondamental S_0 de CONF-Ko1 ainsi que les écarts avec la valeur expérimentale de la transition origine ($\Delta E_{\pi\pi^*/0_0^0}$) sont présentés dans le tableau 5.4.

	Expérience	CC2	wB97XD	CAM-B3LYP
${}^1\pi\pi^*$	4,08	4,00*	4,42	4,41
$\Delta E_{\pi\pi^*/0_0^0}$		-0,08	+0,34	+0,33

Table 5.4 – Energies adiabatiques de l'état ${}^1\pi\pi^*$ (en CC2, wB97XD et CAM-B3LYP avec comme base aug-cc-pVDZ) et l'écart en énergie par rapport à la valeur expérimentale de la transition origine ($\Delta E_{\pi\pi^*/0_0^0}$) en eV de CONF-Ko1. *Cette valeur est obtenue en estimant l'énergie de point zéro comme dans le cas du tautomère kéto isolé (voir texte).

L'optimisation de l'état ${}^1\pi\pi^*$ avec la méthode CC2 donne une transition S_0-S_1 très proche de la valeur expérimentale. Il est important de noter que le calcul CC2 a été effectué de la même façon que pour le tautomère isolé. Le calcul des fréquences après optimisation en contraignant le complexe à une géométrie en symétrie C_s aboutit de la même manière à une fréquence imaginaire. Pour estimer la transition adiabatique à partir de ces calculs où le complexe est contraint dans une géométrie plane, il est nécessaire d'évaluer l'énergie de point zéro comme décrit dans l'article de Broquier et al.[60] Les méthodes en DFT surestiment la valeur de la transition de +0,3 eV. Cette comparaison sur les méthodes montre que le calcul CC2 donne une valeur calculée qui est très proche de la valeur expérimentale, ce qui représente une erreur relative de l'ordre de 2% alors que l'erreur relative est de l'ordre de 8% pour les calculs DFT de l'énergie de la transition.

Les calculs des fréquences après optimisation de la structure du complexe en symétrie C_s en CC2 ne permettent pas d'effectuer une simulation Franck-Condon car on obtient une fréquence imaginaire. Le programme TURBOMOLE que nous utilisons pour les calculs CC2 permet également d'obtenir les coordonnées du complexe après déformation de la molécule en fonction d'un mode vibrationnel donné (outil *screw*). Comme dans le cas du tautomère kéto de la cytosine protonée, le calcul d'optimisation en symétrie C_1 du complexe, après distorsion de sa structure selon le mode de la fréquence imaginaire trouvée précédemment, ne converge pas. La géométrie se distord et croise l'état fondamental. Expérimentalement, on observe un spectre structuré présentant des bandes larges. Cet élargissement

	Expérience	CONF-K01	CONF-K02	CONF-K03
$^1\pi\pi^*$	4,08	4,46	4,39	4,47
$\Delta E_{\pi\pi^*/0_0^0}$		+0,38	+0,31	+0,39

Table 5.5 – Energies adiabatiques de la transition S_0 - S_1 calculée pour les conformères CONF-K01, CONF-K02 et CONF-K03 en DFT (wB97XD/aug-cc-pVDZ) et l'écart en énergie par rapport à la valeur expérimentale de la transition origine observée ($\Delta E_{\pi\pi^*/0_0^0}$) en eV.

est dû à une durée de vie de l'état excité inférieure à la ps, ce qui est en accord avec le problème de convergence. La bande origine est d'intensité comparable aux bandes vibroniques de l'ensemble du spectre. Ceci indique que les facteurs Franck-Condon entre l'état fondamental S_0 et l'état excité S_1 ne doivent pas être négligeables et que probablement l'état excité a une structure qui est proche de la structure obtenue en symétrie C_s , comme dans le cas du tautomère kéto de la cytosine protonée. C'est effectivement le cas avec les calculs DFT où le plan nodal du système π du cycle est conservé lors de l'optimisation de la structure à l'état excité S_1 . Même si l'écart entre l'énergie de la transition adiabatique calculée et la valeur expérimentale est plus importante en DFT, on peut tout de même effectuer une simulation Franck-Condon.

Le premier état excité, S_1 , de CONF-K01, CONF-K02 et CONF-K03 a été optimisé avec la fonctionnelle wB97XD. Les énergies des transitions adiabatiques sont résumées dans le tableau 5.5. D'après les conclusions des expériences IRPD et les calculs des états excités, seul le conformère CONF-K01 devrait contribuer au signal du spectre UVPD dans la région d'absorption du tautomère kéto isolé. Les calculs pour CONF-K02 et CONF-K03 ont été effectués pour comparaison avec le spectre expérimental.

Les simulations Franck-Condon des trois premiers conformères sont présentées dans la figure 5.11. Les spectres vibroniques sont convolués avec une fonction gaussienne de largeur à mi-hauteur de 10 cm^{-1} pour comparaison avec le spectre expérimental.

Globalement, on peut voir que le spectre calculé de CONF-Ko1 simule très bien toutes les bandes du spectre expérimental jusqu'à 3000 cm^{-1} d'excès d'énergie. Les premiers modes vibroniques excités sont des modes de mouvement hors plan mais aussi dans le plan, qui sont présentés dans la figure 5.12.

Mais la simulation présente deux modes supplémentaires à $\nu_7 = 227$ et $\nu_{11} = 371\text{ cm}^{-1}$ dans la simulation qui ne sont pas observés dans le spectre expérimental. Ces modes, présentés dans la figure 5.13, sont spécifiques à CONF-Ko2 avec un mode de pliage des liaisons N-H libres hors du plan et un mode de torsion de la molécule d'eau. D'après les calculs des transitions adiabatiques (voir tableau 5.5), la bande origine de CONF-Ko2 est proche de celle de CONF-Ko1. L'absence de ces deux modes dans le spectre expérimental peut être une indication supplémentaire que ce conformère n'est pas présent dans le piège.

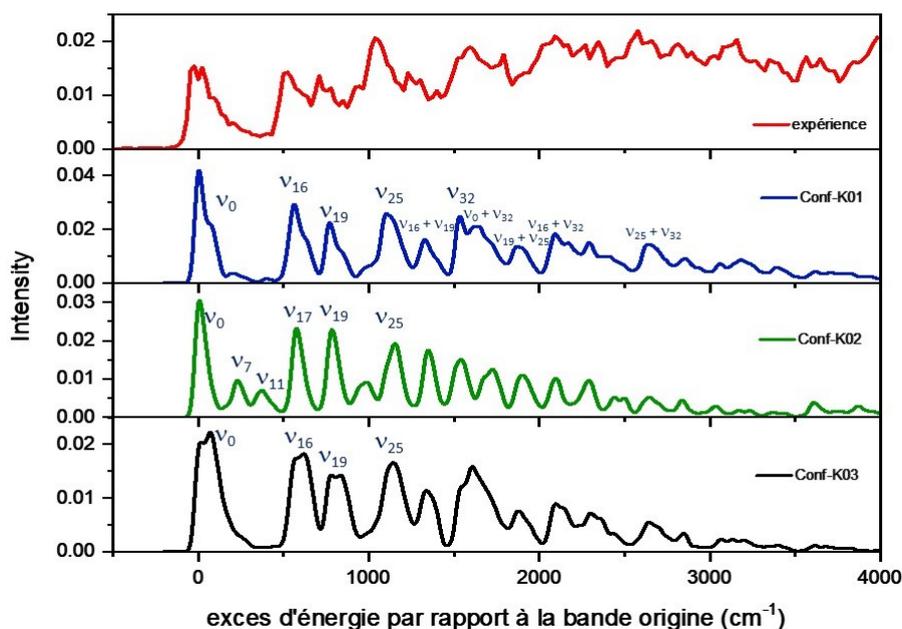


Figure 5.11 – Simulation Franck-Condon des trois premiers conformères du tautomère kéto cytosine calculés avec la méthode wB97XD/aug-cc-pVDZ. Le spectre expérimental est en rouge, celui de CONF-Ko1 en bleu, CONF-Ko2 en vert et CONF-Ko3 en noir. Les modes de vibrations ainsi que les combinaisons sont indiqués pour les bandes les plus intenses.

La simulation du spectre de CONF-Ko3 est similaire à celle de CONF-Ko1 puisque

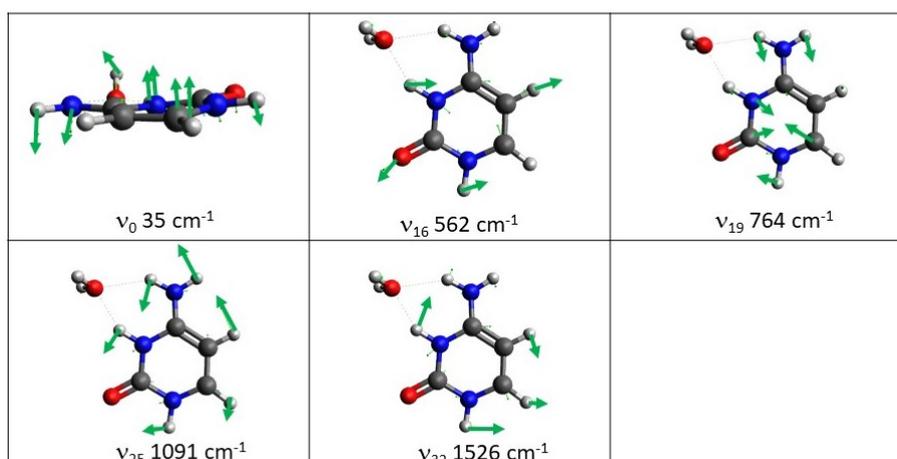


Figure 5.12 – Modes de vibration du premier état électronique de CONF-Ko1.

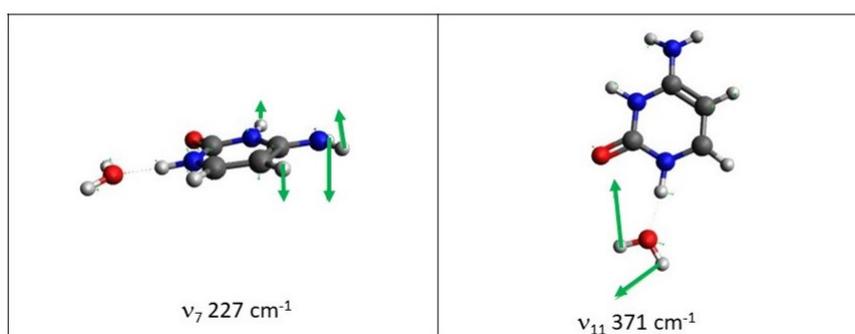


Figure 5.13 – Modes de vibration spécifiques au premier état électronique excité de CONF-Ko2.

ce sont les mêmes modes impliqués. Il apparait que peu importe la position de la molécule d'eau à proximité du groupement $-\text{NH}_2$ le spectre vibronique n'est pas impacté.

Les calculs sur les états excités des conformères énol ont aussi été réalisés aux niveaux wB97XD/aug-cc-pVDZ et CC2/aug-cc-pVDZ. Les formes hydratées de l'énol présentent le même problème que pour le tautomère énol isolé. En effet, l'optimisation du premier état excité converge vers une région de la surface d'énergie potentielle où l'état S_1 est dégénéré avec l'état S_0 . Nos méthodes de calcul ne permettent pas de calculer les énergies de transition adiabatique pour ces systèmes. Ceci peut indiquer que les processus de relaxation des formes isolées et hydra-

tées du tautomère énol sont similaires. On ne peut pas simuler le spectre UV des conformères monohydratés du tautomère énol. Néanmoins, nous avons effectué des calculs verticaux en SCS-CC2/aug-cc-pVDZ (voir table 5.6), afin d'estimer la région d'absorption des conformères énol par rapport à sa forme non hydratée.

	CH ⁺	CONF-E01	CONF-E02	CONF-E03	CONF-E04
$^1\pi\pi^*$	5,28	5,25	5,21	5,29	5,29
$^1\pi\pi^*$	5,79	5,77	5,80	5,75	5,76
$n_N\pi^*$	6,15	5,98	6,19	6,21	6,15

Table 5.6 – Calculs verticaux des trois premiers états excités du tautomère énol de la cytosine protonée (CH⁺) et des conformères énol monohydratés avec la méthode SCS-CC2/aug-cc-pVDZ. Les énergies sont données en eV.

Les calculs font apparaître une tendance sur la transition dans le domaine UV en fonction de la position de la molécule d'eau. En effet, si la molécule d'eau forme une liaison hydrogène avec la liaison O–H ou N₁–H, le calcul prévoit un léger décalage de la transition dans le rouge, de $\sim 0,03$ eV (~ 240 cm^{-1}) et $\sim 0,07$ eV (~ 560 cm^{-1}) pour CONF-E01 et CONF-E02, respectivement. Quand la molécule d'eau forme une liaison hydrogène avec le groupement –NH₂ comme dans les conformères CONF-E03 et CONF-E04, l'état $^1\pi\pi^*$ n'est quasiment pas perturbé. Notons ici que ces décalages sont dans la marge d'erreur du calcul. Néanmoins, ces calculs prédisent que la bande origine d'un complexe monohydraté du tautomère énol se situe dans le même domaine d'absorption que le tautomère énol isolé. Expérimentalement, la spectroscopie IR indique que CONF-E01 et CONF-E02 sont présents dans le piège. Mais nous n'observons pas de bandes intenses sur le spectre UVPD dans la région d'absorption du tautomère énol isolé comme nous pouvons le constater sur la figure 5.4. La seule bande qui est visible par rapport au fond continu est la bande à 37425 cm^{-1} (c'est-à-dire à seulement $+28$ cm^{-1} par rapport à la bande origine du tautomère énol isolé).

L'hypothèse la plus probable pour tenter d'expliquer l'absence de bandes caractéristiques des complexes monohydratés issus du tautomère énol est que les

facteurs de Franck-Condon entre l'état fondamental et le premier état excité dans ces complexes sont très faibles.

Conclusions sur les conformations de $\text{CH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$

L'ensemble des techniques de spectroscopie UV et IR a permis d'identifier au moins trois conformères de la cytosine protonée monohydratée, dont au moins un tautomère kéto et deux tautomères énol.

Le conformère CONF-Ko1 de la forme kéto est le conformère le plus stable calculé. Les simulations de son spectre IR et de son spectre vibronique correspondent bien aux résultats expérimentaux. On peut donc clairement affirmer sa formation dans l'octopôle refroidi. Les autres conformères de la forme kéto ne semblent pas être formés dans le piège. La spectroscopie IR du conformère CONF-Ko2 ne permet pas d'affirmer avec certitude son absence dans le piège mais la simulation Franck-Condon semble le montrer. Pour le CONF-Ko3 son absence est elle aussi difficile à affirmer expérimentalement mais comme il est isoénergétique du conformère CONF-Ko2 on peut aussi penser qu'il n'est pas formé dans le piège.

Dans le cas des conformères énol, la spectroscopie IR permet d'identifier la présence du conformère CONF-Eo2 et de fortement suspecter la présence du conformère CONF-Eo1 étant la forme monohydratée calculée la plus stable des conformères énol.

5.2 . Guanine protonée et mono-hydratée

Les complexes hydratés de la guanine protonée ont été produits dans les mêmes conditions que les complexes hydratés de cytosine protonée. Le schéma de fragmentation est aussi identique avec la perte de la molécule d'eau complexée comme fragment principal.

5.2.1 . Spectroscopie UVPD

Le spectre de photodissociation du complexe monohydraté de la guanine protonée $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ est obtenu en enregistrant l'intensité du fragment GH^+ , dans la région entre 32000 (312,5 nm) et 42000 cm^{-1} (238 nm) avec le laser OPO pico-

seconde (10 cm^{-1} de résolution en énergie). En comparaison avec le spectre de la guanine protonée, on remarque un important décalage dans le bleu ($+1850 \text{ cm}^{-1}$, $0,23 \text{ eV}$) du spectre de l'espèce monohydratée. Dans l'ensemble, le spectre est non-structuré. Seules deux bandes résolues sont observées dans le spectre de l'espèce monohydratée à 34734 et 34891 cm^{-1} , qui se superposent à un fond d'absorption qui croît en intensité jusqu'à 36000 cm^{-1} . Entre 36000 et 40000 cm^{-1} on peut observer deux bandes larges centrées autour de 36400 cm^{-1} (275 nm) et 39200 cm^{-1} (255 nm), puis le signal décroît en intensité sur le reste du spectre.

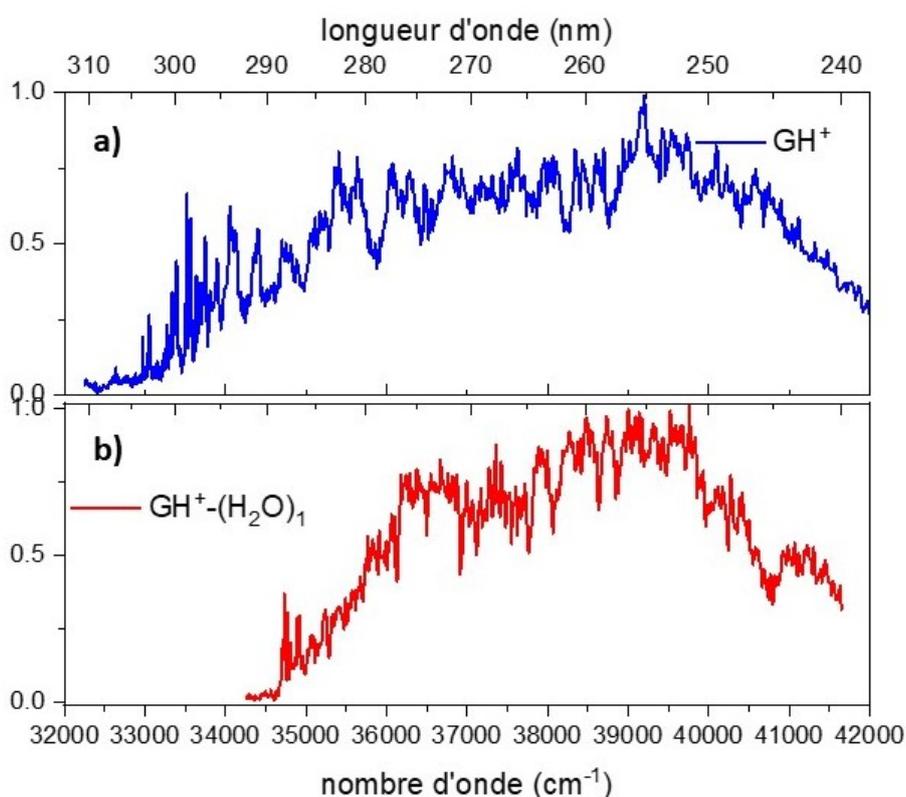


Figure 5.14 – Spectre de photodissociation de (a) la guanine protonée et (b) du complexe monohydraté $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$.

Nous avons ensuite enregistré le spectre autour de la transition origine avec un laser à colorant avec une résolution de 2 cm^{-1} . Le spectre obtenu est présenté dans la figure 5.15.

Dans la figure 5.15, on peut voir que la bande large observée précédemment peut être résolue avec un laser à colorant entre $286,5$ et $289,5 \text{ nm}$. La bande

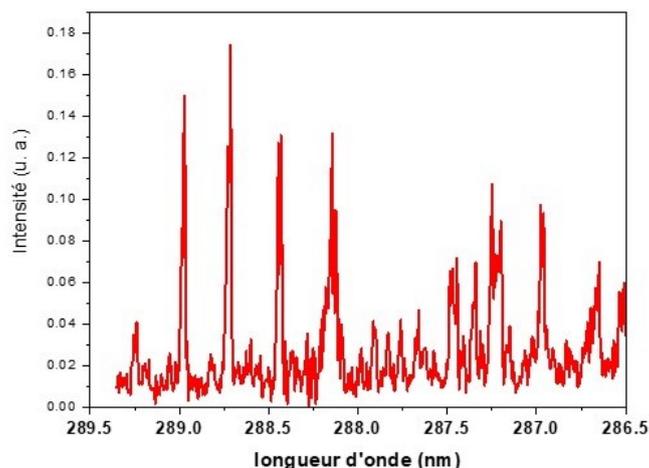


Figure 5.15 – Spectre de photodissociation de $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ dans la région de la bande origine, avec une résolution de 2 cm^{-1} .

origine est localisée à 289,24 nm et elle est relativement de faible intensité par rapport à la progression vibronique composée de trois bandes résolues à 288,97, 288,72 et 288,45 nm. Une bande beaucoup plus large ($\sim 11 \text{ cm}^{-1}$) est observée à 288,14 nm. Nous avons ensuite utilisé la technique *hole-burning* pour déterminer le nombre de conformations qui peuvent être à l'origine de ce spectre.

Un spectre *hole-burning* a été réalisé avec deux lasers à colorants, l'un des deux lasers (*laser burn*) a pour rôle d'exciter un conformère spécifique à une bande vibronique pour dépeupler son état fondamental. Nous avons choisi 288,71 nm comme longueur d'onde pour le *laser burn* car elle correspond à bande vibronique la plus intense observée expérimentalement. Le signal *hole-burning* représenté dans la figure 5.16 a été réalisé en couvrant un large domaine entre 287 à 289,5 nm. Le signal en noir correspond au signal des ions créés par le laser accordable à 10 Hz. Le signal rouge est obtenu en soustrayant le signal (*laser accordable* + *laser Burn*) au signal du laser accordable.

Chaque trou observé au niveau d'une bande vibronique est spécifique au conformère dépeuplé par le *laser burn*. De manière générale, toutes les bandes vibroniques présentent un trou dans cette région spectral. Ceci peut signifier que le spectre dans ce domaine spectral est le spectre d'un seul et unique conformère. Néanmoins, le rapport signal sur bruit du spectre *hole-burning* n'est pas optimal

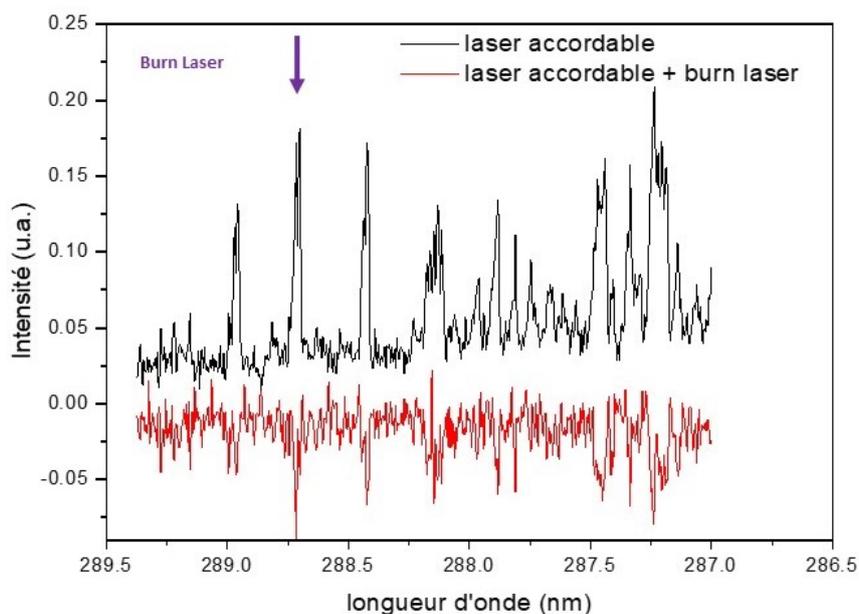


Figure 5.16 – Spectre *hole-burning* de $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ dans la région de la bande origine avec le laser *burn* à 288,70 nm. La courbe en noir est le signal du laser à 10 Hz et la courbe en rouge correspond au signal provenant de la combinaison des deux lasers.

et on peut éventuellement s'interroger sur le signal de dépopulation de certaines bandes, en particulier dans la région 288,25 - 287,5 nm.

Nous avons ensuite réalisé des expériences de *hole-burning* dans les mêmes conditions expérimentales sur des bandes spécifiques du spectre à plus haute résolution ($\text{pas} = 0.005 \text{ nm}$), en particulier la bande à 288,70 nm, la bande à 288,42 nm et la bande à 288,12 nm. Les spectres obtenus sont présentés dans la figure 5.17. On peut clairement voir une dépopulation importante sur les bandes vibroniques à 288,7 nm et 288,42 nm qu'on dépeuple à $\sim 30\text{-}40\%$. Sur ces deux bandes, le contour rotationnel est bien visible sur le signal de photodissociation tout comme sur le signal *hole-burning*. Par contre, le signal *hole-burning* est beaucoup plus faible sur la bande large à 288,12 nm. Il peut seulement s'agir d'un mauvais rapport signal sur bruit, ou cette bande pourrait être la superposition de bandes de plusieurs conformères dont certains ne seraient pas dépeuplés avec le laser *burn* à 288.7 nm.

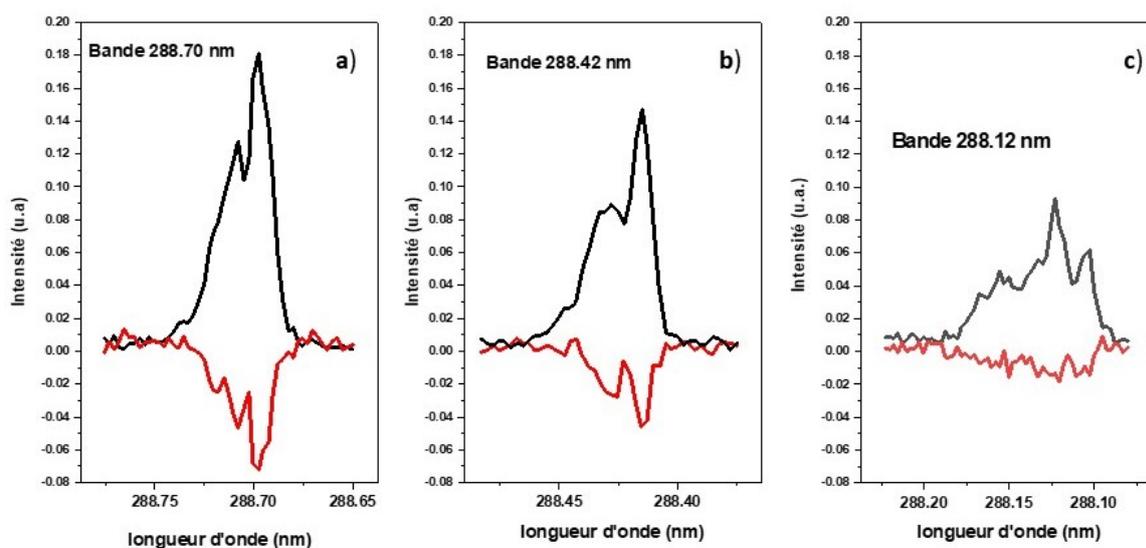


Figure 5.17 – Signal hole burning sur des bandes vibroniques spécifiques enregistré avec un pas de 0.005 nm : (a) bande à 288,70 nm, ce qui correspond également à la longueur d'onde du laser *burn*, (b) bande à 288,42 nm et (c) massif vibronique à 288,12 nm.

La figure 5.18 a pour but de bien mettre en évidence la différence de dépopulation sur la bande à 288,12 nm comparée aux bandes voisines. Entre 288,00 et 287,50 nm les transitions de faible intensités sont très bien observées dans le signal *hole-burning* contrairement à la figure 5.16 où la dépopulation était moins nette. En regardant la bande autour de 288,12 nm, on peut constater qu'elle est beaucoup plus fine sur le spectre *hole-burning* (en rouge dans la figure 5.18) et que l'ensemble de la bande large n'est pas dépeuplé.

Les expériences de hole burning montrent que la grande majorité des bandes vibroniques résolues du spectre expérimental de $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ dans la région de la bande origine appartiennent à un unique conformère. La bande à 288,12 nm de par sa largeur spectrale et des faibles signaux de dépopulation en expérience *hole-burning* laisse penser qu'elle pourrait appartenir à un autre conformère.

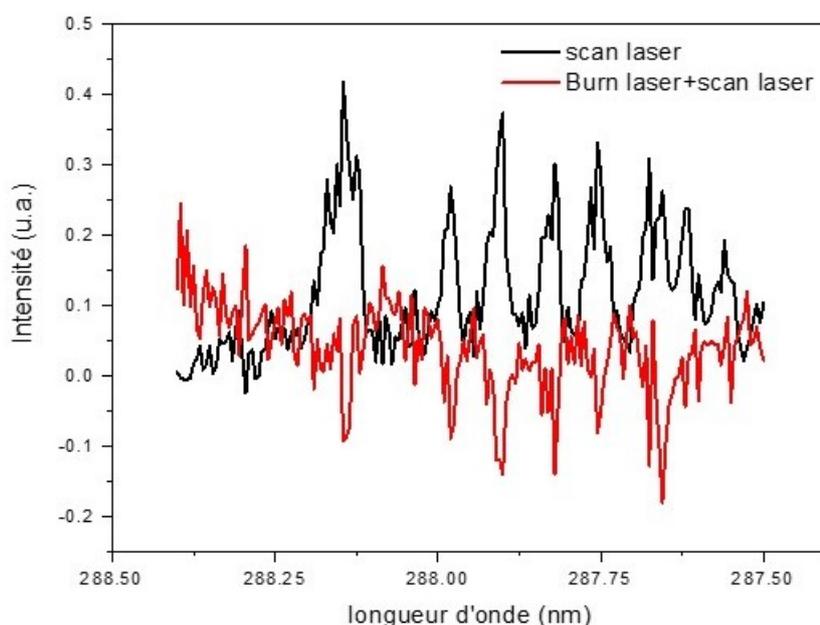


Figure 5.18 – Signal hole burning dans la région 288.25-287.5 nm

5.2.2 . Spectroscopie IRPD sur $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$

Afin d'obtenir une meilleure compréhension des espèces constituant le spectre de photodissociation UVPD, nous avons effectué des expériences IRPD à la fois sur la guanine protonée et sur sa forme complexée par une molécule d'eau. Le laser IR avec un cristal de LiNbO_3 a été utilisé pour enregistrer les spectres de la figure 5.19. Le spectre de GH^+ a été obtenu en utilisant une combinaison de deux lasers, c'est-à-dire un laser IR suivi d'un laser UV non-résonant (spectre en rouge), tandis que le spectre de l'espèce monohydratée $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ a été obtenu par IRPD (spectre en bleu).

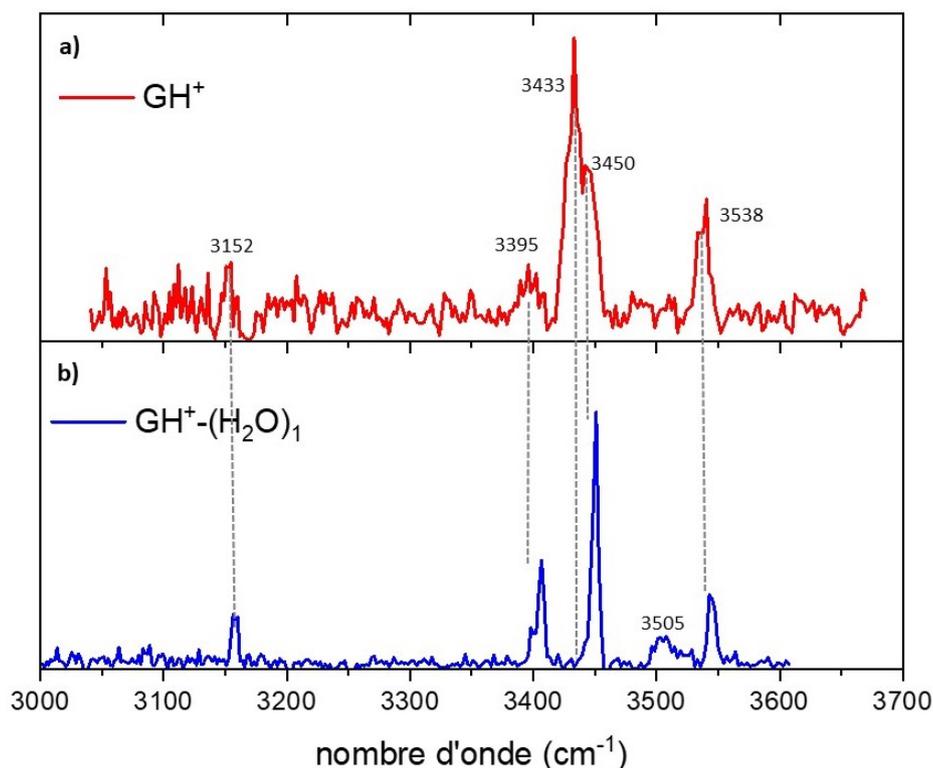


Figure 5.19 – Spectre IR de (a) la guanine protonée enregistré en utilisant une combinaison d'un laser IR avec un laser UV non-résonant à 308 nm, (b) le complexe monohydraté de la guanine protonée $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$.

Le spectre IR de la guanine protonée dans la région $3000 - 3650 \text{ cm}^{-1}$, présente quatre bandes d'absorption à 3152 , 3395 , 3433 et 3538 cm^{-1} . La guanine protonée possède trois liaisons N-H et un groupement $-\text{NH}_2$. On devrait donc s'attendre à cinq bandes IR : les élongations $\text{N}_1 - \text{H}$, $\text{N}_7 - \text{H}$ et $\text{N}_9 - \text{H}$ et les modes symétrique et antisymétriques du groupement $-\text{NH}_2$. Comme dans la cytosine protonée, on s'attend à retrouver les modes d'élongation N-H dans la région de 3400 cm^{-1} , ce qui pourrait correspondre à la bande large à 3433 cm^{-1} . La bande à 3538 cm^{-1} correspond à l'élongation anti-symétrique du groupement $-\text{NH}_2$. La bande à 3152 cm^{-1} est trop éloignée pour appartenir à des élongations N-H libre, le seul mode d'élongation restant est l'élongation C-H du C_8 .

Le spectre de $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ en bleu présente cinq bandes d'absorption dans cette région. Les bandes à 3152 , 3395 et 3538 cm^{-1} sont identiques au spectre de GH^+ . La bande à 3450 cm^{-1} est beaucoup plus fine que la bande à 3433 cm^{-1}

dans GH^+ ce qui implique que certaines liaisons associées à ces modes normaux de vibrations sont impliquées dans une liaison hydrogène et sont décalées dans le rouge dans le spectre du complexe monohydraté. Une nouvelle bande est observée à 3505 cm^{-1} , de plus faible intensité et relativement large. Deux possibilités peuvent expliquer la présence de cette bande dans le complexe monohydraté : (i) la molécule d'eau peut être localisée à proximité du groupement $-\text{NH}_2$ et perturbe le mode anti-symétrique, ou (ii) cette bande correspond au mode d'élongation symétrique de la molécule d'eau. Ce mode de vibration est plutôt attendu dans la région de 3600 cm^{-1} . Aucune bande n'est observée entre 3600 et 3650 cm^{-1} ce qui oriente plutôt vers l'hypothèse que la bande à 3505 cm^{-1} est une bande de la molécule d'eau complexée. Néanmoins, comme dans le cas des expériences avec la forme hydratée de la cytosine protonée, le laser IR équipé du cristal LiNbO_3 ne permet pas d'aller sonder le mode d'élongation antisymétrique de la molécule d'eau complexée.

Dans la suite de cette partie, nous allons nous appuyer sur des calculs pour attribuer le spectre IRPD de $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$.

5.2.3 . Recherche conformationnelle et optimisations de géométries

Une recherche conformationnelle a été réalisée avec la même méthode que pour les monohydrates de la cytosine protonée. Elle a permis d'identifier quatre conformères formant des liaisons hydrogènes entre la molécule d'eau et la guanine protonée. La nomenclature des conformères est donnée en fonction des atomes de la guanine impliquée dans les liaisons hydrogène. Les conformères obtenus ont ensuite été optimisés avec différentes méthodes. Les géométries et leurs énergies relatives sont données dans le tableau 5.7.

Le conformère le plus stable obtenu est le conformère $\text{N}_7 - \text{O}$ où la molécule d'eau forme deux liaisons hydrogènes : (i) une liaison hydrogène est formée entre l'atome d'oxygène de la guanine et un hydrogène de la molécule d'eau et on peut dire que la molécule d'eau joue le rôle de donneur de liaisons d'hydrogène et (ii) une liaison hydrogène est formée entre l'atome d'oxygène de la molécule d'eau et l'hydrogène de la liaison $\text{N}_7 - \text{H}$ et on peut dire que dans cette liaison la molécule

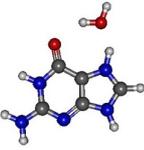
Conformère	N ₇ -O	N ₉	NH ₂ -N ₁	N ₁ -O
				
CC2 (<i>kJ.mol</i> ⁻¹)	-	+11,8	+13,8	+18,2
SCS-CC2 (<i>kJ.mol</i> ⁻¹)	-	+9,37	+11,0	+16,7
wB97XD (<i>kJ.mol</i> ⁻¹)	-	+13,0	+14,2	+18,8

Table 5.7 – Géométries et énergies relatives (en *kJ.mol*⁻¹) des différents conformères de $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ obtenues par recherche conformationnelle et optimisées avec des méthodes CC2/aug-cc-pVDZ et DFT/6-311++G(3df,2p).

d'eau joue cette fois le rôle d'accepteur de liaison hydrogène.

Le conformère N₉ est le second conformère le plus stable, situé à 9 - 13 *kJ.mol*⁻¹ plus haut en énergie que le conformère N₇-O en fonction de la méthode utilisée. La molécule d'eau forme une liaison à partir de son atome d'oxygène avec l'atome d'hydrogène lié à l'azote N₉. Dans ce conformère la molécule d'eau est perpendiculaire au plan de la guanine protonée.

Le conformère NH₂-N₁ est le troisième conformère le plus stable. L'atome d'oxygène de la molécule d'eau est lié à la fois à l'atome hydrogène lié à l'azote N₁ et à un hydrogène du groupement -NH₂. La molécule d'eau vient donc se situer perpendiculairement dans l'étau des deux hydrogènes. Ce conformère se situe à 11 - 13 *kJ.mol*⁻¹ plus haut en énergie que le conformère N₇-O en fonction de la méthode utilisée.

Le dernier conformère optimisé est le conformère N₁-O où la molécule d'eau forme deux liaisons hydrogènes : (i) une liaison hydrogène à partir de l'atome d'oxygène de la molécule d'eau avec l'atome d'hydrogène sur l'azote N₁ de la guanine et (ii) une liaison hydrogène à partir de l'atome d'oxygène de la guanine et un hydrogène de la molécule d'eau. Ce conformère est plus énergétique de 16 - 19 *kJ.mol*⁻¹ que le conformère N₇-O.

Il apparait que la protonation de la guanine modifie la localisation privilégiée

par la molécule d'eau. Dans la guanine neutre les calculs théoriques donnent le conformère $N_1 - O$ comme étant la forme la plus stable[108].

A partir des géométries obtenues on peut voir que la molécule d'eau peut se complexer avec la guanine protonée différemment du cas de la cytosine protonée, notamment en formant des liaisons hydrogènes avec les hydrogènes de la molécule d'eau. Les fréquences des modes de vibrations de la molécule d'eau des conformères $N_7 - O$ et $N_1 - O$ vont donc être différentes des mêmes modes dans les conformères N_9 et $NH_2 - N_1$. Ceci devrait avoir un impact sur le spectre infrarouge des complexes et donc constitue un moyen de les différencier, autrement que par les élongations $N - H$ liées par liaison hydrogène.

5.2.4 . Spectres IR théoriques

Les spectres théoriques de la guanine protonée et de ses conformères hydratés, calculés avec la méthode SCS-CC2/aug-cc-pVDZ, sont représentés dans la figure 5.20 dans la région des élongations $N - H$ et $O - H$. Les spectres sont convolués avec une fonction gaussienne de largeur à mi-hauteur de 10 cm^{-1} .

La figure 5.20 présente le spectre théorique de la guanine protonée. On peut voir comme sur le spectre expérimental quatre bandes, avec une bande large à 3450 cm^{-1} . On peut donc aisément attribuer les modes de vibration du spectre expérimental de la guanine protonée. La bande de faible intensité à 3152 cm^{-1} correspond à l'élongation $C - H$. La bande d'élongation du $N_1 - H$ est localisée à 3395 cm^{-1} . Le mode d'élongation $-NH_2$ antisymétrique est la bande à 3538 cm^{-1} . il apparait que ce mode n'est pas très bien calculé avec cette méthode avec un écart proche de 60 cm^{-1} par rapport à la bande expérimentale. La bande à 3433 cm^{-1} est composée de trois modes de vibrations, ce qui explique le fait qu'elle soit plus large que les autres bandes. Les trois modes de cette bande sont l'élongation $N_9 - H$ et $N_7 - H$ ainsi que l'élongation symétrique du groupement $-NH_2$.

Les spectres théoriques des conformères hydratés présentent, comme dans le cas de la cytosine protonée, des bandes intenses pour les modes de vibration des élongations N – H liées. Néanmoins, ces bandes ne sont pas observées dans le spectre obtenu par IRPD et donc on ne peut pas les utiliser pour discriminer les conformères présents dans le spectre expérimental. Un constat identique peut être fait pour le mode d'élongation antisymétrique de la molécule d'eau, comme dans les monohydrates de la cytosine, ce mode est en dehors de la région spectrale couverte par le cristal LiNbO_3 .

Toutefois, on peut s'intéresser au mode d'élongation symétrique de la molécule d'eau qui diffère en fonction du conformère suivant la localisation de la molécule d'eau et son implication dans les liaisons hydrogène.

Dans le cas du conformère $\text{N}_7 - \text{O}$, ce mode est calculé à 3547 cm^{-1} , c'est-à-dire bien plus rouge que l'élongation NH_2 antisymétrique à 3596 cm^{-1} . Ce mode est fortement décalé dans le rouge car le mode est affaibli par la liaison hydrogène avec l'oxygène de la guanine. Pour les conformères N_9 et $\text{NH}_2 - \text{N}_1$ le mode d'élongation symétrique de H_2O est calculé à 3620 cm^{-1} ce qui est plus bleu que le mode d'élongation NH_2 antisymétrique. Or, dans le spectre expérimental, aucune bande n'est observée après ce mode de vibration ce qui semble éliminer ces conformères.

Pour le conformère $\text{N}_1 - \text{O}$, le mode d'élongation symétrique de la molécule d'eau se mélange avec la bande du NH_2 antisymétrique. Ce mode est moins décalé vers le rouge que le conformère $\text{N}_7 - \text{O}$ car la liaison O – H de la molécule d'eau est moins dirigée vers l'atome d'oxygène dans le $\text{N}_1 - \text{O}$ que dans le $\text{N}_7 - \text{O}$. Expérimentalement, on a donc peu de moyen de voir si ce conformère est présent.

A partir de ces observations on peut aisément déduire que la nouvelle bande observée dans le spectre de la guanine hydratée est spécifique au conformère $\text{N}_7 - \text{O}$, d'autant que les autres modes de vibrations de ce conformère ne sont pas modifiés par rapport au monomère de la guanine protonée.

Par la suite, on peut se demander si on peut complètement éliminer les autres conformères sachant que les expériences de *hole-burning* laissent un doute sur la présence d'un autre conformère. Dans le cas du conformère N_9 aucun mode

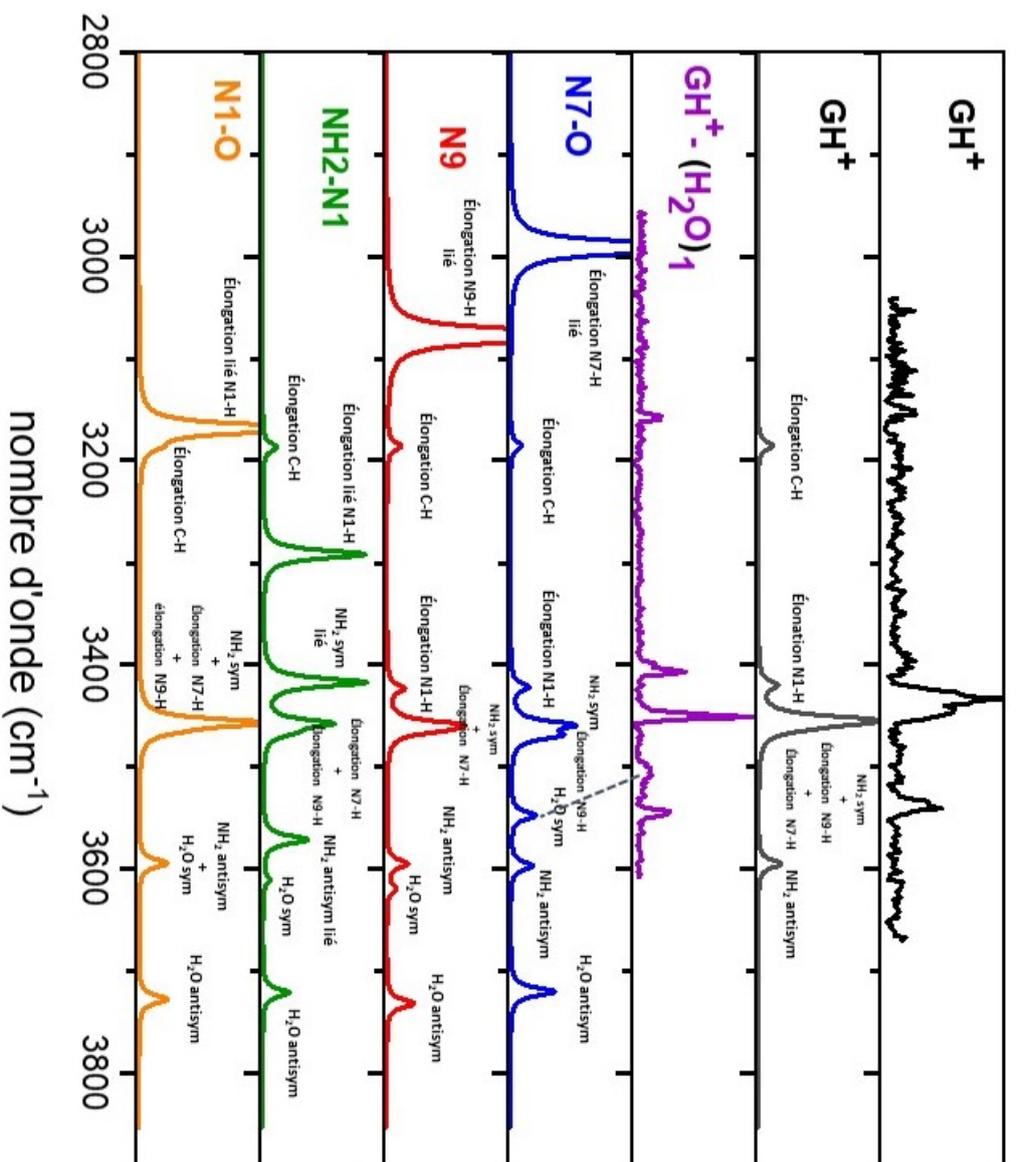


Figure 5.20 – Comparaisons des spectres IR expérimentaux et théoriques de la guanine protonée et des quatre conformères monohydratés, calculés en SCS-CC2/aug-cc-pVDZ, avec un facteur d'échelle de 0,9631[107]

de la guanine ne permet de discriminer l'hydrate par rapport à son monomère, les modes de vibrations ne sont pas affectés par la molécule d'eau à l'exception de la liaison N_9-H mais qui n'est pas observable avec la configuration du laser IR. La seule différence réside dans le mode d'élongation symétrique de la molécule d'eau à 3620 cm^{-1} qui ne semble pas présent dans le spectre. On peut donc supposer l'absence de ce conformère. Si l'on suppose l'absence du conformère N_9 , on doit aussi supposer l'absence de NH_2-N_1 pour les mêmes raisons. Enfin pour le conformère N_1-O , il n'y a aucun moyen à partir du spectre expérimental IRPD de pouvoir apporter une réponse car le seul mode discriminant est mélangé avec le mode antisymétrique du NH_2 . Néanmoins, comme les calculs prédisent ce conformère comme étant moins stable que les deux précédents, on peut aussi partir du principe qu'il n'est pas formé. Le spectre IR obtenu ne serait donc issu que du conformère le plus stable, c'est-à-dire N_7-O .

5.2.5 . Calculs des états excités

Pour compléter l'interprétation de la spectroscopie IRPD, nous avons réalisé des calculs sur les états excités des conformères monohydratés de la guanine protonée. Nous avons aussi cherché à simuler le spectre UV du conformère le plus stable N_7-O afin d'attribuer le spectre UVPD.

Des calculs verticaux ont été réalisés avec la méthode SCS-CC2/aug-cc-pVDZ sur les différents conformères et sont comparés au monomère de la guanine protonée dans le tableau 5.8. On peut observer qu'en fonction de la localisation de la molécule d'eau le premier état excité $^1\pi\pi^*$ n'évolue pas de la même façon. Les deux conformères les plus stables, N_7-O et N_9 , ont des énergies d'excitation verticale plus grandes que la guanine protonée, tandis que les conformères les moins stables, NH_2-N_1 et N_1-O , possèdent une énergie d'excitation verticale plus proche de celle de la guanine protonée, mais légèrement plus faible en énergie. Ce qui pourrait expliquer cette différence est l'influence de la molécule d'eau sur la densité électronique des deux cycles du chromophore, c'est-à-dire dans les conformères N_7-O et N_9 où la molécule d'eau semble plutôt interagir avec la partie imidazole de la guanine (cycle à 5 atomes), à l'inverse des conformères NH_2-N_1

et N₁ – O où la molécule d'eau interagit avec la partie pyrimidine (cycle à 6 atomes). La transition $^1\pi\pi^*$ est décrite notamment par une orbitale moléculaire antiliante localisée majoritairement sur le cycle imidazole (voire figure 5.21). L'ajout de molécules d'eau à proximité du cycle doit déstabiliser cette orbitale moléculaire ce qui augmente l'énergie de transition verticale. Expérimentalement, le spectre de l'espèce monohydratée est décalé dans le bleu. Les conformères N₇ – O et N₉ sont donc de bons candidats pour interpréter le spectre de photofragmentation UV.

	GH ⁺	N ₇ – O	N ₉	NH ₂ – N ₁	N ₁ – O
$^1\pi\pi^*$	4,68	4,83	4,76	4,58	4,60
$^1\pi\pi^*$	5,07	5,13	5,14	5,06	5,08
$^1n_O\pi^*$	5,27	5,48	5,30	5,22	5,30

Table 5.8 – Energies verticales des trois premiers états excités de la guanine protonée et de ses conformères hydratés calculées avec la méthode SCS-CC2/aug-cc-pVDZ.

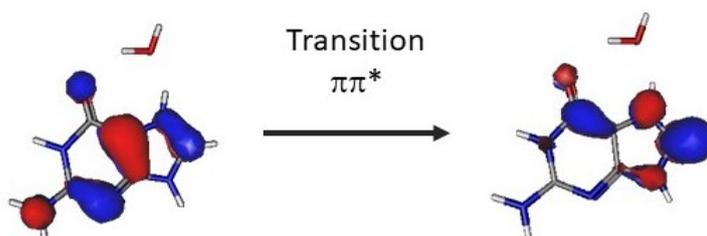


Figure 5.21 – Représentation des orbitales moléculaires du conformère N7-O impliquées dans la transition $\pi\pi^*$

Le second état excité est aussi un état $^1\pi\pi^*$ mais il semble moins affecté par la présence de la molécule d'eau. L'état S_2 des conformères N₇ – O et N₉ est encore une fois calculé plus haut en énergie tandis que l'état S_2 des conformères NH₂ – N₁ et N₁ – O n'est pas perturbé. Au vu de la proximité énergétique entre les états S_1 et S_2 pour tous les conformères, en moyenne à 0,4 eV au dessus, on peut supposer que la bande observée après 37750 cm^{-1} est le signal provenant du second état excité.

Enfin l'état $n_O\pi^*$ est toujours localisé plus haut en énergie que les états $^1\pi\pi^*$.

	CC2	SCS-CC2	wB97XD
Valeur expérimentale	4,28		
N ₇ – O	4,16	4,23	4,50
N ₉	3,96	4,09	4,36
NH ₂ – N ₁	3,75	3,88	4,21
N ₁ – O	3,77	-	4,23

Table 5.9 – Energies des transitions adiabatiques entre S_0 et S_1 des différents conformères de $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ calculées avec les méthodes CC2/aug-cc-pVDZ, SCS-CC2/aug-cc-pVDZ et wB97XD/aug-cc-pVDZ.

Le premier état excité S_1 de tous les conformères de $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ a été optimisé avec différentes méthodes pour déterminer le minimum d'énergie de l'état S_1 ainsi que la géométrie de cette état. A partir des valeurs du tableau 5.9, on peut voir que l'optimisation d'énergie du S_1 avec la méthode CC2 de tous les conformères prédit une énergie de transition S_0 - S_1 bien plus faible que la valeur expérimentale. Seul le conformère N₇ – O ne semble pas trop éloigné de cette valeur à -0,12 eV (-968 cm^{-1}).

Les optimisations réalisées en DFT donnent les trois conformères (N₉, NH₂ – N₁ et N₁ – O) relativement proches en énergie de la valeur expérimentale. La transition du conformère N₇ – O est calculée à +0,22 eV au dessus de la valeur expérimentale.

Avec la méthode SCS-CC2 les valeurs des transitions obtenues sont comprises entre les valeurs obtenues en CC2 et wB97XD. Le conformère N₇ – O possède toujours la transition la plus énergétique des quatre conformères mais en SCS-CC2 c'est la valeur la plus proche de la valeur expérimentale avec un écart de -0,05 eV (-403 cm^{-1}). Les transitions des autres conformères sont calculées avec un écart de -0,19 eV (-1532 cm^{-1}) pour N₉ et -0,40 eV (-3226 cm^{-1}) pour NH₂ – N₁.

La figure 5.22 présente les simulations Franck-Condon obtenues avec la méthode SCS-CC2/aug-cc-pVDZ et comparées au spectre expérimental dans la région

de la bande origine. Les simulations avec la méthode CC2/aug-cc-pVDZ ne sont pas présentées car les spectres simulés sont quasiment identiques à ceux basés sur la méthode SCS-CC2/aug-cc-pVDZ sauf pour le conformère N7-O où la géométrie du premier état excité est trop déformée par rapport au fondamental pour permettre l'excitation verticale. Les simulations réalisées à partir des calculs DFT ne sont pas non plus représentées car les spectres simulés ne correspondent pas du tout au spectre expérimental en présentant une bande origine très intense et aucune progression vibronique.

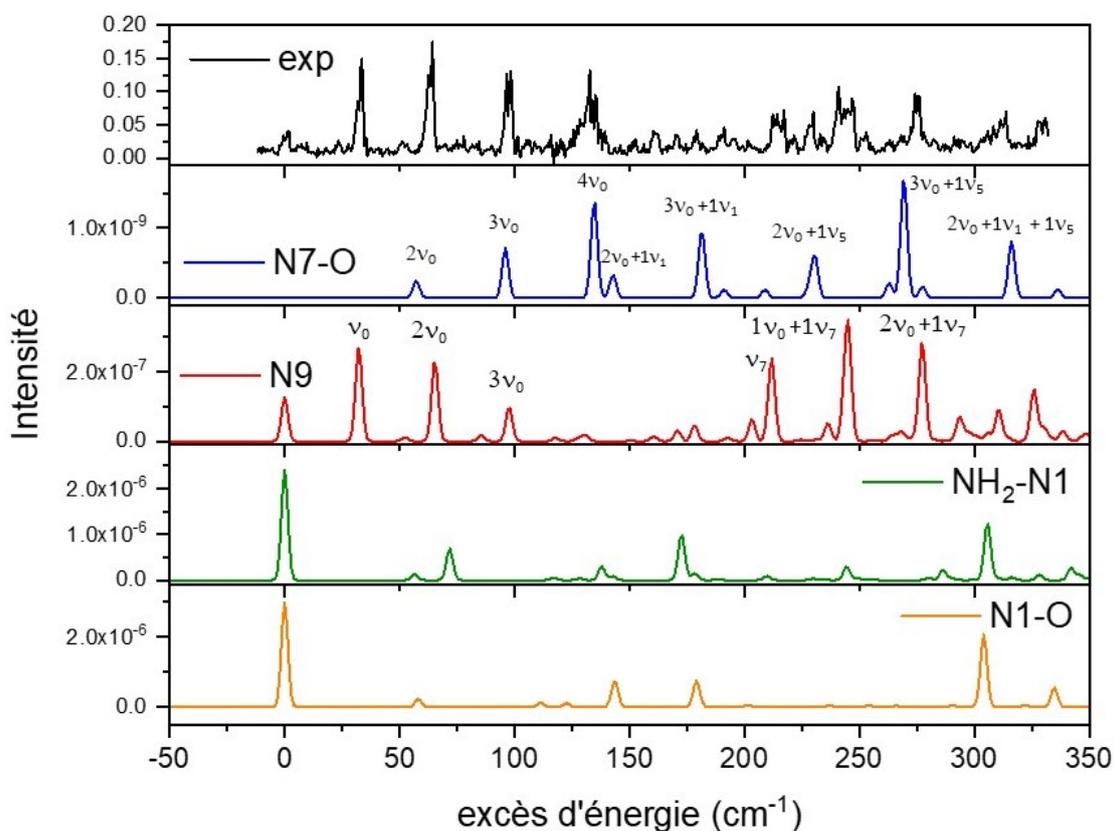


Figure 5.22 – Simulation Franck-Condon des conformères de $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ calculée en SCS-CC2/aug-cc-pVDZ à proximité de la bande origine comparée au spectre expérimental

Les spectres simulés sont placés de façon à essayer de correspondre au mieux au spectre expérimental. La transition 0_0^0 des spectres théoriques est fixé sur la première bande visible du spectre de photodissociation UV, sauf pour le confor-

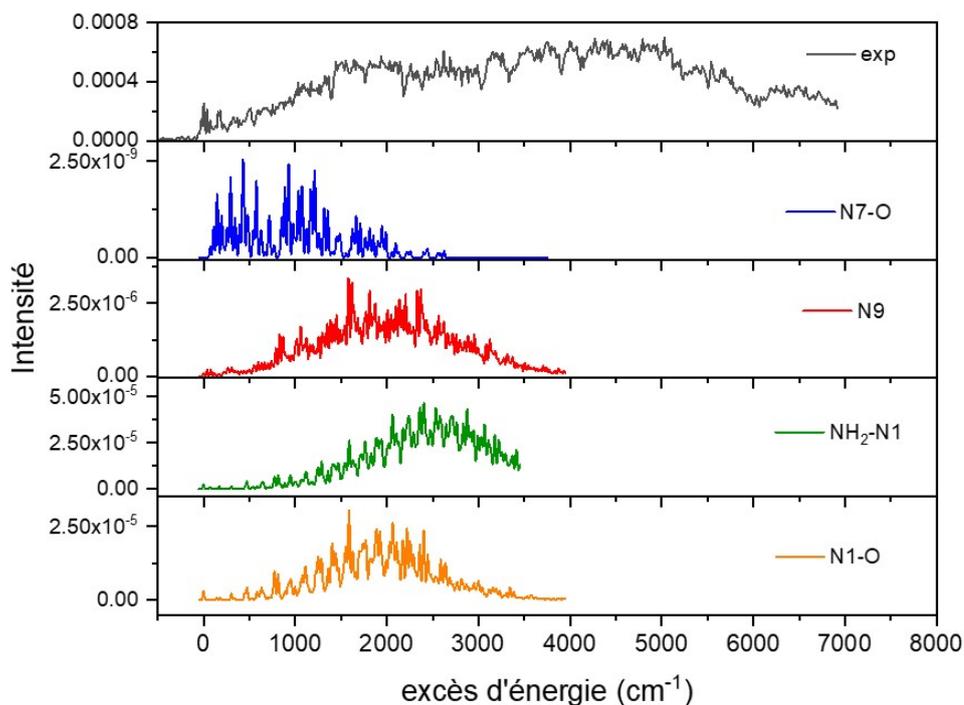
mère N₇-O dont je vais discuter ensuite. Parmi les quatre conformères calculés, celui dont le spectre simulé correspond au mieux au spectre expérimental est le conformère N₉. Ce conformère permet de bien simuler les quatre premières bandes observées, il simule plutôt bien les bandes de plus faibles intensités observées entre +150 et +200 cm^{-1} d'énergie, qui correspondent à une augmentation de quanta dans le mode ν_0 et les trois bandes intenses entre +200 et +300 cm^{-1} (voir figure 5.22) qui sont des bandes de combinaison des modes ν_0 et ν_7 . Néanmoins la bande large localisée à +130 cm^{-1} d'excès d'énergie n'est pas du tout simulée dans le conformère N₉.

Pour essayer d'attribuer cette bande, on fait l'hypothèse que c'est une bande du conformère N₇-O. La bande origine de ce conformère n'est pas simulée, le premier mode visible est l'ajout de deux quanta dans le mode ν_0 , ce mode a été placé sur la bande de faible intensité à +50 cm^{-1} de la bande origine du spectre expérimental. En procédant ainsi, on a bien deux modes de vibration du conformère N₇-O qui sont localisés à +135 et +143 cm^{-1} par rapport au spectre expérimental.

Le conformère NH₂-N₁ est simulé avec une bande origine très intense et ne présente quasiment pas de progression vibronique, de même que le conformère N₁-O. Ces deux conformères ne sont pas adaptés à la description du spectre de GH⁺-(H₂O)₁ dans la région de la bande origine.

On pourrait donc supposer que pour reproduire complètement le spectre expérimental il faudrait combiner les spectres calculés des conformères N₇-O et N₉. En effet ceci permettrait d'expliquer en partie les expériences de *hole-burning* sur la bande à 288,12 nm qui correspondrait donc aux modes $4\nu_0$ et $2\nu_0+1\nu_1$ donc au conformère N₇-O. Ceci expliquerait le fait que lorsque le laser *burn* est à 288,7 nm on dépeuple uniquement le conformère N₉ et on observe une déplétion sur l'ensemble des bandes du spectre excepté la bande à 288,12 nm. Soulignons tout de même que les intensités calculées pour le conformère N₇-O (1×10^{-9}) sont très faibles par comparaison avec celles du conformère N₉ (1×10^{-7}). Cette hypothèse présente néanmoins un point faible au niveau des énergies de transitions calculées, un écart d'environ 0,15 eV est estimé entre la transition électronique du conformère N₇-O et celle du conformère N₉, cet écart d'énergie n'est pas pris en

compte dans les spectres simulés.



13

Figure 5.23 – Simulation Franck-Condon des conformères de $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$ sur l'ensemble du spectre.

Les spectres théoriques des conformères ont aussi été calculés jusqu'à 4000 cm^{-1} après la bande origine (voir figure 5.23). La simulation du conformère $\text{N}_7 - \text{O}$ indique que l'on devrait pouvoir observer plusieurs bandes d'absorption entre 0 et 1500 cm^{-1} , mais celles-ci ne sont clairement pas observées sur le spectre expérimental. Ces bandes ne sont peut être pas observées à cause de la faible force d'oscillateur des transitions vibroniques de ce conformère. Le cas du conformère N_9 montre des bandes de faible intensité entre 0 et 500 cm^{-1} d'excès d'énergie. Dans le bleu, la progression vibronique est tellement importante que les bandes se superposent pour former une bande large entre $+500$ et $+3500 \text{ cm}^{-1}$ d'excès d'énergie.

La simulation du conformère $\text{NH}_2 - \text{N}_1$ présente plusieurs bandes vibroniques entre 0 et $+1000 \text{ cm}^{-1}$ d'excès d'énergie puis, comme dans le cas du conformère N_9 , la congestion spectrale des bandes vibroniques forme une bande large entre

+1000 et +3500 cm^{-1} d'excès d'énergie.

Les simulations Franck-Condon des différents conformères dans la région de la bande origine et sur l'ensemble du spectre permettent en partie d'identifier les conformères présents dans le spectre. Le conformère N₉ est celui qui s'accorde le mieux avec le spectre expérimental à la fois dans la région de la bande origine mais aussi dans celle de la première transition jusqu'à 38 000 cm^{-1} d'excès d'énergie. En effet, il permet à la fois de présenter une spectroscopie résolue au début du spectre mais il explique aussi pourquoi on observe un fond continu formant une bande large par une congestion spectrale de tous les modes vibroniques. Une bande n'est clairement pas reproduite dans la région de la bande origine qui suggère la présence d'un autre conformère. On peut supposer que cet autre conformère est le N₇-O car en plaçant sa bande origine à 34784 cm^{-1} la simulation permet de reproduire la bande à 34869 cm^{-1} .

Ces résultats sont en accord avec les résultats théoriques obtenus avec les calculs verticaux qui donnent des transitions verticales décalées dans le bleu par rapport à la bande origine de la guanine protonée, avec la bande origine du conformère N₇-O qui a un décalage dans le bleu plus important que la transition origine du conformère N₉. Les calculs des transitions adiabatiques prédisent aussi ce décalage dans le bleu du conformère N₇-O par rapport au N₉. A partir des simulations et des calculs verticaux, on peut aussi supposer que le signal observé entre 38000 cm^{-1} et 7000 cm^{-1} d'excès d'énergie est dû à l'absorption du second état excité ¹ $\pi\pi^*$. Malheureusement, les optimisations de géométrie de cet état ne convergent pas et ne permettent pas de simuler cette transition S_0 - S_2 .

5.2.6 . Conclusions sur les conformères de $\text{GH}^+ - (\text{H}_2\text{O})_1$

A partir des expériences UV et IR ainsi que des calculs théoriques, on peut arriver à la conclusion qu'au moins deux conformères de la guanine sont présents dans la piège de Paul. Les expériences de *hole-burning* ont montré que la majorité des bandes vibroniques enregistrées dans la région de la bande origine appartiennent à un unique conformère à l'exception d'une bande. Les simulations des différents conformères montrent que le conformère N₉ simule très bien le

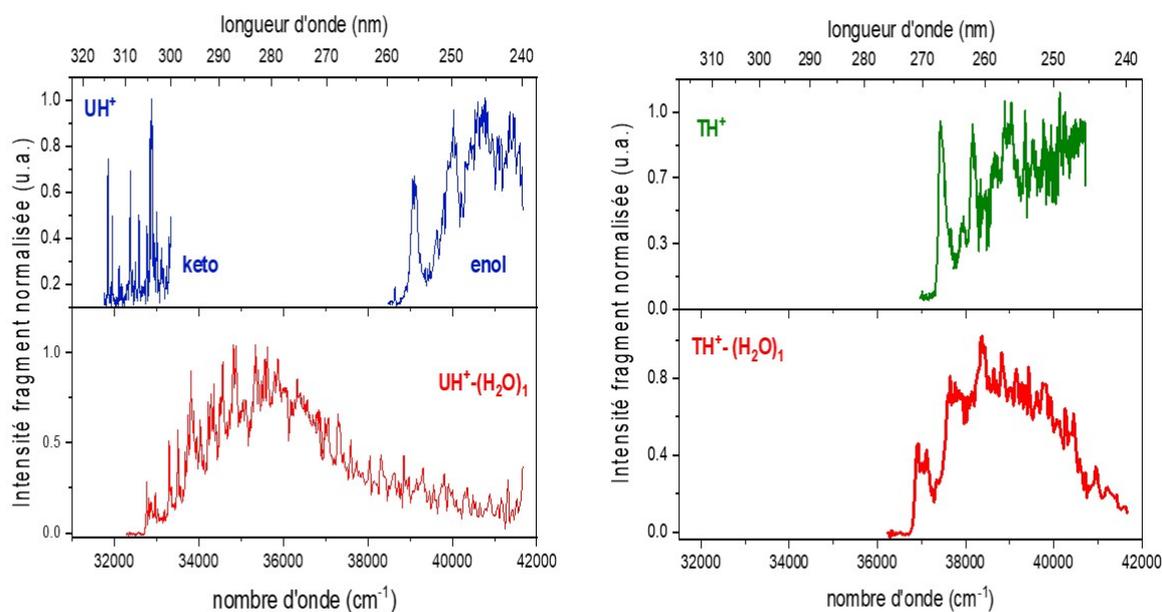
spectre expérimental dans la région de la bande origine, mais aussi la bande large observée par la congestion des nombreuses bandes vibroniques. La simulation du conformère N_7-O peut être ajustée de manière à compléter les bandes manquantes mais ce n'est pas un argument suffisant pour assurer sa présence. Au contraire la spectroscopie IR du complexe $GH^+-(H_2O)_1$ montre plutôt une preuve du conformère N_7-O avec l'apparition d'une bande attribuée au mode d'élongation symétrique de l'eau fortement perturbé par une liaison hydrogène. Soulignons qu'il n'y a pas de bande caractéristique du conformère N_9 , comme par exemple le mode d'élongation symétrique de l'eau qui n'est pas impliqué dans la liaison hydrogène après 3540 cm^{-1} . Comme les conformères N_7-O et N_9 sont les formes les plus stables calculées, on peut aisément supposer d'après les résultats expérimentaux qu'ils sont bien formés. Toutefois, le conformère N_9 est moins stable de $\sim 10\text{ kJ.mol}^{-1}$, c'est-à-dire à peu près du même niveau que les deux autres conformères NH_2-N_1 et N_1-O . Néanmoins, il n'y a aucune preuve expérimentale pour confirmer leur présence dans le piège

5.3 . Résultats en cours d'interprétations

5.3.1 . Spectroscopie

Au cours de ma thèse j'ai aussi pu étudier les monohydrates d'uracile et de thymine présentés en figure 5.24.

L'uracile hydraté (figure 5.24 (a)) absorbe dans la région $32\ 750\text{ cm}^{-1} - 42\ 000\text{ cm}^{-1}$. Le début du spectre présente une bande d'absorption large sur 400 cm^{-1} , cette bande est semblable à la bande origine observée sur $GH^+-(H_2O)_1$. Dans cette région, on doit avoir la présence d'une progression vibronique qui se traduit par une congestion spectrale avec la résolution du laser picoseconde utilisé ($0,1\text{ nm}$). Dans la suite du spectre, on observe une bande large d'absorption entre $33\ 000$ et $38\ 000\text{ cm}^{-1}$ à laquelle se superposent des bandes relativement fines (50 cm^{-1}), tout du moins dans le début du spectre. Ces bandes peuvent être la signature de conformères kéto de l'uracile . Un signal de fragment très faible est encore observé dans la région $38\ 000 - 42\ 000\text{ cm}^{-1}$. Il semble que la spec-



3

Figure 5.24 – Spectroscopie UVPD de $UH^+ - (H_2O)_1$ et $TH^+ - (H_2O)_1$ comparés à la spectroscopie du monomère enregistré sur le fragment ayant perdu une molécule d'eau

La spectroscopie de l'uracile hydraté soit assez similaire à la spectroscopie de la cytosine hydratée avec une zone d'absorption du complexe très proche de la zone d'absorption du conformère kéto.

La thymine hydratée présente un spectre dans la région $36\,791 - 42\,000\text{ cm}^{-1}$, on peut voir que le complexe de thymine est décalé dans le rouge en comparaison du spectre de la thymine énol. On remarque en plus que l'on perd une partie de la structure vibronique du spectre. La spectroscopie infrarouge sur ces bases de l'ADN est encore en cours d'obtention. Les calculs théoriques sont aussi en cours d'interprétation pour l'uracile. Dans le cas de la thymine on n'observe que la forme tautomère énol hydratée qui présente les mêmes problèmes de convergence de l'état S_1 , ce qui ne permet pas de simuler le spectre Franck-Condon.

5.3.2 . Pompe-sonde

On a aussi essayé de réaliser des expériences pompe-sonde sur les espèces hydratées. Un problème qui s'est rapidement présenté est l'absence de nouveaux

fragments, induits par l'absorption du laser de sonde. Cette absence de nouveaux fragments peut être due aux voies de fragmentations des états excités atteints par le laser de sonde qui conduiraient également à la perte d'eau ce qui n'entraînerait pas de modification dans le spectre de masse.

5.3.3 . Conclusion sur la spectroscopie des espèces hydratées

Dans ce chapitre nous avons pu montrer l'obtention des spectres de photodissociation UV de plusieurs bases de l'ADN protonées mono-hydratées formées dans un piège à ions linéaire refroidi à 80 K puis piégées dans un piège de Paul refroidi à 10 K. La spectroscopie des espèces hydratées ne présente pas de changement drastique par rapport aux spectres des monomères. Néanmoins, un doute subsiste sur le signal de photo-dissociation des conformères énol notamment dans la cytosine où le signal de photodissociation diminue dans la région d'absorption du tautomère énol isolé. La combinaison des spectroscopies UV et IR permet d'apporter des informations structurelles complémentaires très importantes pour caractériser les espèces ioniques de la piège. La spectroscopie infrarouge a notamment permis d'identifier un conformère énol de la cytosine hydratée. Lorsque la spectroscopie d'un hydrate est résolue, les expériences de dépopulations permettent d'identifier le nombre de conformères présents au sein du spectre. Ceci a notamment permis d'identifier le conformère N₇ – O de la guanine hydratée par comparaison avec les simulations théoriques. Les données spectroscopiques UV et IR prouvent que les conformères les plus stables sont bien formés et piégés dans le piège de Paul.

6 - Conclusion et Perspectives

Une première partie de la thèse a été consacrée à mesurer et à analyser l'évolution des processus de relaxation des bases de l'ADN protonées en contrôlant l'énergie d'excitation.

J'ai pu montrer que les techniques de piégeage des ions combinées aux mesures temporelles pompe-sonde permettent de suivre les processus de relaxation sur une échelle de la picoseconde à une centaine de millisecondes. J'ai pu alors obtenir une vision "quasi-complète" des mécanismes de relaxation conduisant à la photofragmentation des bases de l'ADN/ARN protonées. Les fragments observés après excitation UV sont identiques à ceux observés dans les expériences de dissociation induite par collision à l'état fondamental. Ils sont issus d'une dissociation à l'état électronique fondamental après conversion interne.

Quelle que soit la base de l'ADN/ARN étudiée, les processus de désactivation non- radiatifs de l'état localement excité $^1\pi\pi^*$ sont complexes et on observe des changements drastiques avec peu d'excès d'énergie interne.

Lorsque la molécule possède une fonction carbonyle, comme la guanine ou la forme kéto de l'uracile, la présence d'un état à transfert de charge de type $n_O\pi^*$ proche en énergie de l'état localement excité constitue une voie de désexcitation favorable. Elle peut mener soit directement à l'état fondamental par conversion interne, soit être la porte d'entrée vers un état triplet par croisement inter-système avant conversion interne. C'est le cas du tautomère kéto de l'uracile. En revanche, cet état à transfert de charge peut également ne pas conduire à la conversion interne, comme dans le cas de la guanine protonée, car on n'observe pas de photofragmentation. Toutefois, un excès d'énergie de quelques centaines de cm^{-1} suffit pour ouvrir une voie de désexcitation non radiative menant à la dissociation à l'état fondamental. Lorsque l'énergie interne déposée dans ces formes kéto augmente, la voie vers le transfert de charge se ferme au profit d'une voie qui conduit

à une région de la surface d'énergie potentielle où les états $^1\pi\pi^*$, $^3\pi\pi^*$ et l'état fondamental sont dégénérés.

L'état à transfert de charge de type $n_O\pi^*$ n'existe plus dans les formes tautomériques énol. Cela se traduit par l'absence de temps à l'échelle μs dans les signaux transitoires pompe-sonde. Les tautomères énol de l'uracile et de la thymine présentent des processus de relaxation relativement similaires. Dans les deux cas une relaxation ultra-rapide depuis la région FC conduit vers l'intersection conique équivalente à celle observée sur les espèces neutres. Dans la région de l'intersection conique, il existe une compétition entre la conversion interne et le passage inter-système vers l'état triplet. Nous avons pu estimer le temps que la population passe dans l'intersection conique à quelques centaines de nanosecondes.

Bien que la protonation permette de supprimer des états à transfert de charge par rapport aux formes neutres, les processus de désactivation de l'état localement excité restent complexes et de même nature que ceux observés dans les formes neutres. La topologie de la surface d'énergie potentielle est très difficile à appréhender par les seules approches théoriques. Cette thèse montre que, par une approche où on contrôle à la fois la voie d'entrée (énergie déposée dans le système) et les voies de sortie (les fragments) et où on peut suivre l'évolution des populations sur une large gamme temporelle, des informations pertinentes et nécessaires à la compréhension de ces mécanismes sont apportées.

Dans une seconde partie de cette thèse, les effets d'environnement ont été abordés par des études spectroscopiques des bases de l'ADN/ARN protonées mono-hydratées. La spectroscopie des espèces hydratées ne présente pas de changement drastique par rapport aux spectres des monomères. La combinaison des spectroscopies UV et IR permet d'apporter des informations structurelles complémentaires très importantes pour caractériser les espèces ioniques de la trappe. La spectroscopie infrarouge a notamment permis d'identifier un conformère énol de la cytosine hydratée. Lorsque la spectroscopie d'un hydrate est résolue, les expériences de dépopulation permettent d'identifier le nombre de conformères

présents au sein du spectre. Ceci a notamment permis d'identifier le conformère $N_7 - O$ de la guanine hydratée par comparaison avec les simulations théoriques.

Les données spectroscopiques UV et IR montrent que le paysage conformationnel des bases de l'ADN monohydratées est relativement restreint et se concentre sur les espèces les plus stables.

La spectroscopie de photodissociation pompe-sonde nécessite un changement dans les voies de fragmentation afin d'observer un signal à deux couleurs (2C). Le plus souvent, l'absorption de la sonde ouvre une ou plusieurs voies de fragmentation comme obtenu sur les bases protonées. Ceci représente un grand avantage car malgré la faible intensité du signal à 2C, la détection se fait sur fond noir, donc avec une grande sensibilité. Dans le cas des bases nucléiques mono hydratées, nous n'avons pas pu enregistrer les dynamiques des états excités car l'absorption de la sonde n'a pas changé les voies de dissociation. Seule l'évaporation de la molécule d'eau est observée. On peut supposer qu'en augmentant l'énergie de la sonde, l'excès d'énergie ouvre de nouvelles voies de fragmentation. De même, l'excitation directe vers un état électronique dissociatif pourrait ouvrir une voie de fragmentation spécifique autre que l'évaporation de l'eau. Mais il faut toutefois s'assurer que la longueur d'onde de sonde ne soit pas dans une bande d'absorption du complexe, ce qui exclut une sonde dans l'UV. Notre choix de sonde à 355 nm semble être le meilleur compromis. Un autre moyen de changer le rapport de branchement des voies de fragmentation serait d'étudier des complexes hydratés de grande taille. En effet, à longueur d'onde d'excitation donnée (photon pompe), la probabilité de dissociation va diminuer avec l'augmentation de la taille de l'agrégat. Grâce à la trappe octopôle refroidie, on peut espérer former des agrégats contenant plusieurs dizaines de molécules d'eau qui ne se dissocieraient pas après excitation UV. Par contre, l'absorption de la sonde apporterait l'excès d'énergie suffisant pour induire la dissociation, ce qui sera alors directement observable par spectrométrie de masse. Dans les gros agrégats d'eau contenant un base d'ADN protonée, on peut aussi s'attendre à un transfert de proton de

la base vers l'agrégat. En effet, la basicité de l'agrégat d'eau augmentant avec la taille, on obtiendrait alors un système base ADN neutre dans un agrégat ionique $\text{H}_3\text{O}^+ - (\text{H}_2\text{O})_n$. Les études sur les bases protonées que j'ai présentées ont montré que ces systèmes conservaient beaucoup de points communs avec les systèmes neutres. Néanmoins, dans l'optique de se rapprocher des conditions du vivant, il est évident qu'il serait plus pertinent de réaliser les études sur les bases neutres. Comme suggéré plus haut, des expériences sur gros agrégats solvatés pourraient offrir cette possibilité. On peut aussi suggérer de trouver des systèmes dans lesquels la base nucléique serait liée par un *linker* rigide à une fonction chimique de basicité supérieure au chromophore afin que le proton y soit localisé. Le point important ici serait de s'assurer que le groupement protoné n'interagisse pas avec le chromophore UV de la base grâce à un choix judicieux du *linker*. Un *linker* adapté serait composé d'une chaîne carbonée d'au moins trois ou quatre atome de carbone présentant des liaisons multiples. La présence de liaison multiple permettrait de rigidifier le *linker* et éviterait toute interaction du groupement chargé avec le chromophore.

Bibliographie

- [1] J. D. Watson et F. H. C. Crick. « Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid ». In : *Nature* 171 (1953), p. 737-738. doi : 10.1038/171737a0.
- [2] J Cadet. « Photochemistry and nucleic acids ». In : *Bioorganic photochemistry* 1 (1990), p. 1-272.
- [3] John Stephen Taylor. « Unraveling the molecular pathway from sunlight to skin cancer ». In : *Acc. Chem. Res.* 27 (1994), p. 76-82. doi : 10.1021/ar00039a003.
- [4] Thierry Douki. « The variety of UV-induced pyrimidine dimeric photoproducts in DNA as shown by chromatographic quantification methods ». In : *Photochem. Photobiol. Sci.* 12 (2013), p. 1286-1302. doi : 10.1039/c3pp25451h.
- [5] Daniel Perdiz et al. « Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells: possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis ». In : *J. Biol. Chem.* 275 (2000), p. 26732-26742. doi : 10.1016/S0021-9258(19)61437-7.
- [6] Luís FZ Batista et al. « How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis ». In : *Mutat. Res. - Rev. Mutat.* 681 (2009), p. 197-208. doi : 10.1016/j.mrrev.2008.09.001.
- [7] A Lamola et T Yamane. « Sensitized photodimerization of thymine in DNA. » In : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 58 (1967), p. 443. doi : 10.1073/pnas.58.2.443.
- [8] Virginie Lhiaubet-Vallet et al. « Triplet excited fluoroquinolones as mediators for thymine cyclobutane dimer formation in DNA ». In : *J. Phys. Chem. B* 111 (2007), p. 7409-7414. doi : 10.1021/jp070167f.
- [9] M Consuelo Cuquerella et al. « Photosensitised pyrimidine dimerisation in DNA ». In : *Chem. Sci.* 2 (2011), p. 1219-1232. doi : 10.1039/C1SC00088H.

- [10] Scott A. Sandford et al. « Photosynthesis and Photo-Stability of Nucleic Acids in Prebiotic Extraterrestrial Environments ». In : *Photoinduced Phenomena in Nucleic Acids II: DNA Fragments and Phenomenological Aspects*. Sous la dir. de Mario Barbatti, Antonio Carlos Borin et Susanne Ullrich. 2015, p. 123-164. doi : 10.1007/128_2013_499.
- [11] Ashley A. Beckstead et al. « Life in the light: nucleic acid photoproperties as a legacy of chemical evolution ». In : *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18 (2016), p. 24228-24238. doi : 10.1039/C6CP04230A.
- [12] Samuel Boldissar et Mattanjah S. de Vries. « How nature covers its bases ». In : *Phys. Chem. Chem. Phys.* 20 (2018), p. 9701-9716. doi : 10.1039/C8CP01236A.
- [13] Jan-Erik A. Otterstedt. « Photostability and molecular structure ». In : *J. Chem. Phys.* 58 (1973), p. 5716-5725. doi : 10.1063/1.1679196.
- [14] Andrzej L. Sobolewski et Wolfgang Domcke. « The chemical physics of the photostability of life ». In : *Europhys. News* 37 (2006), p. 20-23. doi : 10.1051/epn:2006405.
- [15] Wai-Ming Kwok, Chensheng Ma et David Lee Phillips. « A doorway state leads to photostability or triplet photodamage in thymine DNA ». In : *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008), p. 5131-5139. doi : 10.1021/ja077831q.
- [16] David N. Nikogosyan et al. « Direct measurement of excited singlet-state lifetime in the homologous sequence adenine, adenosine, adenosine 5'-monophosphate and in calf thymus dna ». In : *Chem. Phys. Lett.* 252 (1996), p. 322-326. doi : 10.1016/0009-2614(96)00165-0.
- [17] A. Reuther et al. « Femtosecond photo-ionization of nucleic acid bases: Electronic lifetimes and electron yields ». In : *Chem. Phys. Lett.* 325 (2000), p. 360-368. doi : 10.1016/S0009-2614(00)00699-0.
- [18] Jorge Peon et Ahmed H. Zewail. « DNA/RNA nucleotides and nucleosides: Direct measurement of excited-state lifetimes by femtosecond fluorescence up-conversion ». In : *Chem. Phys. Lett.* 348 (2001), p. 255-262. doi : 10.1016/S0009-2614(01)01128-9.

- [19] Brian B. Brady, Linda A. Peteanu et Donald H. Levy. « The electronic spectra of the pyrimidine bases uracil and thymine in a supersonic molecular beam ». In : *Chem. Phys. Lett.* 147 (1988), p. 538-543. doi : 10.1016/0009-2614(88)80264-1.
- [20] E. Nir et al. « Properties of isolated DNA bases, base pairs and nucleosides examined by laser spectroscopy ». In : *Eur. Phys. J. D* 20 (2002), p. 317-329. doi : 10.1140/epjd/e2002-00167-2.
- [21] Myong Yong Choi et Roger E. Miller. « Four Tautomers of Isolated Guanine from Infrared Laser Spectroscopy in Helium Nanodroplets ». In : *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006), p. 7320-7328. doi : 10.1021/ja0607411.
- [22] Michel Mons et al. « Near-UV Resonant Two-Photon Ionization Spectroscopy of Gas Phase Guanine : Evidence for the Observation of Three Rare Tautomers ». In : *J. Phys. Chem. A* 110 (2006), p. 10921-10924. doi : 10.1021/jp063738x.
- [23] Roberto Improta, Fabrizio Santoro et Lluís Blancafort. « Quantum mechanical studies on the photophysics and the photochemistry of nucleic acids and nucleobases ». In : *Chem. Rev.* 116 (2016), p. 3540-3593. doi : 10.1021/acs.chemrev.5b00444.
- [24] Spiridoula Matsika. « Radiationless decay of excited states of uracil through conical intersections ». In : *J. Phys. Chem. A* 108 (2004), p. 7584-7590. doi : 10.1021/jp048284n.
- [25] Ryoichi Fukuda et Masahiro Ehara. « Efficiency of perturbation-selection and its orbital dependence in the SAC-CI calculations for valence excitations of medium-size molecules ». In : *Journal of Computational Chemistry* 35 (2014), p. 2163-2176.
- [26] Mihajlo Etinski et Christel M Marian. « Ab initio investigation of the methylation and hydration effects on the electronic spectra of uracil and thymine ». In : *Physical chemistry chemical physics* 12 (2010), p. 4915-4923.

- [27] Shohei Yamazaki et Tetsuya Taketsugu. « Nonradiative deactivation mechanisms of uracil, thymine, and 5-fluorouracil: A comparative ab initio study ». In : *J. Phys. Chem. A* 116 (2012), p. 491-503. doi : 10.1021/jp206546g.
- [28] Mihajlo Etinski, Timo Fleig et Christel M Marian. « Intersystem crossing and characterization of dark states in the pyrimidine nucleobases uracil, thymine, and 1-methylthymine ». In : *The Journal of Physical Chemistry A* 113 (2009), p. 11809-11816.
- [29] David Picconi et al. « The Interplay between $\pi\pi^*/n\pi^*$ Excited States in Gas-Phase Thymine: A Quantum Dynamical Study ». In : *ChemPhysChem* 12 (2011), p. 1957-1968.
- [30] Dana Nachtigallova' et al. « Nonadiabatic dynamics of uracil: Population split among different decay mechanisms ». In : *J. Phys. Chem. A* 115 (2011), p. 5247-5255. doi : 10.1021/jp201327w.
- [31] Martin Richter et al. « Ultrafast intersystem crossing dynamics in uracil unravelled by ab initio molecular dynamics ». In : *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014), p. 24423-24436. doi : 10.1039/c4cp04158e.
- [32] Manuela Merchán et al. « Unified model for the ultrafast decay of pyrimidine nucleobases ». In : *J. Phys. Chem. B* 110 (2006), p. 26471-26476. doi : 10.1021/jp066874a.
- [33] David Asturiol et al. « Photophysics of the π,π and n,π states of thymine: ms-caspt2 minimum-energy paths and casscf on-the-fly dynamics ». In : *J. Phys. Chem. A* 113 (2009), p. 10211-10218. doi : 10.1021/jp905303g.
- [34] Hanneli R. Hudock et al. « Ab Initio molecular dynamics and time-resolved photoelectron spectroscopy of electronically excited uracil and thymine ». In : *J. Phys. Chem. A* 111 (2007), p. 8500-8508. doi : 10.1021/jp0723665.
- [35] Juan José Serrano-Pérez et al. « On the intrinsic population of the lowest triplet state of thymine ». In : *J. Phys. Chem. B* 111 (2007), p. 11880-11883. doi : 10.1021/jp0765446.

- [36] Lluís Blancafort. « Energetics of Cytosine Singlet Excited-State Decay Paths-A Difficult Case for CASSCF and CASPT2† ». In : *Photochem. Photobiol.* 83 (2007), p. 603-610. doi : 10.1562/2006-05-29-ra-903.
- [37] Katarina Tomić, Jörg Tatchen et Christel M. Marian. « Quantum chemical investigation of the electronic spectra of the keto, enol, and keto-imine tautomers of cytosine ». In : *J. Phys. Chem. A* 109 (2005), p. 8410-8418. doi : 10.1021/jp051510o.
- [38] Kurt A. Kistler et Spiridoula Matsika. « Radiationless decay mechanism of cytosine: An ab initio study with comparisons to the fluorescent analogue 5-methyl-2-pyrimidinone ». In : *J. Phys. Chem. A* 111 (2007), p. 2650-2661. doi : 10.1021/jp0663661.
- [39] Nina Ismail et al. « Ultrafast decay of electronically excited singlet cytosine via a π, π^* to no, π^* state switch ». In : *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002), p. 6818-6819. doi : 10.1021/ja0258273.
- [40] Andrzej L Sobolewski et Wolfgang Domcke. « Ab initio studies on the photophysics of the guanine-cytosine base pair ». In : *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6 (2004), p. 2763-2771. doi : 10.1039/B314419D.
- [41] Martin Richter et al. « Femtosecond intersystem crossing in the DNA nucleobase cytosine ». In : *J. Phys. Chem. Letters* 3 (2012), p. 3090-3095. doi : 10.1021/jz301312h.
- [42] Akira Nakayama et al. « Photophysics of cytosine tautomers: new insights into the nonradiative decay mechanisms from MS-CASPT2 potential energy calculations and excited-state molecular dynamics simulations ». In : *Physical chemistry chemical physics* 15 (2013), p. 12322-12339.
- [43] Christel M. Marian. « The guanine tautomer puzzle: Quantum chemical investigation of ground and excited states ». In : *J. Phys. Chem. A* 111 (2007), p. 1545-1553. doi : 10.1021/jp068620v.

- [44] Mario Barbatti et al. « Relaxation mechanisms of UV-photoexcited DNA and RNA nucleobases. » In : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010), p. 21453-8. doi : 10.1073/pnas.1014982107.
- [45] Hui Chen et Shuhua Li. « Ab initio study on deactivation pathways of excited 9H-guanine ». In : *J. Chem. Phys.* 124 (2006), p. 0-10. doi : 10.1063/1.2186998.
- [46] Luis Serrano-Andrés, Manuela Merchán et Antonio Carlos Borin. « A three-state model for the photophysics of guanine ». In : *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008), p. 2473-2484. doi : 10.1021/ja0744450.
- [47] Susanne Ullrich et al. « Electronic relaxation dynamics in DNA and RNA bases studied by time-resolved photoelectron spectroscopy ». In : *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6 (2004), p. 2796-2801. doi : 10.1039/B316324E.
- [48] Clélia Canuel et al. « Excited states dynamics of DNA and RNA bases: Characterization of a stepwise deactivation pathway in the gas phase ». In : *J. Chem. Phys.* 122 (2005). doi : 10.1063/1.1850469.
- [49] Hyuk Kang et al. « Intrinsic lifetimes of the excited state of DNA and RNA bases ». In : *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002), p. 12958-12959. doi : 10.1021/ja027627x.
- [50] Susan Blaser et al. « Gas-Phase Cytosine and Cytosine-N1-Derivatives Have 0.1-1 ns Lifetimes Near the S₁ State Minimum ». In : *J. Phys. Chem. Lett.* 7 (2016), p. 752-757. doi : 10.1021/acs.jpcllett.6b00017.
- [51] Simon Lobsiger et al. « Excited-state structure and dynamics of keto-amino cytosine: The $1\pi\pi^*$ state is nonplanar and its radiationless decay is not ultra-fast ». In : *J. Phys. Chem. B* 117 (2013), p. 6106-6115. doi : 10.1021/jp401881b.
- [52] E. Nir et al. « REMPI spectroscopy of cytosine ». In : *Chem. Phys. Lett.* 355 (2002), p. 59-64. doi : 10.1016/S0009-2614(02)00180-X.
- [53] Yonggang He, Chengyin Wu et Wei Kong. « Decay pathways of thymine and methyl-substituted uracil and thymine in the gas phase ». In : *J. Phys. Chem. A* 107 (2003), p. 5145-5148. doi : 10.1021/jp034733s.

- [54] M Ligare et al. « Characterizing the dark state in thymine and uracil by double resonant spectroscopy and quantum computation ». In : *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015), p. 24336-24341.
- [55] Christel Marian, Dirk Nolting et Rainer Weinkauf. « The electronic spectrum of protonated adenine: Theory and experiment ». In : *Phys. Chem. Chem. Phys.* 7 (2005), p. 3306-3316. doi : 10.1039/B507422C.
- [56] Dirk Nolting et al. « Excited-state relaxation of protonated adenine ». In : *ChemPhysChem* 8 (2007), p. 751-755. doi : 10.1002/cphc.200600727.
- [57] D. C. Lührs, J. Viallon et I. Fischer. « Excited state spectroscopy and dynamics of isolated adenine and 9-methyladenine ». In : *Phys. Chem. Chem. Phys.* 3 (2001), p. 1827-1831. doi : 10.1039/b101191j.
- [58] Nu Ri Cheong et al. « Photofragmentation in selected tautomers of protonated adenine ». In : *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011), p. 291-295. doi : 10.1039/C000961J.
- [59] Gustavo A. Pino et al. « Non-radiative processes in protonated diazines, pyrimidine bases and an aromatic azine ». In : *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18 (2016), p. 20126-20134. doi : 10.1039/c6cp01345g.
- [60] Michel Broquier et al. « Excited State Dynamics of Cold Protonated Cytosine Tautomers: Characterization of Charge Transfer, Intersystem Crossing, and Internal Conversion Processes ». In : *J. Phys. Chem. A* (2017). doi : 10.1021/acs.jpca.7b06423.
- [61] Sébastien R. Mercier et al. « Microsolvation effects on the excited-state dynamics of protonated tryptophan ». In : *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006), p. 16938-16943. doi : 10.1021/ja065980n.
- [62] Thomas R Rizzo et al. « The electronic spectrum of the amino acid tryptophan in the gas phase ». In : *J. Chem. Phys.* 84 (1986), p. 2534-2541. doi : 10.1063/1.450323.

- [63] Oleg V Boyarkin et al. « Electronic spectroscopy of cold, protonated tryptophan and tyrosine ». In : *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006), p. 2816-2817. doi : 10.1021/ja058383u.
- [64] H Kang et al. « Ultrafast deactivation mechanisms of protonated aromatic amino acids following UV excitation ». In : *Phys. Chem. Chem. Phys.* 7 (2005), p. 394-398. doi : 10.1039/B414986F.
- [65] Brett M. Marsh, Jonathan M. Voss et Etienne Garand. « A dual cryogenic ion trap spectrometer for the formation and characterization of solvated ionic clusters ». In : *J. Chem. Phys.* 143 (2015). doi : 10.1063/1.4936360.
- [66] Joost M. Bakker et al. « Tautomerism of uracil probed via infrared spectroscopy of singly hydrated protonated uracil ». In : *J. Phys. Chem. A* 112 (2008), p. 12393-12400. doi : 10.1021/jp806396t.
- [67] Joost M. Bakker, Jean Yves Salpin et Philippe Maître. « Tautomerism of cytosine probed by gas phase IR spectroscopy ». In : *Int. J. Mass Spectrom.* 283 (2009), p. 214-221. doi : 10.1016/j.ijms.2009.03.014.
- [68] Sara Øvad Pedersen et al. « Structures of protonated thymine and uracil and their monohydrated gas-phase ions from ultraviolet action spectroscopy and theory ». In : *J. Phys. Chem. A* 118 (2014), p. 4256-4265. doi : 10.1021/jp504153p.
- [69] Jens Ulrik Andersen et al. « The combination of an electrospray ion source and an electrostatic storage ring for lifetime and spectroscopy experiments on biomolecules ». In : *Rev. Sci. Instrum.* 73 (2002), p. 1284-1287. doi : 10.1063/1.1447305.
- [70] John Zeleny. « Instability of electrified liquid surfaces ». In : *Phys. Rev.* 10 (1917), p. 1-6. doi : 10.1103/PhysRev.10.1.
- [71] John B Fenn et al. « Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules ». In : *Science* 246 (1989), p. 64-71. doi : 10.1126/science.2675315.

- [72] Malcolm Dole et al. « Molecular beams of macroions ». In : *J. Chem. Phys.* 49 (1968), p. 2240-2249. doi : 10.1063/1.1670391.
- [73] J. V. Iribarne et B. A. Thomson. « On the evaporation of small ions from charged droplets ». In : *J. Chem. Phys.* 64 (1976), p. 2287-2294. doi : 10.1063/1.432536.
- [74] Raymond E. March. « An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry ». In : *J. Mass Spectrom.* 32 (1997), p. 351-369. doi : 10.1002/(SICI)1096-9888(199704)32:4<351::AID-JMS512>3.0.CO;2-Y.
- [75] M. Nappi et al. « Visual representations of simulated three-dimensional ion trajectories in an ion trap mass spectrometer ». In : *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 161 (1997), p. 77-85. doi : 10.1016/S0168-1176(96)04416-3.
- [76] Hyuk Kang et al. « New method for double-resonance spectroscopy in a cold quadrupole ion trap and its application to UV-UV hole-burning spectroscopy of protonated adenine dimer ». In : *J. Phys. Chem. Lett.* (2014). doi : 10.1021/jz5012466.
- [77] W. C. Wiley et I. H. McLaren. « Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution ». In : *Rev. Sci. Instrum.* 26 (1955), p. 1150-1157. doi : 10.1063/1.1715212.
- [78] V. V.K. Rama Rao et Amit Bhutani. « Electric hexapoles and octopoles with optimized circular section rods ». In : *Int. J. Mass Spectrom.* 202 (2000), p. 31-36. doi : 10.1016/S1387-3806(00)00200-1.
- [79] Xue Bin Wang et Lai Sheng Wang. « Development of a low-temperature photoelectron spectroscopy instrument using an electrospray ion source and a cryogenically controlled ion trap ». In : *Rev. Sci. Instrum.* 79 (2008), p. 0-8. doi : 10.1063/1.2957610.
- [80] James G. Redwine et al. « A novel ion trap based tandem mass spectrometer for the spectroscopic study of cold gas phase polyatomic ions ». In : *Int. J. Mass Spectrom.* 348 (2013), p. 9-14. doi : 10.1016/j.ijms.2013.04.002.

- [81] Michel Broquier, Satchin Soorkia et Gilles Grégoire. « A comprehensive study of cold protonated tyramine: UV photodissociation experiments and ab initio calculations ». In : *Phys. Chem. Chem. Phys.* (2015). doi : 10 . 1039 / C5CP01375E.
- [82] *TURBOMOLE V7.4 2019, a development of University of Karlsruhe and Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, 1989-2007, TURBOMOLE GmbH, since 2007; available from*
<http://www.turbomole.com>.
- [83] M. J. Frisch et al. *Gaussian~16 Revision C.01*. Gaussian Inc. Wallingford CT. 2016.
- [84] Reinhart Ahlrichs. « Efficient evaluation of three-center two-electron integrals over Gaussian functions ». In : *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6 (2004), p. 5119-5121. doi : 10 . 1039/B413539C.
- [85] Andreas Köhn et Christof Hättig. « Analytic gradients for excited states in the coupled-cluster model CC2 employing the resolution-of-the-identity approximation ». In : *J. Chem. Phys.* 119 (2003), p. 5021-5036. doi : 10 . 1063/1 . 1597635.
- [86] Rick A. Kendall, Thom H. Dunning et Robert J. Harrison. « Electron affinities of the first-row atoms revisited. Systematic basis sets and wave functions ». In : *J. Chem. Phys.* 96 (1992), p. 6796-6806. doi : 10 . 1063/1 . 462569.
- [87] Arnim Hellweg, Sarah A. Grün et Christof Hättig. « Benchmarking the performance of spin-component scaled CC2 in ground and electronically excited states ». In : *Phys. Chem. Chem. Phys.* 10 (2008), p. 4119-4127. doi : 10 . 1039/ b803727b.
- [88] Samer Gozem et Anna I. Krylov. « The `<sc> ezSpectra</sc>` suite: An easy-to-use toolkit for spectroscopy modeling ». In : *WIREs Computational Molecular Science* (2021). doi : 10 . 1002/wcms . 1546.

- [89] Philipp Pracht, Fabian Bohle et Stefan Grimme. « Automated exploration of the low-energy chemical space with fast quantum chemical methods ». In : *Phys. Chem. Chem. Phys.* 22 (2020), p. 7169-7192. doi : 10.1039/C9CP06869D.
- [90] Christoph Bannwarth et al. « Extended tight-binding quantum chemistry methods ». In : *WIREs Comput. Mol. Sci.* 11 (2020), e01493. doi : 10.1002/wcms.1493.
- [91] Christoph Bannwarth, Sebastian Ehlert et Stefan Grimme. « GFN2-xTB—An accurate and broadly parametrized self-consistent tight-binding quantum chemical method with multipole electrostatics and density-dependent dispersion contributions ». In : *J. Chem. Theory Comput.* 15 (2019), p. 1652-1671. doi : 10.1021/acs.jctc.8b01176.
- [92] Matias Berdakin et al. « Excited states of protonated DNA/RNA bases ». In : *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014), p. 10643-10650. doi : 10.1039/c4cp00742e.
- [93] Jill K. Wolken et František Tureček. « Proton affinity of uracil. A computational study of protonation sites ». In : *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11 (2000), p. 1065-1071. doi : 10.1016/S1044-0305(00)00176-8.
- [94] Andrzej Leś et al. « The infrared spectra of matrix isolated uracil and thymine: An assignment based on new theoretical calculations ». In : *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* 48 (1992), p. 1385-1395. doi : 10.1016/0584-8539(92)80144-L.
- [95] Estefanía Rossich Molina et al. « On the gas phase fragmentation of protonated uracil: A statistical perspective ». In : *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18 (2016), p. 14980-14990. doi : 10.1039/c6cp01657j.
- [96] Marko Schreiber et al. « Benchmarks for electronically excited states: CASPT2, CC2, CCSD, and CC3 ». In : *J. Chem. Phys.* 128 (2008). doi : 10.1063/1.2889385.
- [97] S. J. Strickler et Robert A. Berg. « Relationship between absorption intensity and fluorescence lifetime of molecules ». In : *J. Chem. Phys.* 37 (1962), p. 814-822. doi : 10.1063/1.1733166.

- [98] M. A. El-Sayed. « Spin-orbit coupling and the radiationless processes in nitrogen heterocyclics ». In : *J. Chem. Phys.* 38 (1963), p. 2834-2838. doi : 10.1063/1.1733610.
- [99] Reza Omidyan et al. « Excited State Deactivation Mechanism in Protonated Uracil: New Insights from Theoretical Studies ». In : *J. Phys. Chem. A* 124 (2020), p. 5089-5097. doi : 10.1021/acs.jpca.0c02284.
- [100] Michel Broquier et al. « Twisted Intramolecular Charge Transfer in Protonated Amino Pyridine ». In : *J. Phys. Chem. A* (2016). doi : 10.1021/acs.jpca.6b03510.
- [101] Martin Pitzer et al. « State-Dependent Fragmentation of Protonated Uracil and Uridine ». In : *J. Phys. Chem. A* 123 (2019), p. 3551-3557. doi : 10.1021/acs.jpca.9b01822.
- [102] Chad C. Nelson et James A. McCloskey. « Collision-induced dissociation of uracil and its derivatives ». In : *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 5 (1994), p. 339-349. doi : 10.1016/1044-0305(94)85049-6.
- [103] Leila Shahrokh, Reza Omidyan et Gholamhassan Azimi. « Theoretical insights on the excited-state-deactivation mechanisms of protonated thymine and cytosine ». In : *Phys. Chem. Chem. Phys.* 23 (2021), p. 8916-8925. doi : 10.1039/d0cp06673g.
- [104] Asit K. Chandra et al. « Protonation and deprotonation enthalpies of guanine and adenine and implications for the structure and energy of their complexes with water: Comparison with uracil, thymine, and cytosine ». In : *J. Phys. Chem. A* 103 (1999), p. 8853-8860. doi : 10.1021/jp990647+.
- [105] John M Gregson et James A McCloskey. « Collision-induced dissociation of protonated guanine ». In : *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 165 (1997), p. 475-485. doi : 10.1016/S0168-1176(97)00163-8.
- [106] Jordan Dezalay et al. « Excited state dynamics of protonated keto uracil: intersystem crossing pathways in competition ». In : *Eur. Phys. J. D* 75 (2021), p. 1-11. doi : 10.1140/epjd/s10053-020-00017-z.

- [107] <https://cccbdb.nist.gov/vibscale.asp>.
- [108] Michal Hanus et al. « Correlated ab initio study of nucleic acid bases and their tautomers in the gas phase, in a microhydrated environment and in aqueous solution. Guanine: Surprising stabilization of rare tautomers in aqueous solution ». In : *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003), p. 7678-7688. doi : 10.1021/ja034245y.