# Processus intrinsèques radio-induits dans des complexes non-covalents d'intérêt biologique et pharmaceutique

Marwa Abdelmouleh

▶ **To cite this version:**

Marwa Abdelmouleh. Processus intrinsèques radio-induits dans des complexes non-covalents d'intérêt biologique et pharmaceutique. Physique [physics]. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMC219 . tel-03124892

**HAL Id: tel-03124892**
**https://theses.hal.science/tel-03124892**

Submitted on 29 Jan 2021

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

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

Normandie Université

# THÈSE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**

**Spécialité PHYSIQUE**

**Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie**

# Processus intrinsèques radio-induits dans des complexes non-covalents d'intérêt biologique et pharmaceutique

**Présentée et soutenue par**
**Marwa ABDELMOULEH**

| **Thèse soutenue publiquement le 25/11/2020 devant le jury composé de** | | |
|---|---|---|
| M. FRANCIS CANON | Chargé de recherche HDR, INRA Dijon | Rapporteur du jury |
| Mme EMMANUELLE SACHON | Maître de conférences HDR, Sorbonne Université | Rapporteur du jury |
| M. MOSTAFAVI MEHRAN | Professeur des universités, Université Paris-Saclay | Membre du jury |
| Mme YVETTE NGONO RAVACHE | Chercheur-ingénieur au CEA, Université Caen Normandie | Président du jury |
| M. JEAN-CHRISTOPHE POULLY | Maître de conférences, Université Caen Normandie | Membre du jury |
| M. BENOÎT SOEP | Directeur de recherche, CEA Saclay | Membre du jury |
| M. JEAN-YVES CHESNEL | Professeur des universités, Université Caen Normandie | Directeur de thèse |

**Thèse dirigée par JEAN-YVES CHESNEL, Centre de recherche sur les ions, les matériaux et la photonique (Caen)**

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

ED 591 PSIME

CIMAP

# Remerciements

Nous y voilà enfin, certainement l'une des parties les plus importantes de ce manuscrit : les remerciements. Trois années de thèse s'achèvent non sans soulagement mais avec toutefois un peu de mélancolie. J'ai quitté mon pays natal pour venir poursuivre un rêve ici en France. Une belle opportunité qui m'a été offerte et bien que cela n'a pas toujours été facile avec entre autre la fracture de ma main, le COVID ... , j'en garde un merveilleux souvenir et une belle expérience tant humaine que professionnelle. Quand je suis arrivée à Caen pour mon stage de master, je suis restée trois mois avec comme unique but de prendre un maximum de connaissance, d'expérience et connaître davantage cette fabuleuse culture qui m'avait toujours attiré. A mon retour en Tunisie je ne savais pas si je pourrais retourner en France, ou si cette aventure n'était que le début d'une nouvelle vie.

Tout d'abord, mes premiers remerciements s'adressent à l'ensemble des membres du jury, qui ont consacré de leur temps à la lecture méticuleuse de ce manuscrit, et qui ont été présent pour ma soutenance, COVID oblige, par visioconférence. Il faut dire que l'année 2020 a marqué un nouveau tournant dans notre vie. Je remercie Emmanuelle Sachon et Francis Canon pour leurs rapports détaillés ainsi que pour toutes ces remarques bienveillantes. Merci à Benoît Soep et Mostafavi Mehran d'avoir bien voulu examiner mes travaux de thèse. Finalement, merci à Yvette Ngono pour avoir présidé ce jury.

Ces travaux de thèse ont pu être réalisés grâce à un vrai travail d'équipe et de nombreuses collaborations. C'est pour cela que je souhaite remercier toutes les personnes qui étaient présentes à mes côtés et qui ont participé à ces travaux durant ces trois années. Je remercie bien chaleureusement mon directeur de thèse, Jean-Yves Chesnel pour ses conseils avisés, toujours pertinents, sa disponibilité et son accompagnement tout le long de ma thèse.

Je tiens à remercier particulièrement Jean-Christophe Poully sans qui je ne serais pas là aujourd'hui. En effet, il a cru en moi et m'a offert cette chance inouïe. Il a toujours été présent quand j'avais

besoin de lui pour me guider et me conseiller. Dès notre première rencontre, j'ai su que je voulais travailler avec lui et que j'aillais énormément apprendre à ses côtés. Et ce fut le cas, j'ai eu grâce à lui, l'opportunité de participer à différentes expériences dans différents laboratoires où nous avons eu notre lot d'aventures (à Berlin "night shift", à Paris, à Hamburg, à Lyon). J'ai énormément appris grâce aux opportunités que tu m'as offertes et je t'en suis reconnaissante.

Je remercie Thomas Schlathölter, Xin Wang et Wen li de l'université de Groningen au Pays-Bas, avec qui nous avons réalisé toutes les expériences d'irradiation de cette thèse à BESSY (Berlin-Germany). Je remercie également Guillaume van der Rest et Frédéric Halgand, de l'institut de Chimie Physique (Orsay) pour les expériences de mobilité ionique. Merci à Gilles Frison et Edith Nicol de l'institut de Chimie Moléculaire (Palaiseau) pour les expériences au moyen d'un spectromètre de masse FT-ICR. Je remercie aussi l'équipe de Samuel Eden, en particulier, André Rebelo d'avoir participé à des expériences d'irradiation. Merci à tous pour votre aide et pour votre excellent accueil.

Une pensée émue, pleine de souvenirs gravés à jamais dans ma mémoire pour mes deux fidèles compagnons, deux compagnons de route, deux amis, sans qui, cette aventure n'aurait pas eu ce goût de rigolades, de partages, de soirées riches en anecdotes et de larmes de joie, pour Nicolas Sens et Suvasthika Indrajith. Merci d'avoir partagé avec moi, tous les jours durant ces trois années, le même bureau, que même le COVID n'a pu nous éloigner les uns des autres. Merci à Khia Khia (Khiara), la bioligiste dans un monde de physique pour tes bonnes pizzas, et bon courage à toi pour ta troisième année. Merci à Min Liu d'avoir été présent avec moi lors de ma dernière manip' qui s'est déroulée de nuit, bonne continuation pour la suite. Merci au nouveau papa Mathieu Lalande de m'avoir aidé à mes débuts et pour avoir contribué à ma bonne intégration.

J'adresse un grand merci à l'ensemble des membres de l'équipe AMA : Violaine, Alain, Jimmy, Amine, Patrick, Alicja. J'ai également une pensée pour François Chevalier, le biologiste, qui a su animer nos nombreux repas du midi partagés ensemble. Merci à toutes les personnes que j'ai oublié de citer.

Un immense merci à mes parents Faika et Naim, d'avoir toujours crû en moi et de m'avoir laissé venir seule en France pour réaliser mon rêve de devenir docteure. Merci à ma sœur Asma et mon frére Omar, loin des yeux mais près du coeur. Je ne pouvais pas ne pas avoir une pensée particulière pour ma belle famille qui m'a toujours encouragé et aidé à croire en moi.

Enfin, ces remerciements seraient incomplets si je n'en adressais pas à mon mari, Aurel, qui fût la plus belle rencontre de ma vie, et qui m'a poussé à ne jamais lâcher même dans mes plus grands moments de doute, merci de m'avoir soutenue tout au long de ma thèse et longue vie à nous.

# Table des matières

**1 Introduction générale** **1**

**2 Systèmes moléculaires d'intérêt biologique et pharmaceutique** **3**

2.1 Interactions moléculaires . . . . . 4

2.1.1 Liaisons covalentes . . . . . 4

2.1.2 Liaisons non-covalentes . . . . . 5

2.1.2.1 Liaison ionique . . . . . 5

2.1.2.2 Liaison hydrogène . . . . . 5

2.1.2.3 Liaisons de type Van der Waals . . . . . 6

2.2 les molécules d'intérêt biologique . . . . . 6

2.2.1 Acides nucléiques . . . . . 7

2.2.2 Acides aminés, peptides et protéines . . . . . 9

2.2.2.1 Acides aminés . . . . . 9

2.2.2.2 Peptides . . . . . 11

2.2.2.3 Protéines . . . . . 13

2.3 Les molécules d'intérêt pharmaceutique . . . . . 14

2.4 Conclusion . . . . . 15

**3 Méthodes expérimentales pour l'étude de molécules d'intérêt biologique ou pharmaceutique en phase gazeuse** **17**

3.1 Production et contrôle des systèmes moléculaires . . . . . 18

3.1.1 Sources de systèmes moléculaires en phase gazeuse . . . . . 18

3.1.2 Sélection et guidage d'ions . . . . . 23

3.1.3 Piégeage des ions . . . . . 27

3.2 La détection . . . . . 29

3.3 Techniques expérimentales d'analyse . . . . . 31

3.3.1 Spectrométrie de masse à temps de vol . . . . . 31
3.3.2 Spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique . . . . . 33
3.3.3 Spectrométrie de mobilité ionique . . . . . 35
3.4 Activation des systèmes moléculaires . . . . . 37
3.4.1 Activation par collision avec un gaz . . . . . 37
3.4.2 Activation par ajout ou détachement d'électron . . . . . 39
3.4.2.1 Dissociation par capture d'électron (ECD) . . . . . 39
3.4.2.2 La dissociation par transfert d'électron (ETD) . . . . . 40
3.4.2.3 La dissociation par détachement d'électron (EDD) . . . . . 41
3.5 Rayonnements ionisants . . . . . 41
3.5.1 Interaction photon-matière . . . . . 42
3.5.2 Photo-absorption moléculaire . . . . . 44
3.5.2.1 Photo-absorption UV-VUV . . . . . 45
3.5.2.2 Photo-absorption X . . . . . 47

**4 Étude des processus photo-induits dans les complexes non-covalents de la vancomycine 51**

4.1 Dispositif expérimental et lignes de faisceaux . . . . . 54
4.1.1 Dispositif expérimental Paultje : Spectromètre de masse à temps de vol utilisée en mode linéaire ou réflectron . . . . . 54
4.1.2 Synchrotron BESSY II . . . . . 58
4.1.2.1 La ligne de photons VUV . . . . . 59
4.1.2.2 La ligne de photons X . . . . . 60
4.2 Résultats et discussions . . . . . 60
4.2.1 Étude des espèces protonées dans la gamme d'énergie VUV . . . . . 60
4.2.1.1 Vancomycine isolée protonée . . . . . 60
4.2.1.2 Effet de la dimérisation . . . . . 65
4.2.1.3 Modèle du récepteur . . . . . 68
4.2.1.4 Effet de la complexation du modèle du récepteur avec la vancomycine 71
4.2.2 Études des espèces déprotonées dans la gamme d'énergie VUV . . . . . 76
4.2.2.1 Vancomycine isolée déprotonée . . . . . 76
4.2.2.2 Complexe déprotoné . . . . . 78
4.2.3 Identification d'un ensemble de modifications post-traductionelles par photo-absorption X . . . . . 81

4.3 Conclusion . . . . . 91

**5 Effets de la nano-solvatation sur les processus induits par capture ou transfert d'électron dans des tri-peptides protonés 93**

5.1 Description des dispositifs expérimentaux . . . . . 96

5.2 Simulation de la structure géométrique et de la section efficace de collision de complexes KYK-CE . . . . . 98

5.3 Résultats et discussions . . . . . 99

5.3.1 Tri-peptide isolé . . . . . 99

5.3.2 Effet de la nano-solvatation . . . . . 100

5.4 Conclusion . . . . . 109

**6 Conclusions et Perspectives 111**

**Bibliographie 113**

# Chapitre 1

# Introduction générale

Les interactions entre les rayonnements ionisants et la matière sont au cœur de nombreuses études dans des domaines de recherche qui se situent souvent aux frontières de la physique, de la chimie et de la biologie. Ces études permettent de comprendre les effets du rayonnement, notamment sur les organismes biologiques. Ceux-ci sont exposés quotidiennement à de faibles doses de rayonnements ionisants provenant de multiples sources, par exemple, de l'air, des sols, des rayonnements cosmiques... L'évolution des espèces vivantes sur Terre s'est faite notamment en présence de rayonnements ionisants. Cependant, les effets de ces rayonnements ne sont pas toujours entièrement compris. Pour cela, il est nécessaire de faire appel à la recherche fondamentale (physique des particules, physique nucléaire, physique atomique...) afin de mieux comprendre, analyser et prédire les processus d'interaction entre les rayonnements ionisants et le vivant. Par ailleurs, de nos jours, en médecine, plusieurs techniques utilisent les rayonnements ionisants, notamment à des fins thérapeutiques.
Par exemple, la radiothérapie a vu le jour au début du XX$^{ème}$ siècle suite à la découverte des rayons X dans le domaine de la radioactivité. La radiothérapie est le traitement des cancers le plus fréquent avec la chirurgie. Environ 216 400 personnes atteintes de cancer suivaient une radiothérapie en 2017 en France [1]. Cette technique consiste à utiliser des rayons X, permettant d'induire la mort cellulaire en déposant de l'énergie dans la zone tumorale par ionisation. Ces photons X ont la capacité de traverser les tissus humains afin de déposer leur énergie en profondeur. Les photons utilisés pour le traitement de radiothérapie ont une énergie comprise entre quelques centaines de keV et quelques dizaines de MeV. Dans cette gamme d'énergie, les photons vont interagir avec la matière biologique à travers trois processus : l'effet photoélectrique, l'effet Compton et la production de paires. Une partie ou la totalité de l'énergie du photon incident va être transférée aux électrons du milieu traversé. Nous détaillerons tous ces processus par la suite dans la partie 3.5.

C'est dans ce cadre que se situe une partie de l'activité de recherche du laboratoire CIMAP à Caen, portée sur l'étude des interactions entre les rayonnements ionisants et la matière. Notre équipe AMA (Atomes, Molécules et Agrégats), au sein de ce laboratoire, s'intéresse entre autre à l'irradiation des molécules d'intérêt biologique isolées ou environnées. En effet, peu d'études ont été effectuées sur la réponse de ces systèmes après irradiation par des rayonnements ionisants malgré l'intérêt fondamental de comprendre les processus radio-induits sur la matière biologique. Et jusqu'à présent, la plupart ont été réalisées en phase condensée vu la difficulté de mise en phase gazeuse des molécules biologiques. Comme nous le verrons à la partie 3.1, des progrès technologiques ont permis il y a quelques dizaines d'années de lever ce verrou. Lors des études en phase gazeuse, les caractéristiques des molécules sont déterminées en absence de solvant, ceci permet d'obtenir des informations complémentaires par rapport à celles obtenues par des techniques d'analyse en phase condensée.

La deuxième partie de ce manuscrit est dédiée à la présentation des systèmes moléculaires d'intérêt biologique et pharmaceutique. Le chapitre 3 expose les techniques expérimentales et différents modes d'activation des systèmes moléculaires, ainsi que leur interaction avec des photons dans le but de mieux comprendre les expériences et les résultats présentés dans la suite. Le chapitre 4 présente les expériences de la photo-absorption sur les complexes non-covalents d'un antibiotique. Nous présenterons les mécanismes de relaxation en fonction de l'énergie des photons dans le but de comprendre comment les interactions non-covalentes impliquées dans la reconnaissance moléculaire sont affectées par les rayonnements ionisants. Le chapitre 5 présente une autre voie d'exploration qui est la prise en compte de la nano-solvatation pour des systèmes d'intérêt biologique. Nous nous intéressons particulièrement aux effets d'une nano-solvatation sur les processus induits par capture ou transfert d'électrons de complexes non-covalents entre un tri-peptide protoné et l'éther 18-couronne-6. Enfin, une conclusion générale nous permettra de résumer les travaux effectués et de discuter des différentes perspectives qui en découlent.

# Chapitre 2

# Systèmes moléculaires d'intérêt biologique et pharmaceutique

## Sommaire


**2.1 Interactions moléculaires . . . . . 4**

2.1.1 Liaisons covalentes . . . . . 4

2.1.2 Liaisons non-covalentes . . . . . 5

2.1.2.1 Liaison ionique . . . . . 5

2.1.2.2 Liaison hydrogène . . . . . 5

2.1.2.3 Liaisons de type Van der Waals . . . . . 6

**2.2 les molécules d'intérêt biologique . . . . . 6**

2.2.1 Acides nucléiques . . . . . 7

2.2.2 Acides aminés, peptides et protéines . . . . . 9

2.2.2.1 Acides aminés . . . . . 9

2.2.2.2 Peptides . . . . . 11

2.2.2.3 Protéines . . . . . 13

**2.3 Les molécules d'intérêt pharmaceutique . . . . . 14**

**2.4 Conclusion . . . . . 15**

L'objectif de ce chapitre est de présenter les éléments essentiels de chimie et biologie afin de comprendre les processus issus de l'irradiation des systèmes étudiés dans cette thèse. Il est important d'étudier les molécules d'intérêt biologique et pharmaceutique car cela améliore la compréhension du fonctionnement des organismes vivants. Ce fonctionnement est réglé par de multiples réactions chimiques et des interactions inter et intra-moléculaires. Nous nous intéressons donc dans cette thèse aux systèmes moléculaires d'intérêt biologique et pharmaceutique. Dans la première partie, nous allons détailler certaines molécules biologiques : les acides nucléiques tels que l'ADN et l'ARN, les acides aminés, les protéines et les peptides. Nous parlerons ensuite des molécules d'intérêt pharmaceutique. En effet, l'action d'un médicament sur l'organisme est provoquée par les effets biochimiques dus à la reconnaissance moléculaire de ce médicament par son récepteur. C'est dans ce cadre-là que nous allons aborder une étude relative au complexe non-covalent entre un antibiotique et un modèle de son récepteur.

## 2.1 Interactions moléculaires

Les interactions moléculaires sont à l'origine des phénomènes biologiques, comme le montre la relation entre structure et activité biologique. Les liaisons chimiques sont établies à partir des interactions entre les électrons de valence des atomes concernés : les liaisons covalentes par le partage d'électrons et les liaisons non-covalentes par des interactions par exemple de type dipôle-dipôle. Dans cette partie, nous allons décrire les différents types d'interactions covalentes et non-covalentes d'importance biologique.

### 2.1.1 Liaisons covalentes

La liaison covalente est une liaison chimique dans laquelle des électrons de valence sont partagés entre deux atomes. Chaque type d'atomes peut établir un certain nombre de liaisons covalentes avec d'autres atomes, en fonction de sa configuration électronique. La longueur et l'énergie de liaison dépendent des atomes mais aussi de l'ordre de la liaison : plus il est élevé, plus cette liaison est courte et forte (de l'ordre de plusieurs centaines de kJ/mol). Nous pouvons par exemple citer le cas de la liaison entre deux atomes d'oxygène, la liaison simple (dans l'ozone) possède une énergie de 145 kJ/mol [2], tandis que celle de la liaison double (du dioxygène) est de 498 kJ/mol [3]. Dans le cas où les deux atomes ont une différence d'électronégativité, le nuage électronique est déporté vers l'atome le plus électronégatif qui a alors une charge partielle négative : la liaison covalente est dite polarisée. Les liaisons covalentes ont un rôle structural fondamental permettant la cohésion

intra et intermoléculaire. Par exemple, la structure des biomolécules est fortement déterminée par les liaisons covalentes entre les atomes de carbone, hydrogène, azote, oxygène, soufre... Les peptides et les protéines sont composées, de plus, par un enchaînement linéaire d'acides aminés liés par une liaison covalente, la liaison amide, appelée liaison peptidique. En effet, l'acide carboxylique et l'amine portés par les acides aminés impliqués forment une liaison peptidique et une molécule d'eau à partir de deux acides aminés (voir la partie 2.2.2). Ce type d'interaction est essentiel pour la structure primaire des protéines.

### 2.1.2 Liaisons non-covalentes

Les interactions différentes des liaisons covalentes sont appelées interactions non-covalentes, elles sont considérées comme des interactions faibles puisque leur énergie est de l'ordre de 10 kJ/mol, soit dix fois moins que les liaisons covalentes. Il existe une multitude de types de liaisons non-covalentes, selon les éléments chimiques intervenant dans l'interaction. Ces interactions sont essentielles pour la structure tridimensionnelle des biomolécules. Cette thèse est centrée sur les systèmes moléculaires non-covalents. Aussi, nous allons décrire, maintenant les principales liaisons non-covalentes.

#### 2.1.2.1 Liaison ionique

Les interactions ioniques, dites aussi ponts salins, sont les plus fortes des interactions non-covalentes. Les liaisons ioniques ne peuvent se former qu'entre des ions de signe opposé. Elles se forment entre un atome métallique donneur d'électron ou un autre atome accepteur de proton et devenant un ion chargé positivement, et un atome accepteur d'électron ou un donneur de proton devenant alors un ion chargé négativement. Les interactions ioniques ne stabilisent pas fortement les structures secondaires, tertiaires et quaternaires des protéines (les acides aminés chargés sont souvent en surface et font des liaisons avec l'eau). Nous pouvons aussi citer l'exemple du sodium (Na), qui, lorsque mis en présence de chlore (Cl) lui transfère un électron ; ainsi, les ions $Na^+$ et les ions $Cl^-$ forment le chlorure de sodium.

#### 2.1.2.2 Liaison hydrogène

La liaison hydrogène (notée liaison H) est une liaison électrostatique de type charge-dipôle. Elle est souvent intermoléculaire et peut être intramoléculaire si la nature des atomes et la géométrie de la molécule le permettent. Cette liaison est créée entre un atome d'hydrogène déjà attaché par une liaison covalente à un autre atome électronégatif appelé donneur, généralement un oxygène, un azote ou un soufre dans les biomolécules, et un atome accepteur électronégatif. Cette liaison est plus

faible que la liaison covalente classique et plus forte que les liaisons de Van Der Waals. Les liaisons hydrogène sont très importantes pour les assemblages macromoléculaires, les protéines, mais aussi dans les acides nucléiques, et sont à l'origine de la reconnaissance moléculaire de ligands par des récepteurs. La création de liaisons hydrogène entre paires azotées est le phénomène chimique par lequel la complémentarité des deux brins d'ADN et ARN existe (voir la partie 2.2.1).

#### 2.1.2.3 Liaisons de type Van der Waals

Une liaison de Van der Waals est définie comme un ensemble d'interactions dipolaires entre atomes ou molécules, que ce soient des dipôles permanents de molécules polaires ou des dipôles induits par interaction. Les liaisons de Van der Waals sont plus faibles que les liaisons covalentes et les liaisons ioniques, et généralement, elles sont légèrement plus faibles que les liaisons hydrogène. Elles sont de trois types : tout d'abord, les forces de Keesom proviennent des interactions dipôle-dipôle, qui se produisent entre deux molécules polaires qui disposent de moments dipolaires permanents. Ensuite, les forces de Debye sont des interactions dipôle-dipôle induit qui s'effectuent entre une molécule polaire et une molécule ou atome non polaires (dits aussi apolaires) dans lesquels le champ électrique produit par la molécule polaire modifie le nuage électronique de façon à induire un dipôle. Et enfin, les forces de dispersion de London sont des interactions dipôle induit-dipôle induit intervenant entre deux molécules ou atomes apolaires.

## 2.2 les molécules d'intérêt biologique

Une molécule d'intérêt biologique, et plus fréquemment appelée biomolécule, est une molécule organique présente, produite ou transformée au sein d'un système vivant. En effet, elle participe aux processus biologiques d'un organisme du monde du vivant, qu'il s'agisse de cellules animales ou végétales, de bactéries et même de virus. Les molécules biologiques sont essentiellement composées d'atomes de carbone (C) qui ont une grande capacité à créer des liaisons covalentes stables et différentes structures d'oxygène (O), d'hydrogène (H), de soufre (S), d'azote (N) et de phosphore (P). Les biomolécules peuvent être classées en quatre grandes familles : les acides nucléiques, les glucides, les lipides, les protéines. Elles peuvent être aussi répertoriées en deux types de molécules en fonction de leur taille. D'une part, les molécules relativement petites qui sont composées de 10 à 20 atomes, notamment les acides aminés et les nucléotides, qui forment une protéine ou un brin d'acide nucléique lorsqu'elles sont assemblées sous la forme d'une chaîne. D'autre part, les grosses molécules qui peuvent comporter jusqu'à plusieurs milliers de ces petites molécules reliées entre elles

par des liaisons covalentes et sont souvent appelées macromolécules. Dans cette partie, nous allons nous intéresser aux acides nucléiques et aux protéines, ainsi qu'à leurs composants.

### 2.2.1 Acides nucléiques

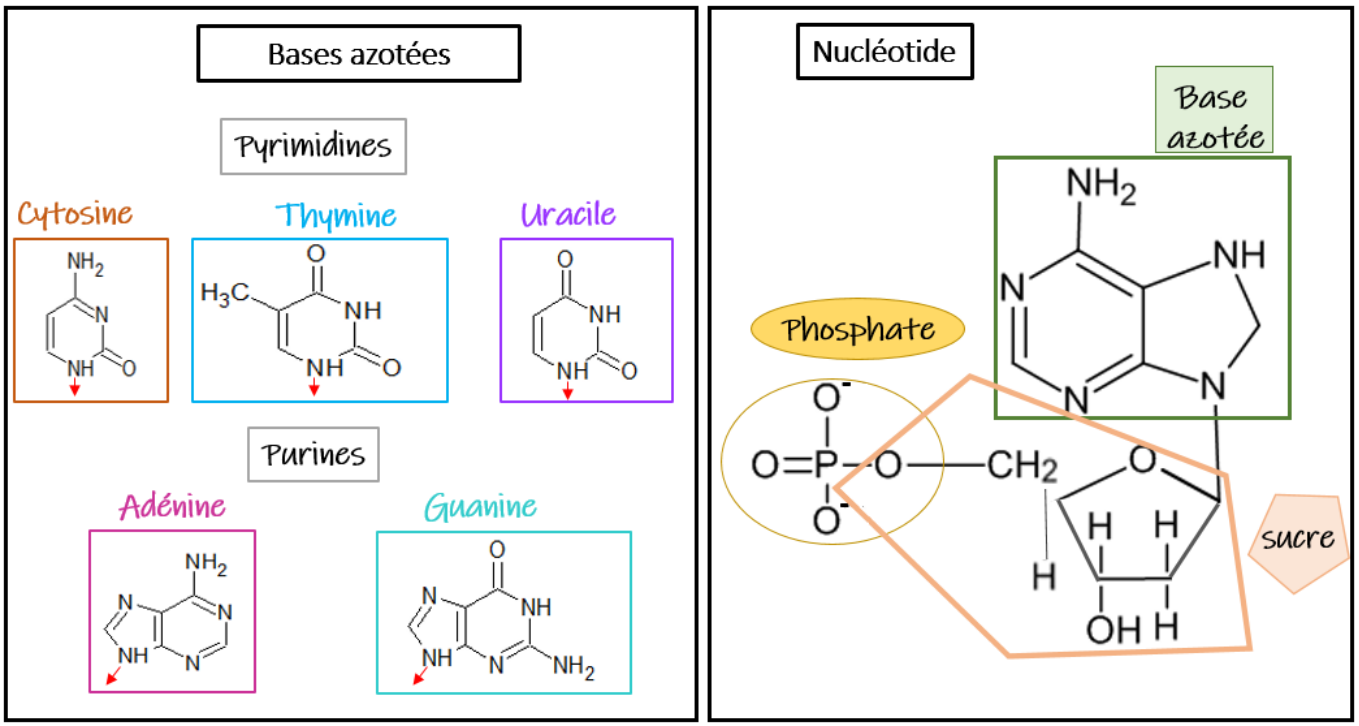


FIGURE 2.1 – A gauche, structure chimique des bases nucléiques, la flèche en rouge définit la position du sucre pour former un nucléotide. A droite, un schéma représentant un nucléotide de l'ADN.

Les acides nucléiques sont des grosses molécules ayant une masse moléculaire élevée allant jusqu'à plusieurs millions de Daltons. Les acides nucléiques sont des polymères constitués d'un enchaînement de nucléotides constitués d'acide phosphorique, d'un pentose et d'une base azotée (voir la figure 2.1). L'acide phosphorique est un tri-acide dont une fonction acide permet de donner une charge négative, et les deux autres forment des liaisons phosphodiester avec les nucléotides voisins. L'acide phosphorique est aussi relié à un groupe sucre appelé pentose, qui est un glucide cyclique à 5 atomes de carbone sous forme de $\beta$-D-ribofurane pour l'ARN (acide ribonucléique) et sous forme «désoxy» pour l'ADN (acide désoxyribonucléique). Les bases nucléiques ou azotées existent en deux catégories. La première regroupe les bases ayant un cycle purique, l'adénine et la guanine (purines), et la seconde comporte celles qui ont un cycle pyrimidique, la cytosine, la thymine (ADN) et l'uracile (ARN) (pyrimidines), comme nous pouvons le voir sur la figure 2.1. La molécule associant une base nucléique et un sucre est appelée un nucléoside.

L'ADN est constitué de deux polynucléotides reliés entre eux par des liaisons hydrogène établies entre les bases azotées ayant des liaisons complémentaires entre elles. L'adénine ne peut se lier qu'à la thymine par deux liaisons hydrogène, alors que la guanine se lie uniquement à la cytosine par trois liaisons H. La structure géométrique de l'ADN est le plus souvent une double hélice (voir la figure 2.2). Cette structure est très stable et sert à protéger l'information génétique stockée dans l'ADN. C'est l'enchaînement des nucléotides qui code l'information génétique.

L'acide ribonucléique (ARN) sert d'intermédiaire dans la transmission de l'information génétique, ainsi que dans la traduction et la synthèse des protéines. Il existe trois types d'ARN : l'ARN messager, formé souvent par des molécules linéaires à un seul brin, représente le produit de la transcription de l'ADN. L'ARN de transfert est généralement plus court et sert à la fixation des acides aminés et finalement, l'ARN ribosomique est le constituant principal des ribosomes dans lesquels a lieu la synthèse des protéines. Nous pouvons distinguer l'ADN de l'ARN par le type de sucre qu'ils contiennent, le ribose pour l'ARN et le désoxyribose dans le cas de l'ADN (voir la Figure 2.1).

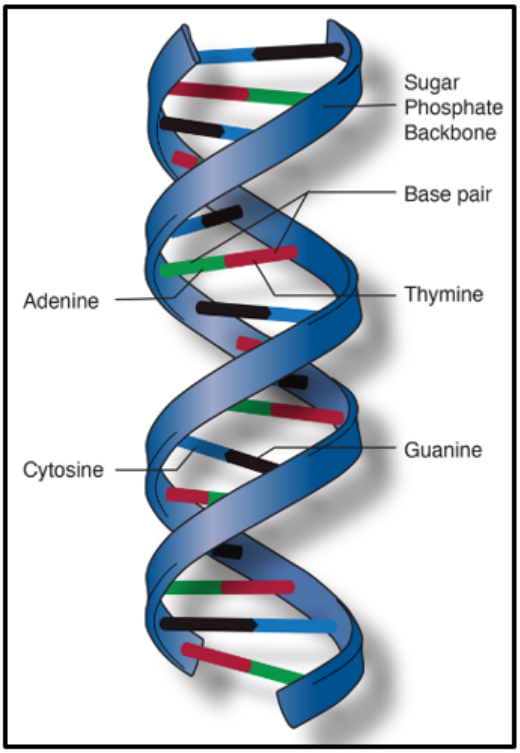


FIGURE 2.2 – La structure en double hélice de l'ADN [4]

Les acides nucléiques sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires, notamment la réplication, la transcription et la traduction de l'information génétique en protéines (voir la figure 2.3). La transmission de l'information du gène à la protéine se déroule en deux étapes : tout d'abord,

l'ADN appartenant au gène est copié sur un brin d'ARN, cette étape est appelée la transcription. Ensuite, la réplication de l'ADN permet de copier l'information génétique afin d'obtenir deux copies de son ADN. D'autre part, ce brin d'ARN est lui même utilisé pour transférer l'information hors du noyau et synthétiser les protéines : c'est la traduction. Après la traduction, les protéines sont souvent modifiées par suppression ou ajout de groupements chimiques : nous y reviendrons dans la partie 2.2.2.3.

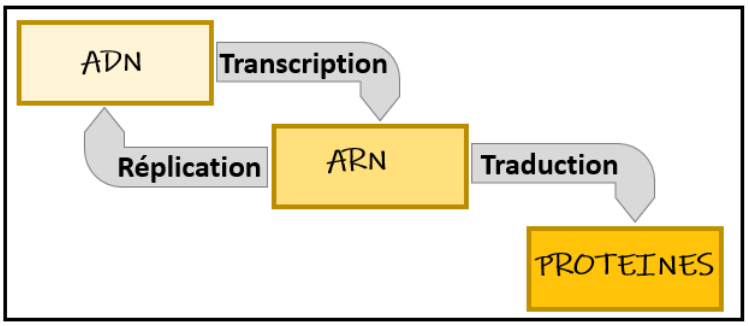


FIGURE 2.3 – Schéma représentant les étapes de la synthèse des protéines

## 2.2.2 Acides aminés, peptides et protéines

### 2.2.2.1 Acides aminés

Un acide aminé est une molécule organique constituée d'un carbone appelé $C_\alpha$ lié à une fonction acide carboxylique, une fonction amine, un atome d'hydrogène et un groupement variable R. Sa structure peut s'écrire sous la forme suivante :

$$\begin{array}{c} \mathrm{R} \\ | \\ \mathrm{H_2N\text{-}C_\alpha\text{-}COOH} \\ | \\ \mathrm{H} \end{array} \tag{2.1}$$

où R correspond à la chaîne latérale de chaque acide aminé qui l'identifiera. Les acides aminés sont essentiels au bon fonctionnement de nos cellules. Seuls vingt acides aminés sont fréquemment observés dans la composition des protéines de l'organisme humain. Ils peuvent être différenciés selon la structure et les propriétés physico-chimiques de leur chaîne latérale. La figure 2.4 illustre la structure de ces vingt acides aminés, et donne leurs noms, symboles et lettres. Selon la présence d'une charge positive ou négative au niveau de la chaîne latérale à pH neutre, on peut différencier les acides aminés basiques, acides et non polaires. Parmi les acides aminés, la lysine nous intéressera particulièrement dans la partie 5, qui est un acide aminé basique. Certains acides aminés présents dans les protéines appartiennent à la configuration L, mais nous pouvons trouver aussi des acides aminés appartenant à la configuration D, par exemple, dans certains antibiotiques peptidiques.

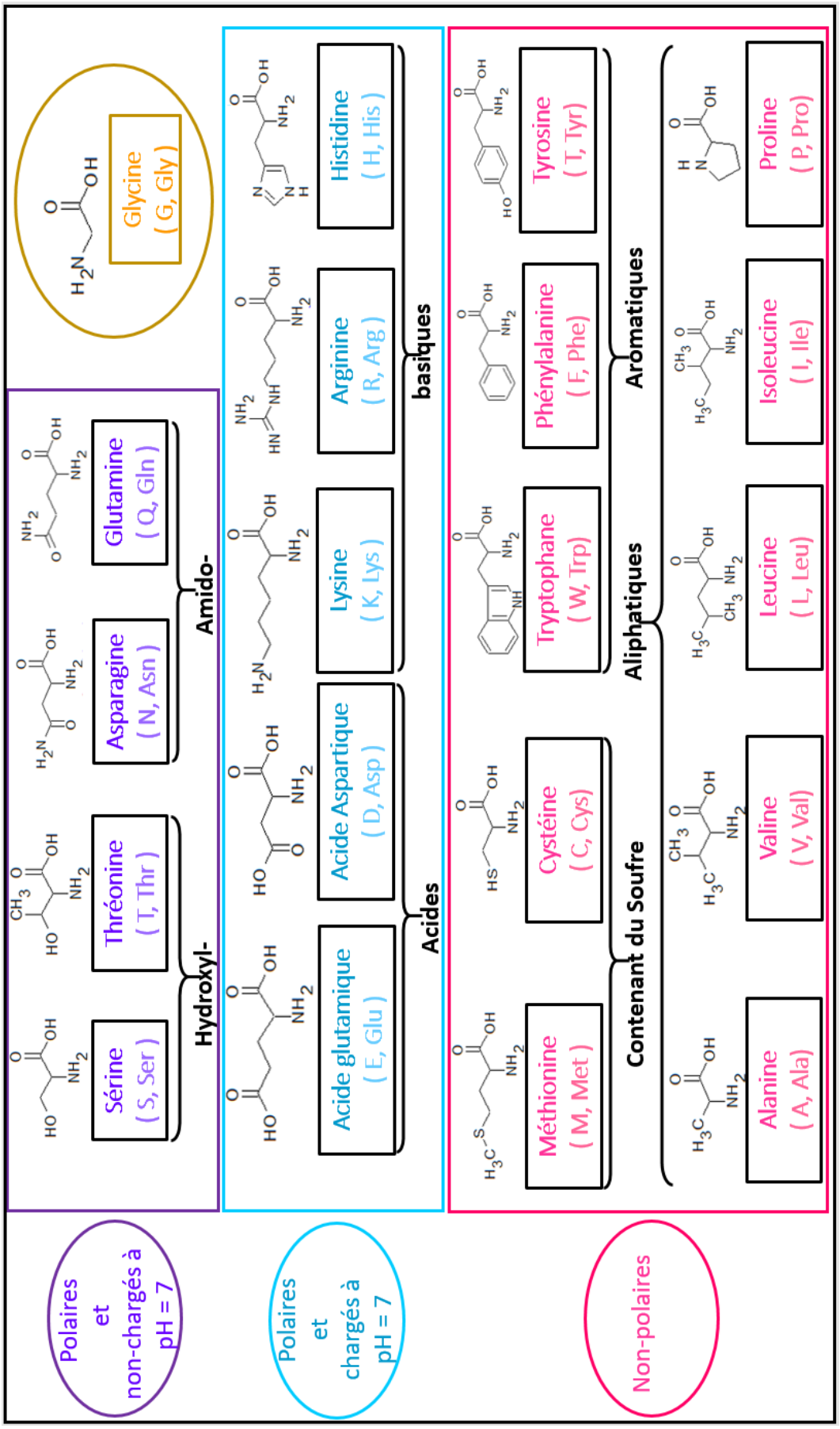


FIGURE 2.4 – Structure chimique des 20 acides aminés

Lorsque la molécule possède deux atomes de carbone asymétriques, chacun d'eux peut se trouver dans la configuration R ou dans la configuration S. Nous pouvons trouver quatre stéréoisomères (R,R), (R,S), (S,R), (S,S). Les couples (R,R) et (S,S) constituent un couple d'énantiomères et il en est de même pour les couples (R,S) et (S,R). Les couples (R,R) et (R,S) ainsi que (S,R) et (S,S) sont des diastéréoisomères (D). Dans la nomenclature de Fischer, tous les acides $\alpha$-aminés possèdent une configuration absolue L. En nomenclature de Cram, les acides $\alpha$-aminés possèdent une configuration S, à l'exception de la cystéine qui a une configuration R. Les acides aminés possèdent une absorption intéressante dans le domaine de l'ultraviolet notamment à des longueurs d'ondes inférieures à 230 nm. Cependant, les acides aminés contenant des chromophores tels que la tyrosine, le tryptophane et la phenylalanine présentent une absorption autour de 280nm. Les acides aminés sont des espèces amphotères. Grâce aux fonctions acide carboxylique et amine, ils peuvent se comporter comme des acides ou des bases. Ainsi, en fonction du pH, et de sa valeur par rapport aux valeurs des deux pKa de l'acide aminé, ils peuvent se présenter sous la forme cationique (pH < $pKa_1$), sous la forme anionique (pH > $pKa_2$) ou sous leur forme zwitterionique ($pKa_1$ < pH< $PKa_2$).

#### 2.2.2.2 Peptides

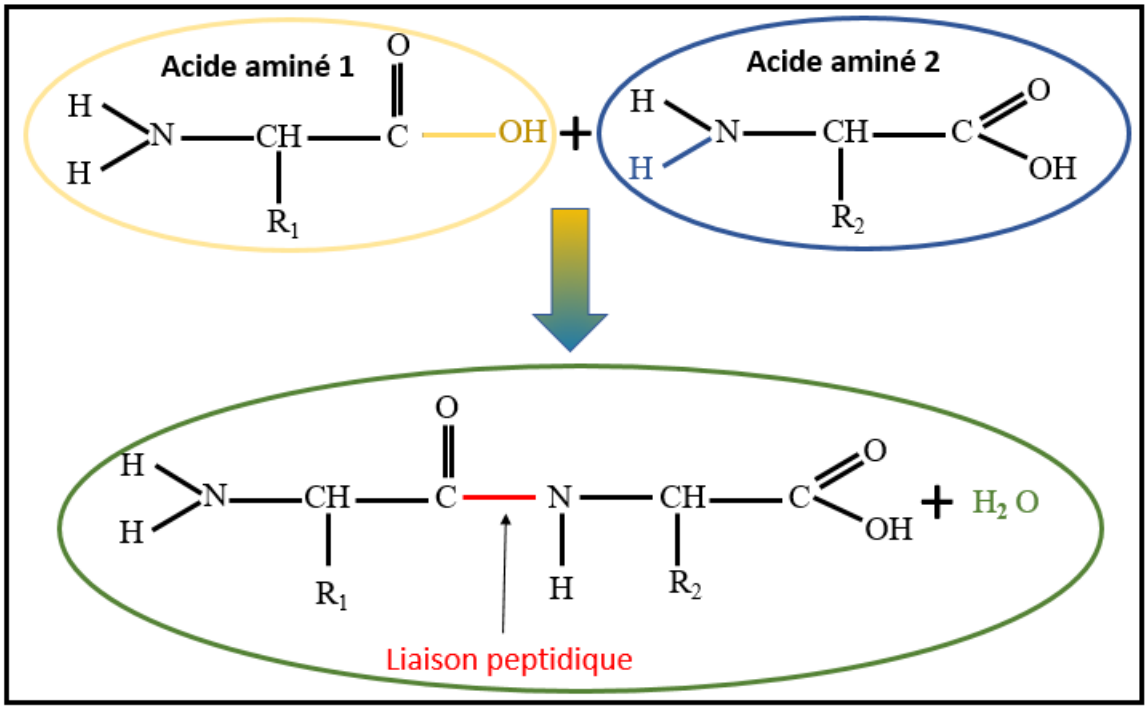


FIGURE 2.5 – Formation d'une liaison peptidique

La polymérisation des molécules d'acides aminés forme un peptide ou une protéine lorsqu'elles sont assemblées via des liaisons peptidiques sous la forme d'une séquence déterminée. On parle de

peptide lorsque la longueur de la chaîne est inférieure à 50 acides aminés, de polypeptides ou petites protéines lorsqu'elle est comprise entre 50 et 100, et de protéines quand la chaîne est supérieure à 100 acides aminés. La création de la liaison peptidique entre deux acides aminés est schématisée dans la figure 2.5. Cette liaison est formée au cours de la réaction de condensation entre la fonction acide carboxylique du premier acide aminé et la fonction amine du deuxième acide aminé, libérant une molécule d'eau $H_2O$. Une fois la liaison peptidique constituée, l'azote du groupement amine se trouvant à gauche sur la figure 2.6 est appelé N-terminal, et le carbone du groupe carboxyle situé à droite est le C-terminal. La réaction chimique qui permet d'obtenir un peptide à partir de plusieurs acides aminés est une synthèse peptidique, et l'ensemble des atomes reliant le N-terminal au C-terminal est nommé le squelette peptidique. Les fragments créés le long d'un squelette peptidique en fonction de la liaison rompue sont désignés par une nomenclature conventionelle. En 1984, Roepstorff et Folhman ont proposé une notation pour la fragmentation des peptides monochargés [5]. De plus, un numéro est associé à chaque liaison peptidique. La figure 2.6 illustre cette nomenclature dans le cas d'un peptide composé de quatre acides aminés dont les chaînes latérales sont symbolisées par $R_n$.

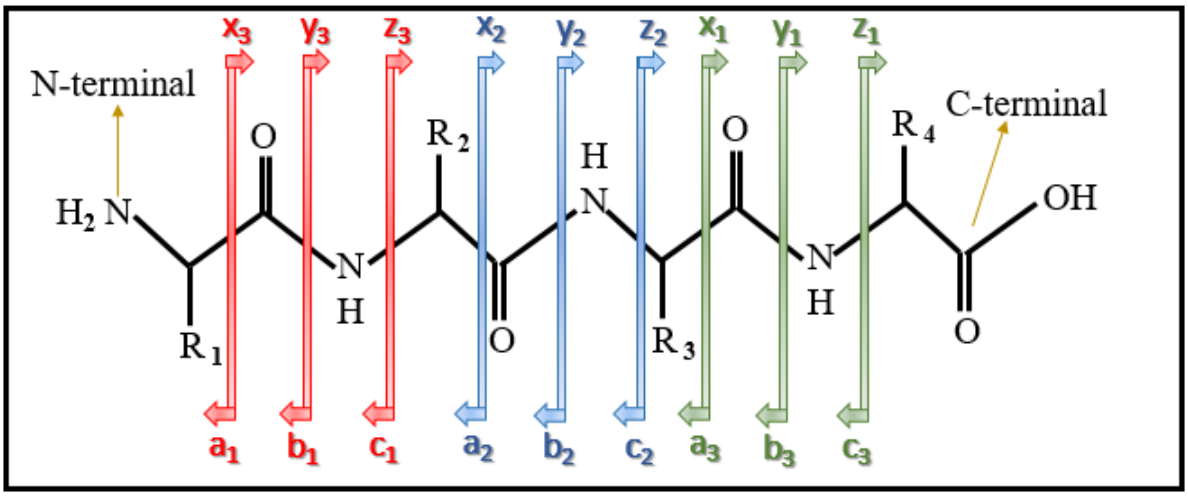


FIGURE 2.6 – schéma de la nomenclature de fragmentation d'un peptide contenant quatre acides aminés dont les chaînes latérales sont représentées par $R_n$ (n = [1 ;4]). Les flèches représentent la localisation de la charge.

Chaque liaison covalente brisée donne naissance à une paire de fragments dont le nom dépend de la localisation de la charge. Si la charge est du côté N-terminal du squelette peptidique, les ions formés sont appelés a, b et c et si elle se situe du côté C-terminal, les ions formés sont appelés x, y et z, l'indice désignant le nombre de résidus d'acides aminés présents dans le fragment. Les peptides possèdent de nombreuses propriétés biologiques. Ils peuvent être actifs notamment par leur rôle physico-chimique tel que le gluthation, un tri-peptide ayant un rôle important dans les

oxydoréductions cellulaires par sa protection contre les agressions de l'oxygène et de ses formes actives, par leur activité hormonale (l'insuline et le Glucagon) ou par leur rôle antibiotique, par exemple la vancomycine. Nous reviendrons largement sur cet antibiotique dans la partie 4 et nous parlerons des molécules d'intérêt pharmaceutique un peu plus loin.

#### 2.2.2.3 Protéines

Les protéines sont des peptides de grande taille qui peuvent comporter jusqu'à plusieurs milliers d'acides aminés et leur poids moléculaire est compris entre $10^4$ Da et $10^6$ Da. Elles représentent l'un des principaux constituants des cellules de l'organisme humain. Chaque acide aminé offre à la protéine des propriétés chimiques particulières, et l'ordre d'assemblage lui confère une fonction bien définie. Cette fonction est généralement déterminée par la structure géométrique de la protéine. Dans une protéine, on distingue jusqu'à quatre niveaux de structure : la structure primaire qui correspond à la séquence d'acides aminés que l'on donne du N au C-terminal, par convention. La structure secondaire qui décrit l'arrangement spatial des atomes des acides aminés voisins, des repliements ou des enroulements rencontrés. Les hélices $\alpha$ et les feuillets $\beta$ sont les deux structures secondaires les plus souvent rencontrées. Puis, la structure tertiaire qui est l'organisation des différents domaines ayant des structures secondaires données. Enfin, la structure quaternaire qui est l'arrangement spatial de plusieurs sous-unités polypeptidiques ayant une structure tertiaire. Ces niveaux de structure sont formés par différents types d'interaction entre les acides aminés d'une protéine, que nous avons décrits dans les parties précédentes. Les protéines ont un rôle important dans de nombreuses fonctions des organismes (transport, catalyse). Les protéines peuvent interagir avec d'autres molécules, entraînant parfois un changement de leur conformation permettant d'inhiber ou de stimuler leur activité. Elles peuvent subir des modifications post-traductionelles qui représentent un mécanisme majeur de la régulation et du contrôle de la fonction des protéines. Ces modifications chimiques sont généralement réalisées par des enzymes. Ces modifications peuvent se produire sur les chaînes latérales des acides aminés. D'autres formes de modification post-traductionnelle peuvent être constituées par la rupture de liaisons peptidiques. Ces modifications peuvent être classées en : addition ou perte d'un groupement fonctionnel (la phosphorylation, l'hydroxylation, la déamidation, la déimination), addition de peptides (l'ubiquitinylation), changements structuraux (les ponts disulfures). Parmi les modifications entraînant l'ajout d'un groupe fonctionnel, nous pouvons également citer le cas de la glycosylation des protéines, dans laquelle une addition d'oligosaccharide est réalisée au cours de la synthèse de protéines. Cette addition a un rôle primordial dans la maturation de certaines protéines et dans leurs fonctions. On distingue deux types de glycosylation : la N-glycosylation et la O-glycosylation dépen-

dant des acides aminés qui vont porter l'oligosaccharide. Pour ce travail de thèse, nous aborderons plus en détail ces modifications post-traductionnelles dans le chapitre 4.

## 2.3 Les molécules d'intérêt pharmaceutique

Les molécules d'intérêt pharmaceutique sont employées dans la prévention, le diagnostic et le traitement des maladies. Leur fonction biologique dépend souvent de leur structure et leur environnement naturel, via les interactions avec leurs partenaires. Cette communication cellulaire se traduit souvent par l'intermédiaire de phénomènes de reconnaissance moléculaire qui peuvent se dérouler entre les cellules elles-mêmes ou entre les cellules et leur environnement. Cette reconnaissance met en place deux entités, une molécule souvent petite appelée "ligand" et une molécule appelée "récepteur". Le modèle clé/serrure proposé par Fisher [6] en 1984 postule que les structures du ligand et du récepteur sont complémentaires (voir la figure 2.7). Le ligand se fixe aussi spécifiquement sur le récepteur par des interactions moléculaires, provoquant la génération d'une réponse biologique.

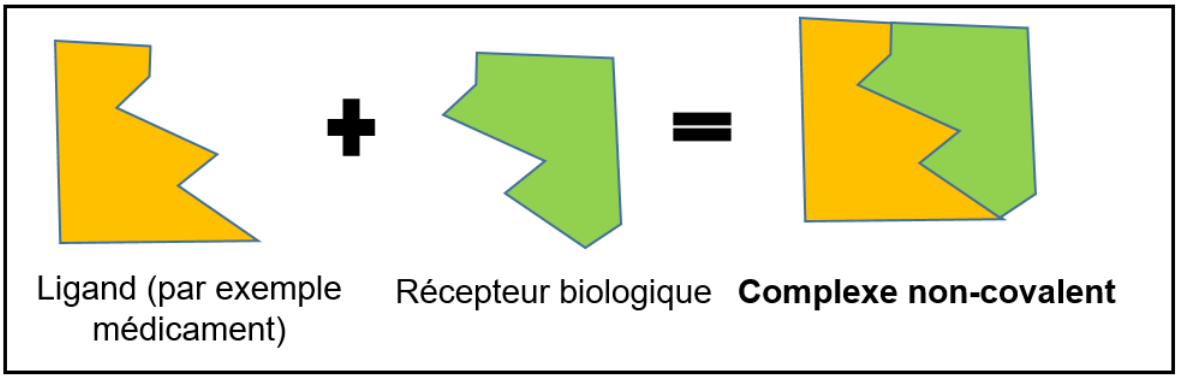


FIGURE 2.7 – Modèle de la reconnaissance moléculaire entre un ligand et son récepteur de type clé/serrure

L'action d'un médicament se traduit par son effet sur une ou des réactions biochimiques en agissant au niveau d'une cellule, d'un organe ou de l'organisme tout entier. Les médicaments peuvent être classés en deux catégories : ceux à liaison non-spécifique qui se lient d'une manière non-spécifique et ceux à liaison spécifique. Dans le premier cas, ces médicaments ne présentent pas d'affinité particulière avec les récepteurs de l'organisme et se lient au niveau de sites moléculaires non désignés comme récepteurs, comme par exemple les protéines plasmatiques, et cela peut provoquer des effets secondaires. Dans le deuxième cas, ces médicaments ont une forte affinité et une complémentarité structurale avec leur récepteurs, cette fixation dépend de leurs propriétés physico-chimiques. Parmi les médicaments, il existe les antibiotiques utilisés dans le traitement des infections bactériennes dues aux bactéries Gram +, ayant une seule membrane cellulaire, par exemple un type particulier de

Staphylococcus aureus (staphylocoque doré) qui est résistant à la méthicilline. L'action d'un antibiotique sur les bactéries passe par une interaction ligand/récepteur. Une des principales caractéristiques de l'interaction ligand-récepteur est son caractère non covalent, dû à des forces de faible intensité décrites précédemment (voir la partie 2.1.1). Elles permettent l'arrangement et l'organisation des différents éléments de l'assemblage pour former des systèmes moléculaires plus stables. Ces dernières sont de plus en plus étudiées dans les travaux de recherche en physique moléculaire et en chimie, notamment pour décrire, comprendre et donc contrôler les propriétés des assemblages moléculaires, par exemple pour concevoir de nouveaux matériaux, catalyser des réactions chimiques ou créer des capteurs permettant la détection de gaz, d'explosifs ou de drogues. Un des exemples de l'interaction ligand-récepteur est l'interaction peptide/antibiotique. Ces aspects seront évoqués dans le chapitre 4.

## 2.4 Conclusion

Nous avons pu détailler dans ce chapitre les systèmes moléculaires d'intérêt biologique et pharmaceutique. Avant d'aborder les résultats, nous allons présenter dans le chapitre suivant les méthodes expérimentales utilisées pour l'étude de la réponse des molécules d'intérêt biologique et pharmaceutique en phase gazeuse aux rayonnements ionisants.

# Chapitre 3

# Méthodes expérimentales pour l'étude de molécules d'intérêt biologique ou pharmaceutique en phase gazeuse

## Sommaire


**3.1 Production et contrôle des systèmes moléculaires . . . . . 18**

3.1.1 Sources de systèmes moléculaires en phase gazeuse . . . . . 18

3.1.2 Sélection et guidage d'ions . . . . . 23

3.1.3 Piégeage des ions . . . . . 27

**3.2 La détection . . . . . 29**

**3.3 Techniques expérimentales d'analyse . . . . . 31**

3.3.1 Spectrométrie de masse à temps de vol . . . . . 31

3.3.2 Spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique . . . . . 33

3.3.3 Spectrométrie de mobilité ionique . . . . . 35

**3.4 Activation des systèmes moléculaires . . . . . 37**

3.4.1 Activation par collision avec un gaz . . . . . 37

3.4.2 Activation par ajout ou détachement d'électron . . . . . 39

3.4.2.1 Dissociation par capture d'électron (ECD) . . . . . 39

3.4.2.2 La dissociation par transfert d'électron (ETD) . . . . . 40

3.4.2.3 La dissociation par détachement d'électron (EDD) . . . . . 41

**3.5 Rayonnements ionisants . . . . . 41**

3.5.1 Interaction photon-matière . . . . . 42

3.5.2 Photo-absorption moléculaire . . . . . 44
3.5.2.1 Photo-absorption UV-VUV . . . . . 45
3.5.2.2 Photo-absorption X . . . . . 47

Une large diversité de méthodes et techniques expérimentales permet d'étudier la structure des systèmes moléculaires, de comprendre leurs propriétés intrinsèques et même de caractériser les interactions non-covalentes de complexes. Parmi ces méthodes, l'analyse par spectrométrie de masse est couramment utilisée comme un outil puissant pour l'étude de systèmes moléculaires de plus en plus gros. Ce chapitre a pour objectif de définir le principe de fonctionnement des principaux outils expérimentaux nous ayant permis d'obtenir les résultats présentés dans cette thèse. Nous évoquerons dans un premier temps les dispositifs de production en phase gazeuse de molécules chargées, ainsi que les outils pour le guidage, la sélection en masse, le piégeage et la détection de ces ions. Nous allons ensuite voir les différentes techniques d'analyse utilisées en spectrométrie. Nous présenterons ensuite les différents moyens d'activation des systèmes moléculaires en phase gazeuse. Enfin, nous retrouverons les différents processus physiques et physico-chimiques mis en jeu dans les systèmes moléculaires lors de l'irradiation par des rayonnements ionisants.

## 3.1 Production et contrôle des systèmes moléculaires

### 3.1.1 Sources de systèmes moléculaires en phase gazeuse

Pour obtenir des informations sur les processus physico-chimiques intrinsèques aux systèmes moléculaires d'intérêt biologique et pharmaceutique, nous les avons étudiés en phase gazeuse. Dans un premier temps, nous allons donc nous intéresser aux méthodes qui permettent de produire des ions moléculaires à l'état gazeux. Au début des années 1920, Dempster a développé une méthode devenue classique permettant de créer en phase gazeuse des ions à partir de petites molécules volatiles, on appelle cette méthode l'impact électronique (IE) [7]. Cette méthode était la première à explorer l'ionisation des molécules organiques, dans laquelle la molécule est bombardée par des électrons produits par un filament de Rhénium ou Tungstène soumis à haute température (autour de 2000 °C) et accélérés par une différence de potentiel de quelques dizaines de volts : cette collision entre la molécule et le faisceau d'électrons induit l'ionisation. A la suite de cette découverte, une méthode complémentaire a été inventée dans les années 60 par Munson et Field : l'ionisation chimique (CI). Cette étude portait sur le comportement du méthane et de l'isobutane en spectrométrie de masse sous une pression voisine de 1 Torr dans la source. Le spectre de masse enregistré dans ces conditions

était contaminé par des pics correspondant à des masses élevées dus aux impuretés présentes dans le gaz. Les auteurs portèrent leur attention non plus sur le gaz méthane ou isobutane, mais sur ces impuretés. Ils en déduisirent les principes d'une nouvelle méthode générale d'analyse en spectrométrie de masse [8]. Cette méthode CI est plus douce que l'impact électronique (IE) puisque la fragmentation des ions moléculaires est réduite. C'est aussi une réaction ion-molécule entre une molécule à analyser à l'état gazeux et un ion réactif qui implique un transfert de proton. Ces deux méthodes, CI et IE, exigent que l'échantillon à analyser puisse être mis en phase gazeuse sans dégradation, ce qui signifie ni décomposition ni transformation. Or la plupart des systèmes moléculaires d'intérêt biologique ou pharmaceutique ont une température de volatilisation trop élevée. C'est pour cela que des méthodes alternatives d'ionisation ont été développées dans les années 80 pour l'étude des molécules non-volatiles de poids moléculaire élevé.

La première méthode dont nous allons parler est l'ionisation par désorption laser assistée par matrice (en anglais MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization). Cette technique permet le passage à l'état gazeux de molécules très polaires et/ou thermiquement fragiles, initialement à l'état solide, sous forme d'ions intacts. Elle consiste à irradier par un laser impulsionnel le mélange, préalablement déposé sur une cible, de l'échantillon à analyser avec une matrice organique absorbant fortement à la longueur d'onde du laser utilisé (voir la figure 3.1). Le choix de la matrice est un élément crucial, parce qu'elle provoque l'ionisation de l'analyte tout en le protégeant d'une ionisation directe par le laser. De plus, l'énergie interne vibrationnelle transférée doit être minimale. La technique MALDI a été développée simultanément dans deux laboratoires. Les premiers ions de haut poids moléculaire (m/z = 34529 à partir de la carbopeptidase-A) sont obtenus par Koichi Tanaka en utilisant un laser azote impulsionnel de longueur d'onde de 337 nm et d'une durée d'impulsion de l'ordre de la nanoseconde, couplé à un spectromètre de masse à temps de vol (voir la partie 3.3.1) équipé d'un reflectron coaxial, en utilisant un matériau solide composé de glycerol et d'une fine poudre de cobalt comme matrice [9]. Au même moment, Karas et Hillenkamp développent une technique similaire avec un laser Nd-YAG (Néodyme-Yttrium Aluminium Garnet) avec une fréquence quadruplée et une longueur d'onde de 266 nm, la durée de l'impulsion étant de l'ordre de la nanoseconde [10]. Cette technique portait sur l'utilisation de petites molécules organiques solides en guise de molécules absorbantes dans l'UV, ces molécules étant un moyen de parvenir à la désorption et l'ionisation des analytes de hauts poids moléculaires. Les molécules analysées étaient des polysaccharides et des peptides [11]. L'invention de cette technique MALDI a permis d'avoir une amélioration considérable de la spectrométrie de masse notamment pour l'étude des biomolécules et

le plus souvent des peptides et protéines. Un autre avantage de MALDI est la possibilité d'obtenir une sensibilité très élevée ayant évolué au cours des années et permettant d'abord d'analyser une quantité de l'ordre de 1pmol, puis de quelques femtomoles jusqu'à des quantités de l'ordre de l'attomole aujourd'hui. Cette méthode simple permet d'analyser un large panel d'échantillons dans un temps réduit puisque la préparation d'un échantillon sur plusieurs dépôts sur la surface métallique est très rapide.

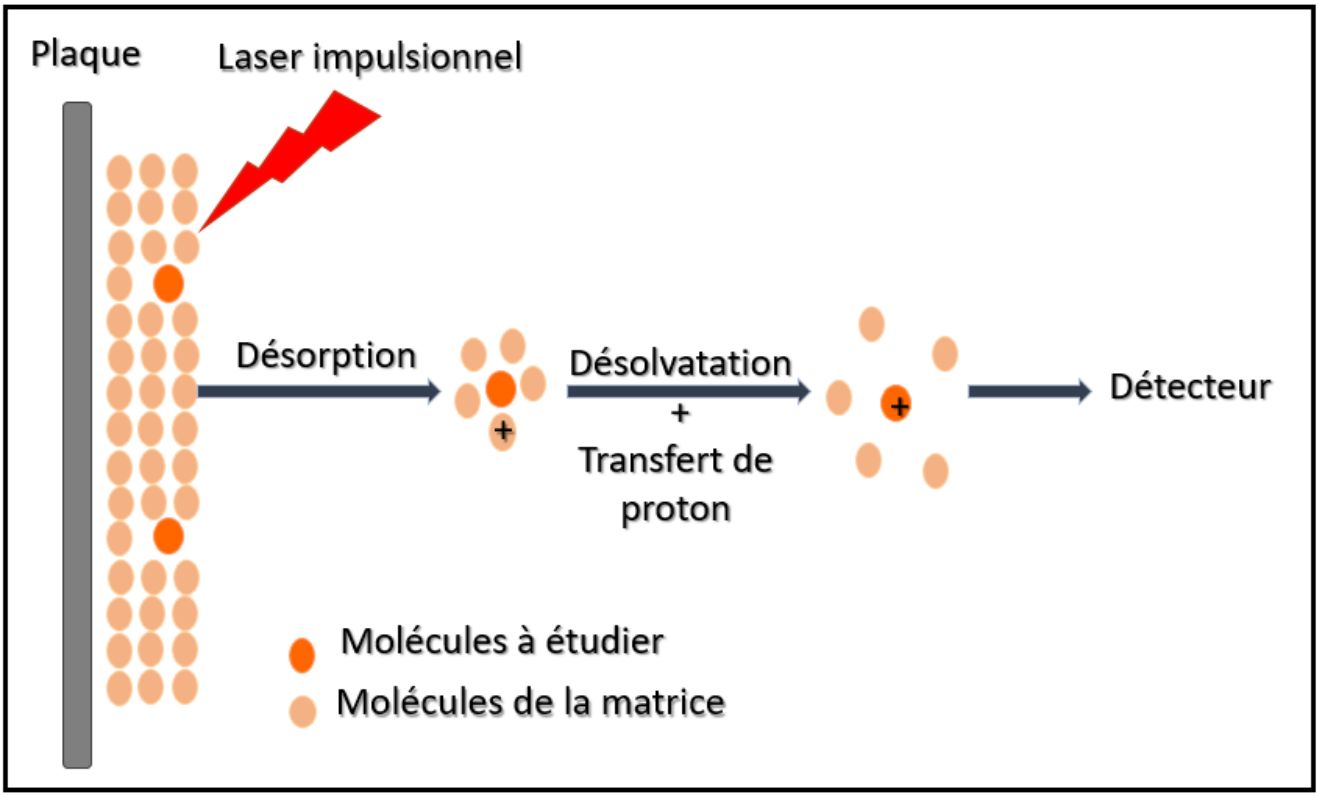


FIGURE 3.1 – Principe de la désorption-ionisation laser par une source MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) en phase gazeuse

Une deuxième méthode est l'ionisation par électronébulisation (ESI, en anglais : electrospray ionization) qui est une technique idéale pour l'analyse de biomolécules de haut poids moléculaire (protéines, ADN...), mais qui permet aussi l'étude de petites molécules polaires, acides ou basiques. Nous allons détailler davantage cette technique dans la suite de cette partie. L'ionisation par électronébulisation a été inventée en 1984 par Fenn et les premières analyses des molécules biologiques de haut poids moléculaire ont été présentées en 1988 [12] [13]. Sa méthode d'ionisation douce et sa capacité à créer des ions multichargés rendent possible la mesure des masses des systèmes moléculaires par spectrométrie de masse.

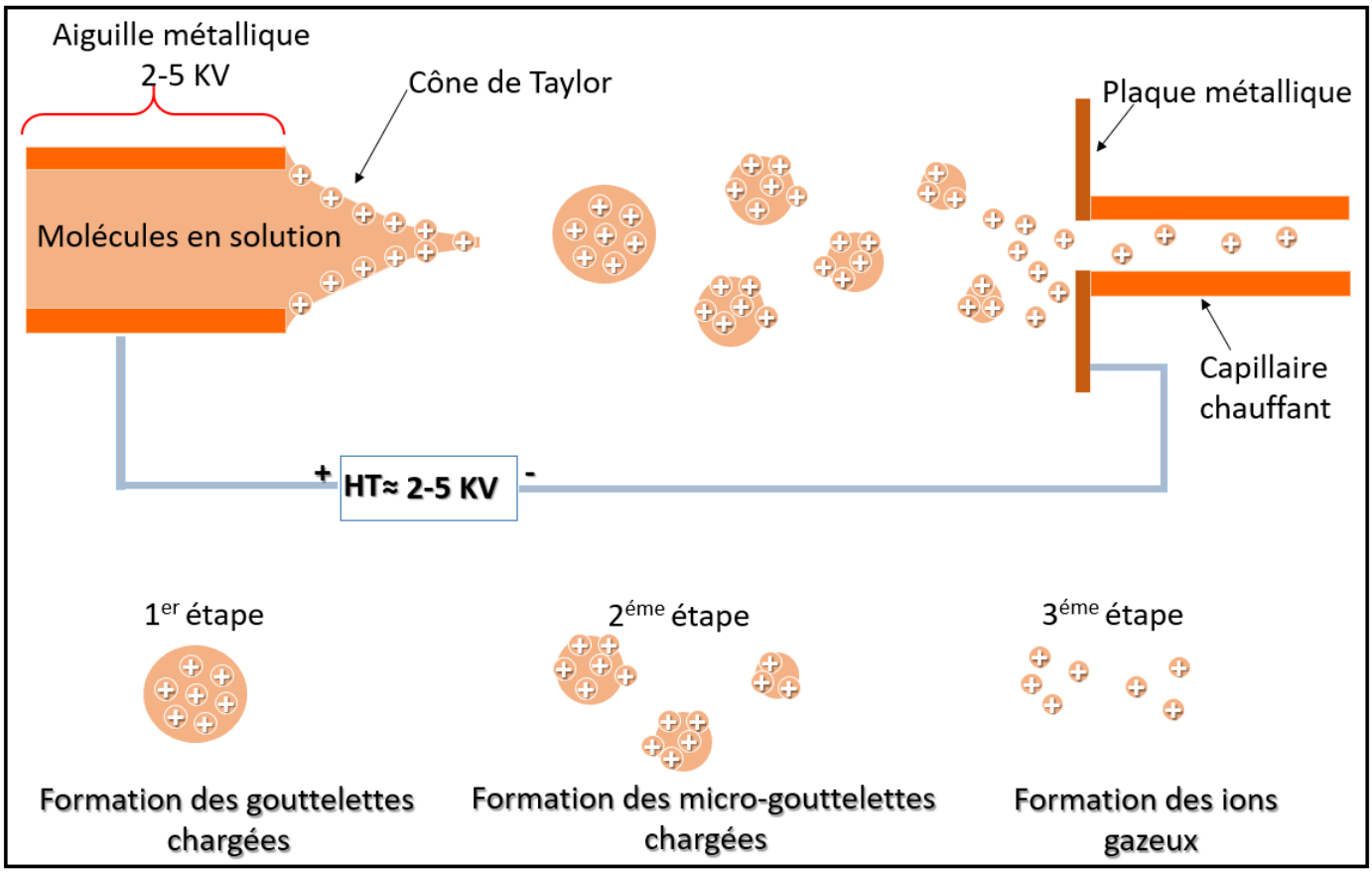


FIGURE 3.2 – Schéma du principe de la source électrospray ESI dans le cas d'ions chargés positivement

Dans cette technique, la molécule, généralement initialement en poudre, est diluée dans un mélange de solvants (eau et méthanol par exemple), et selon le groupement donneur ou accepteur de proton de l'ion moléculaire qu'on veut étudier, un ajout d'acide ou de base est bénéfique pour permettre la protonation ou la déprotonation des molécules dans la solution. Cette dernière est introduite dans une seringue dont le piston est poussé à un débit de l'ordre de quelques $\mu$L/min, et la solution est acheminée jusqu'à une aiguille métallique creuse. Celle-ci est placée à quelques millimètres d'un capillaire métallisé chauffant dont la température est située entre 30 et 300 °C, et dont le diamètre est de l'ordre de 0,5 mm, ce qui permet de limiter la conductance depuis la pression atmosphérique jusqu'à la première chambre à vide où la pression est de l'ordre de 1 mbar. Une différence de potentiel de l'ordre de quelques kV est appliquée entre l'aiguille et le capillaire, ce qui crée une nébulisation. La formation d'ions gazeux à partir de cette solution nébulisée se produit en trois étapes.

La première est la formation de gouttelettes chargées sous l'effet du fort champ électrique. En effet, au bout de l'aiguille, la résultante des forces exercées à la surface du liquide à cause de la présence de charges le fait se déformer jusqu'à prendre la forme d'un cône appelé 'cône de Taylor', et qui émet de façon continue des gouttelettes chargées [14] [15].

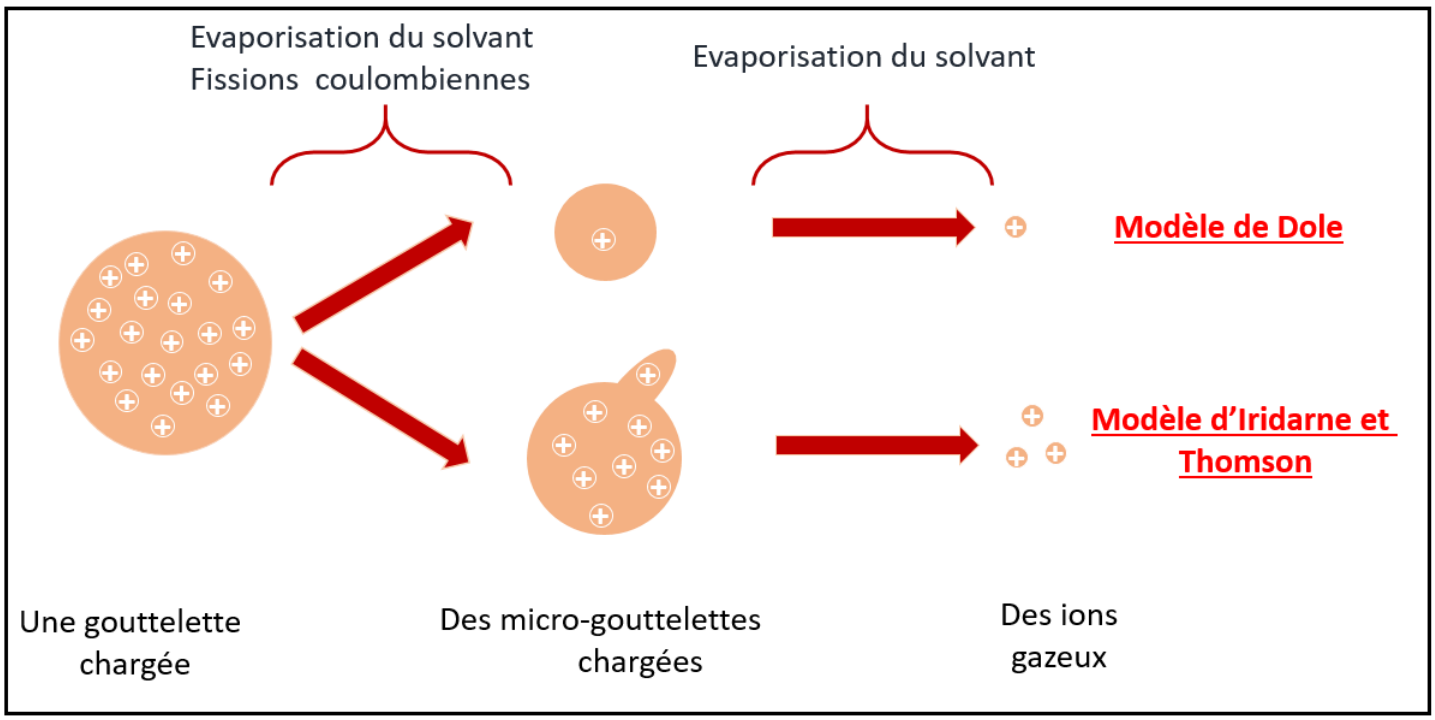


FIGURE 3.3 – Schéma représentant les deux modèles de l'obtention d'ions chargés en phase gazeuse à partir une gouttelette chargée. En haut, le modèle des résidus chargés par Dole et en bas, le modèle de l'évaporation ionique par Iribarne et Thomson.

La deuxième étape se produit par la formation de micro-gouttelettes chargées. L'évaporation du solvant rapproche les charges et augmente la répulsion coulombienne qui compense (limite de Rayleigh) et puis excède les forces de cohésion des gouttelettes. L'instabilité conduit à une explosion coulombienne qui entraîne la formation de micro-gouttelettes. La désolvatation est souvent accélérée par un gaz de séchage, par exemple de l'azote chaud.

Finalement, intervient la formation d'ions à l'état gazeux à partir des micro-gouttelettes. D'après la littérature, deux modèles ont été proposés :

- Le premier est le modèle de Dole [16], aussi appelé la théorie de la charge résiduelle, et qui explique ce processus par l'évaporation du solvant à partir de gouttelettes chargées extrêmement petites ne contenant qu'un seul ion, et qui libèrent leur ion à l'état gazeux après évaporation totale.
- Le second est le modèle d'Iribarne et Thomson, aussi appelé mécanisme d'évaporation de l'ion, c'est un processus de désorption d'ions à partir de gouttelettes de moyenne et petite taille mais d'état de charge très élevé [17].

Après avoir été formés, les ions en phase gazeuse doivent être guidés jusqu'à la zone de basse pression où ils seront étudiés.

### 3.1.2 Sélection et guidage d'ions

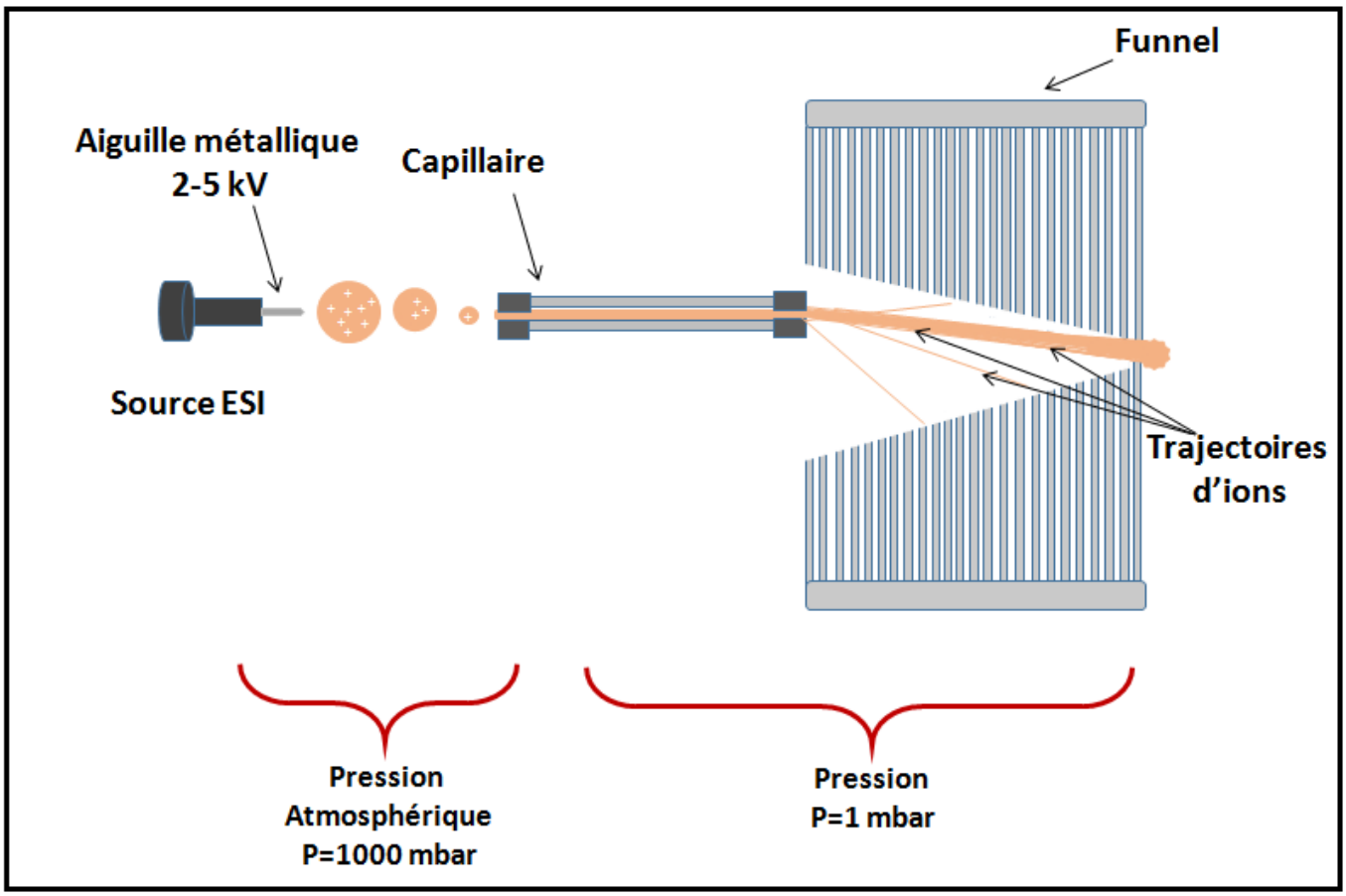


FIGURE 3.4 – Principe de la focalisation des ions dans le funnel à partir de la source électrospray ESI

Lors de la formation d'ions gazeux, un faisceau contenant de nombreuses espèces chargées mais aussi neutres entre dans la première chambre à vide. Il s'agit maintenant d'assurer la transmission des ions vers les chambres suivantes placées sous vide, et dont la pression décroît progressivement jusqu'à $10^{-6}$-$10^{-9}$ mbar. La présence d'un funnel permet de focaliser les ions en éliminant les espèces neutres (voir figure 3.4). Dans ce dispositif, les espèces neutres ne sont pas transmises grâce à la position décalée du capillaire de transfert par rapport à celle du funnel. Ce dernier est composé de plusieurs électrodes planes et parallèles dont le diamètre intérieur diminue, formant ainsi une sorte d'entonnoir. Ces électrodes sont soumises à des potentiels électriques tout au long du funnel oscillant en opposition de phase entre électrodes adjacentes et formant un champ électrique radial radio-fréquence permettant la focalisation des ions au niveau de l'axe central des électrodes. La mise en place d'un funnel nécessite que l'espacement entre deux électrodes soit inférieur à la moitié du rayon interne. Dans le cas inverse, cela entraînerait une situation de piégeage d'ions [18] [19].

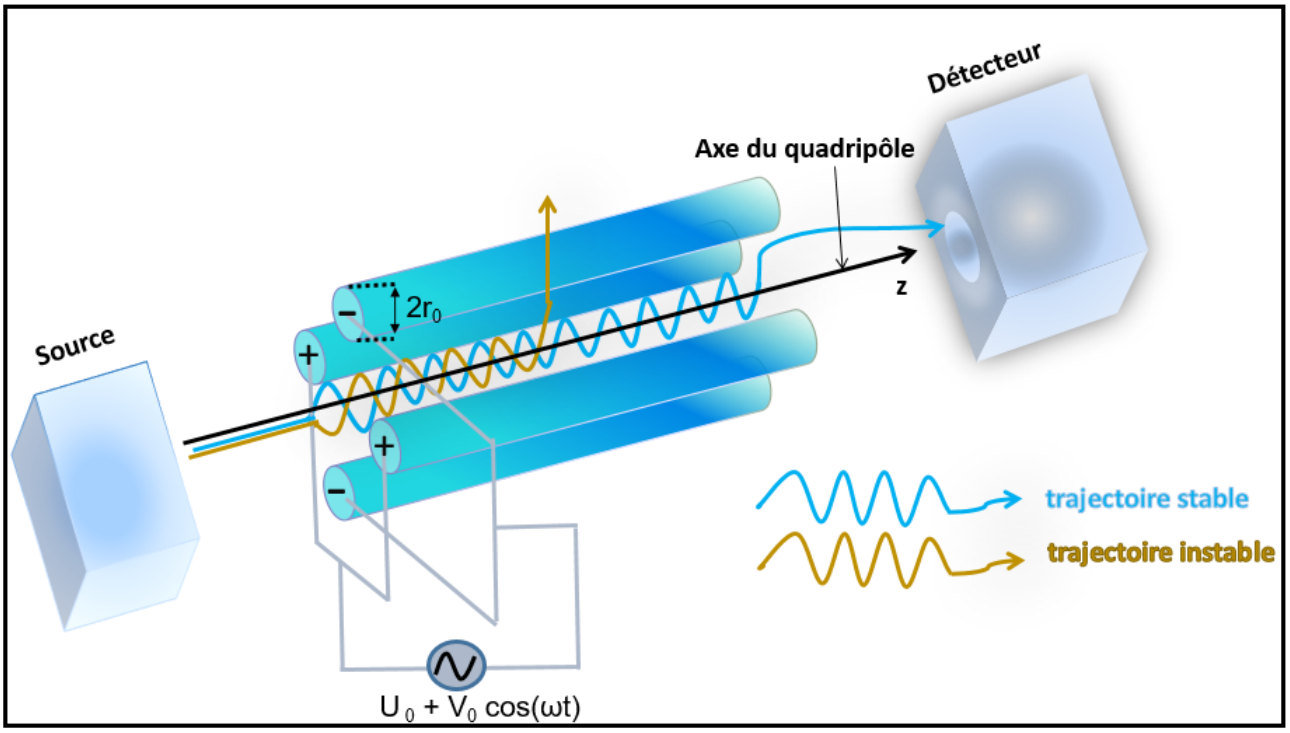


FIGURE 3.5 – schéma d'un quadripôle constitué de quatre barres centrées autour de l'axe z, et portées à un potentiel RF. Deux trajectoires d'ions stable et instable sont représentées

À la sortie du funnel, les ions sont souvent guidés à l'aide d'un multipôle constitué d'électrodes cylindriques portées à un potentiel électrique ayant une composante radio-fréquence de pulsation $\omega$, d'amplitude $V_0$ et une composante constante $U_0$. À la suite de la formation des ions dans la source, et de leur guidage jusqu'à la zone de vide secondaire, arrive souvent l'étape de tri des ions en fonction du rapport masse sur charge (m/z). Cette étape peut s'effectuer au moyen d'un analyseur en masse quadripolaire QMS (Quadrupole Mass Spectrometer). Ce dernier est formé de quatre tiges cylindriques en métal parallèles et disposées en carré autour d'un axe central <Oz> (voir la figure 3.5). Les deux paires de tiges opposées l'une à l'autre et espacées d'une distance $2r_0$, se trouvant dans les plans <xOz> et <yOz> , sont placées à des potentiels oscillant en opposition de phase, le potentiel quadripolaire créé s'écrit sous la forme :

$$\Phi(\vec{r},t) = \Phi_0(t)\frac{x^2-y^2}{2r_0^2} \tag{3.1}$$

avec

$$\Phi_0(t) = U_0 + V_0 cos(\omega t) \tag{3.2}$$

tel que $U_0$ est un potentiel statique et $V_0$ est l'amplitude du potentiel oscillant. Il est à noter que

le potentiel est indépendant de la coordonnée z, l'axe Oz étant l'axe des électrodes du filtre. La trajectoire d'un ion dans le plan x,y dépend également des variations du potentiel électrique $\Phi$ en fonction du temps via le terme $\Phi_0$ explicité dans l'équation 3.2. L'unique force s'appliquant sur les ions est donc la force électrostatique $\overrightarrow{F_e} = \mathrm{q}.\overrightarrow{E}$ avec $\overrightarrow{E}$ le champ électrique résultant du potentiel $\Phi$ et q la charge des ions. Ainsi l'équation du mouvement à résoudre devient :

$$\mathrm{m}\frac{\mathrm{d}^2\mathrm{u}}{\mathrm{dt}^2} = \mathrm{qE_u} \tag{3.3}$$

La variable u correspond aux variables x et y qui définissent la position de l'ion. Il est possible de déduire le champ électrique $\overrightarrow{E}$ à partir du potentiel électrostatique $\Phi$ :

$$\overrightarrow{E} = -\overrightarrow{\nabla}\Phi \tag{3.4}$$

$$\overrightarrow{E} = \begin{cases} E_x = -\dfrac{\partial\Phi}{\partial x} = -\Phi_0.\dfrac{x}{r_0^2} \\ E_y = -\dfrac{\partial\Phi}{\partial y} = \Phi_0.\dfrac{y}{r_0^2} \\ E_z = 0 \end{cases} \tag{3.5}$$

En posant les changements de variables suivants, avec $\mathrm{a_u}$ et $\mathrm{q_u}$ les coefficients de Mathieu :

$$u = x, y \;\;;\;\; a_x = -a_y = \frac{4qU_0}{m\omega^2 r_0^2} \;\;;\;\; \tau = \frac{\omega t}{2} \;\;;\;\; q_x = -q_y = \frac{2qV_0}{m\omega^2 r_0^2} \;\;;\;\; \frac{a_u}{q_u} = \frac{2U_0}{V_0} \tag{3.6}$$

Il est possible de calculer la trajectoire des ions dans dans le plan xy du filtre régie par l'équation de Mathieu [20] :

$$\frac{d^2u}{d\tau^2} + (a_u + 2q_u cos(2\tau))u = 0 \tag{3.7}$$

Le potentiel électrique qui règne entre les électrodes est donc une combinaison d'une tension continue $U_0$ et d'une tension radio-fréquence $V_0\ cos(\omega\mathrm{t})$. Si un ion positif localisé au centre des barres du quadripôle se rapproche d'une tige positive, il subira une augmentation de son énergie potentielle. À l'inverse, lorsque l'ion est près d'une barre négative, l'énergie potentielle diminuera. La direction du champ électrique s'inverse de manière périodique grâce à l'oscillation du potentiel RF. C'est pour cela que les ions sont alternativement focalisés et dispersés le long de l'axe z.

L'équation de Mathieu admet deux types de solutions : l'une correspond à une trajectoire stable pour laquelle l'amplitude de l'ion dans le plan xy est faible et lui permet de traverser les quatre barres, l'autre consiste en une trajectoire instable pour laquelle l'amplitude des oscillations de l'ion augmente et il est éjecté. Ces trajectoires dépendent entièrement du couple ($a_u$,$q_u$), représenté par le

diagramme de stabilité (voir la figure 3.6). Il existe plusieurs zones de stabilité selon les axes x et y (voir la figure 3.6) qui correspondent à l'intersection de ces zones ; ce sont ces trajectoires qui nous intéressent. En résolvant l'équation de Mathieu pour les axes x et y, il est possible de trouver des trajectoires stables pour chaque axe indépendamment. Néanmoins, pour que l'ion traverse le filtre en masse quadripolaire, il est nécessaire que sa trajectoire soit stable selon x et y. La région de stabilité dans le plan (xOy) (région entourée en vert) est la région utilisée pour le fonctionnement d'un QMS puisque c'est la zone pour laquelle les tensions $U_0$ et $V_0$ sont les plus faibles. Mathématiquement, ces solutions dépendent de la valeur des coefficients $a_u$ et $q_u$ (équation 3.6) et plus particulièrement des valeurs des tensions $U_0$ et $V_0$ puisque c'est le seul terme propre à chaque coefficient. Grâce à l'équation 3.6, il est possible de passer du diagramme dans l'espace ($a_u$ ; $q_u$) à l'espace des tensions ($U_0$,$V_0$). En fixant $U_0$ et $V_0$, seuls les ions possédant un certain rapport masse sur charge m/z ont une trajectoire stable et sont guidés le long du filtre de masse. Les autres ions dont la trajectoire est instable sont éjectés et n'atteignent pas le détecteur. Un analyseur de masse quadripolaire scanne un intervalle de masses en faisant varier les potentiels $U_0$ et $V_0$ entraînant celle du mouvement des ions tout en conservant un rapport $\frac{U_0}{V_0}$ constant. Lorsque la composante statique $U_0$ du champ est nulle, le QMS laisse passer tous les ions à un rapport m/z donné à la valeur fixé par $V_0$ tel que $q_u \leq 0{,}9$ et se comporte comme un guide d'ions.

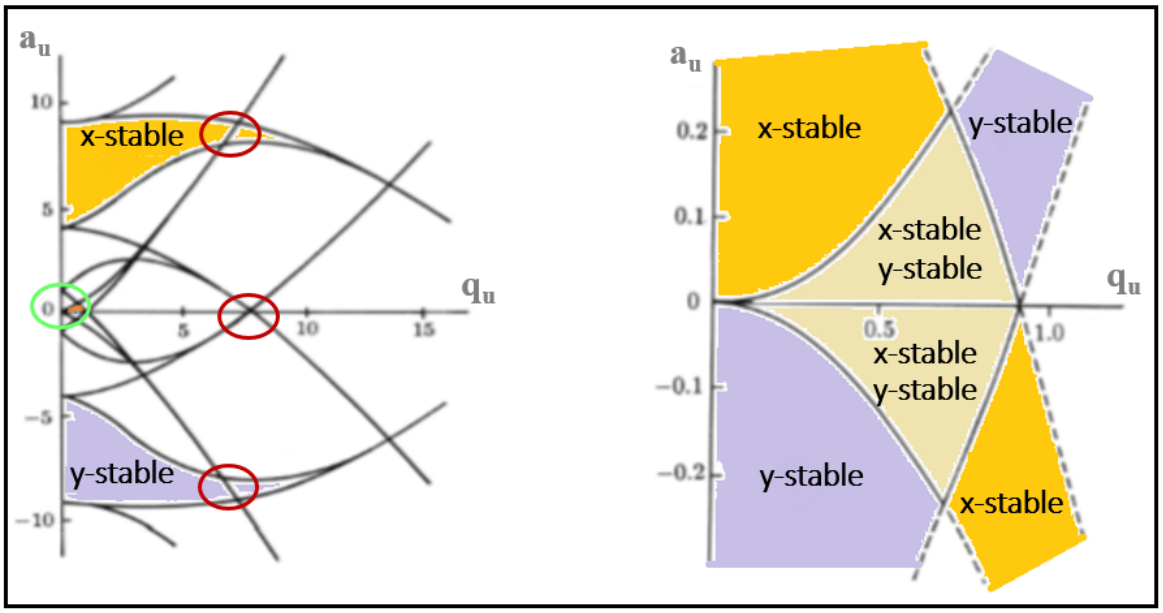


FIGURE 3.6 – Différents régions du diagramme de stabilité des trajectoires dans l'espace ($a_u$,$q_u$). Les régions entourées en rouge représentent les couples ($a_u$,$q_u$) dont la trajectoire des ions est stable dans le champ quadripolaire et un QMS fonctionne dans la région entouré en vert.

### 3.1.3 Piégeage des ions

Après la sélection de l'ion moléculaire d'intérêt dans le QMS, on peut vouloir ajouter une étape de piégeage permettant d'accumuler et regrouper les ions afin d'avoir une plus forte densité. Le piège à ions est apparu suite au brevet de Wolfgang Paul et Helmut Steinwedel en 1960 [21]. Cet instrument offre la possibilité de confiner des particules chargées dans un volume et pendant une durée bien déterminés. A partir des années 1950, les premiers pièges à ions ont été introduits par Dehmelt et Paul, qui ont été récompensés d'un prix Nobel de physique en 1989 pour leurs travaux (développement de la technique de piège à ions). L'objectif des travaux de Dehmelt était de piéger des électrons isolés et au repos [22] alors que Paul voulait mettre au point un séparateur de masse [23]. Le piège de Paul est fait d'une électrode annulaire et de deux électrodes couvercles ou chapeaux de forme hyperbolique, dont l'une sert à l'injection et l'autre à l'extraction des ions (voir la figure 3.7). La relation entre le rayon r de l'électrode annulaire et la distance z entre le centre du piège et l'électrode couvercle doit être égale à $r^2 = 2z^2$ afin d'avoir un champ quadripolaire sur les différents points du piège. Un potentiel $U + V\cos(\omega t)$ appliqué sur l'électrode annulaire et un potentiel $U$ sur les deux électrodes couvercles créent un champ quadripolaire.

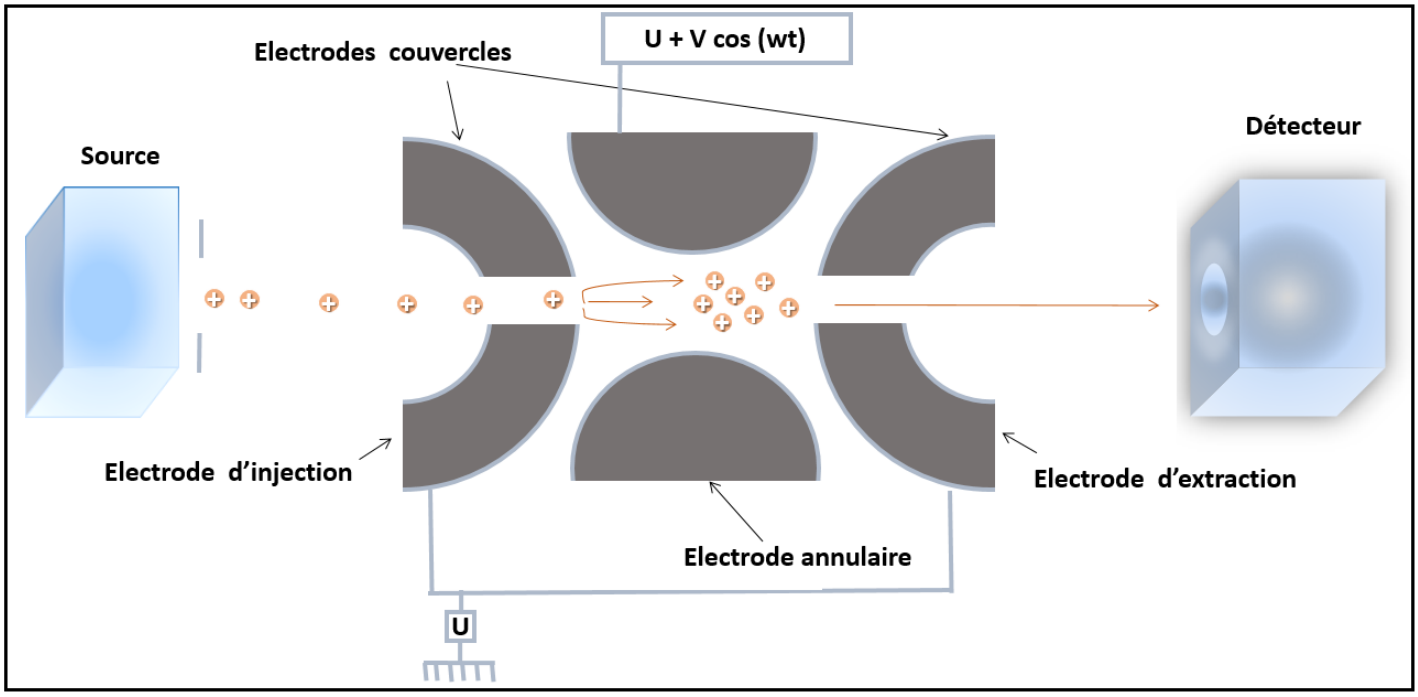


FIGURE 3.7 – Principe de fonctionnement d'un piège de Paul

L'emploi d'un potentiel sinusoïdal permet de piéger les ions dans le champ quadripolaire en choisissant d'une façon bien déterminée les valeurs de $V$ et $\omega$. Les ions sont généralement injectés dans le centre du piège à travers un trou au centre de la première électrode couvercle, permettant

d'accumuler et de former des paquets d'ions de quelques $mm^3$ . L'injection d'un gaz d'hélium est nécessaire dans le centre du piège pour réduire la vitesse des ions et maximiser le nombre d'ions piégés. Plus tard, Prestage et al. ont décrit en 1989 l'utilisation d'un piège quadripolaire linéaire dans lequel le champ RF est uniquement sur deux directions, l'utilisation d'un champ statique permettant le confinement dans la troisième direction [24]. Ce piège a pour avantage d'avoir une direction selon laquelle les ions ne sont pas soumis au champ RF, ce qui permet d'accumuler une quantité d'ions plus grande que dans un piège de Paul. Il existe plusieurs autres types de pièges à ions et parmi eux, le piège linéaire (Piège 2D) [25] qui est fait à partir d'un quadripôle. Ce dernier a été décrit dans la partie précédente. Des tensions continues sont appliquées à deux électrodes situées aux extrémités du quadripôle pour empêcher les ions de sortir, ce qui entraîne que les ions sont piégés suivant l'axe du quadripôle. Par rapport au piège 3D, l'intérêt principal de ce piège est sa grande capacité de stockage, une meilleure efficacité de piégeage et une diminution de la charge d'espace [26] [27] [28].

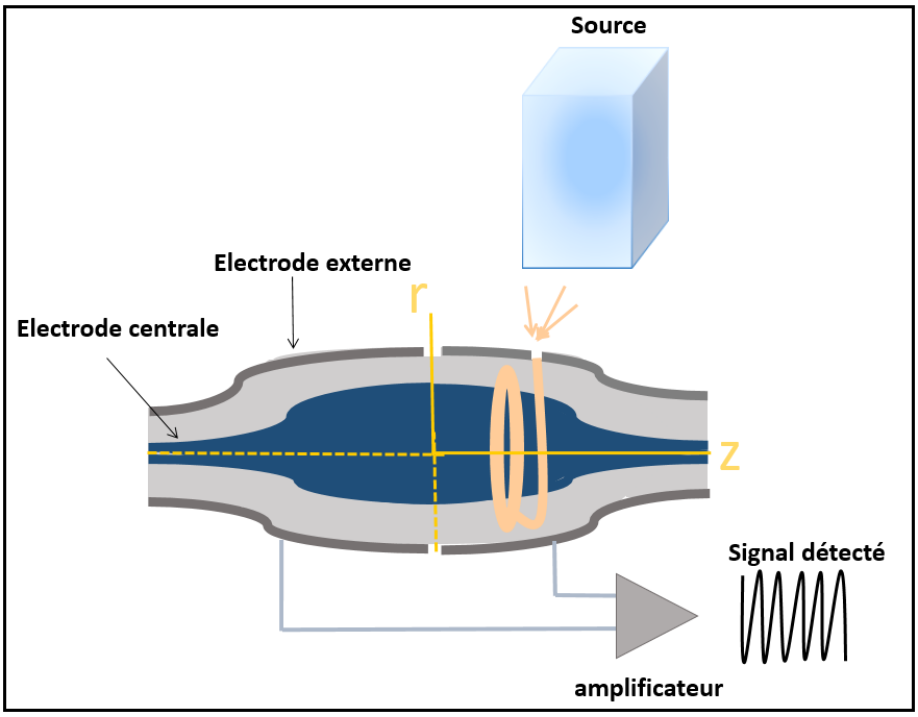


FIGURE 3.8 – Schéma représentant le principe d'un piège Orbitrap, r et z sont les coordonnées cylindriques

Le piégeage est aussi possible avec un piège appelé "orbitrap", et qui fut décrit par Makarov dans un brevet en 1999 [29]. Ce piège est formé d'une électrode centrale interne métallique en forme de fuseau entourée d'une électrode externe (voir la figure 3.8). Ces deux électrodes sont soumises à des tensions continues, et grâce à leur géométrie, le champ électrostatique créé permet de piéger les ions. Pour observer une trajectoire stable, le mouvement des ions doit être elliptique autour de l'électrode centrale et sinusoïdal de pulsation $\omega$ suivant l'axe z. Le rapport m/z des ions moléculaires est lié à

la fréquence de ces oscillations qui ne dépend ni de leur vitesse ni de leur énergie selon l'équation :

$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m/z}} \tag{3.8}$$

avec k une constante géométrique du piège. Ce mouvement sinusoïdal des ions crée un courant induit entre les deux moitiés de l'électrode externe, ce qui permet de mesurer un signal, et après amplification et transformée de Fourier, d'en déduire les différentes fréquences et donc le rapport m/z.

## 3.2 La détection

Il existe plusieurs sortes de détecteurs d'ions se servant de multiples mécanismes mais ayant la même fonction : convertir le courant d'ions en signal électrique. Parmi ces détecteurs, le plus simple est la cage de Faraday, composée d'une boîte métallique conductrice, dans laquelle les ions sont dirigés. Les ions traversent une fente d'entrée et frappent le fond qui est relié à la masse via un ampèremètre. Le courant induit dans l'ampèremètre est alors égal au courant d'ions. Cependant, cette méthode n'est applicable que pour des courants supérieurs au pA.

Par ailleurs, d'autres méthodes de détection des ions sont possibles, par exemple, le channeltron. C'est un tube dont la section décroît progressivement de l'entrée des ions vers la sortie du paquet d'électrons. La surface d'entrée des ions positifs peut être soumise à un potentiel négatif et la surface de sortie soumise à un potentiel moins négatif. L'impact de l'ion primaire va engendrer l'émission d'électrons. La différence de potentiel appliquée entre l'entrée et la sortie du channeltron guide et accélère ces électrons en les faisant rentrer dans le canal. Ces électrons frappent les parois et entraînent l'émission d'électrons secondaires. Cet événement se répète plusieurs fois et nous pouvons avoir une amplification (du nombre d'électrons) allant jusqu'à $10^8$. Ce type de détecteur possède une forte amplification : l'efficacité de détection est donc meilleure que celle d'une cage de Faraday.

La plupart des montages expérimentaux de spectrométrie de masse, y compris ceux que nous avons utilisés pour nos expériences, possèdent un détecteur avec des galettes à micro-canaux (en anglais Micro-Channel Plate, MCP). Ce détecteur est apparu dans les années 1970, composé d'une galette en matériau semi-conducteur mise sous vide, et avec une différence de potentiel de l'ordre de 1 kV appliquée entre ses faces d'entrée et de sortie. Cette galette contient de nombreux multiplicateurs tubulaires appelés "micro-canaux", ayant pour fonction la multiplication d'électrons (voir la figure 3.9). En effet, quand un ion passe dans un micro-canal et frappe la paroi, cela entraîne la création d'un ou plusieurs électrons qui vont être accélérés suite à la tension de polarisation. Ces électrons vont toucher la paroi et créer d'autres électrons secondaires. Ce phénomène de cascade se répète

plusieurs fois et produit une amplification du signal entraînant un gain de l'ordre de $10^4$ [30].
Il existe aussi un autre type de détecteur permettant de détecter les ions positifs et négatifs, ce type de détecteur présentant une meilleure efficacité de détection. Son principe consiste à convertir en photons les électrons produits par une galette à micro-canaux via un cristal scintillateur (un disque composé de polymère, recouvert d'une pellicule métallique). Les photons émis par le scintillateur atteignent un photo-multiplicateur et donnent naissance à de nouveaux électrons via un jeu de dynodes. Ce type de détecteur améliore l'efficacité de détection jusqu'à un facteur de 2,5.

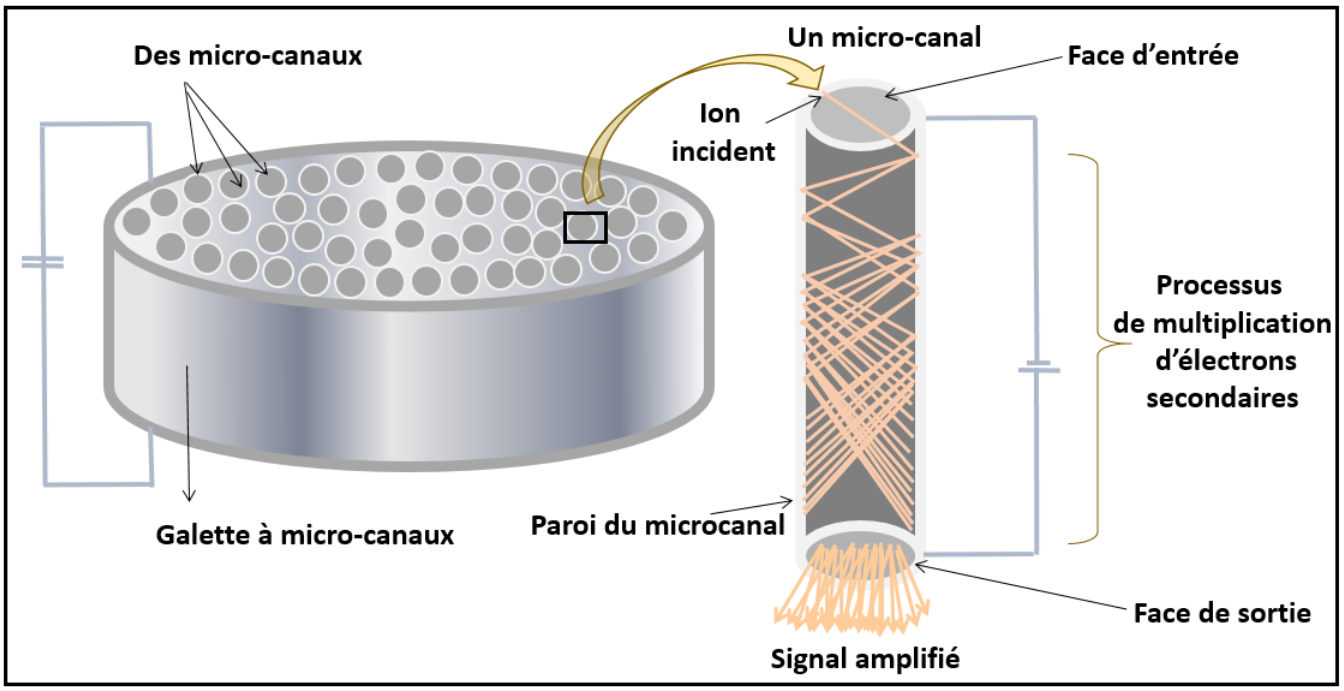


FIGURE 3.9 – Schéma représentant une galette à micro-canaux et son principe de fonctionnement.

Une autre type de détection est la détection par courant induit. C'est un mode de détection bien adapté à des ions dont le rapport m/z est obtenu à partir de la mesure de fréquence des mouvements périodiques dans les analyseurs de type FT-ICR (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometer) ou dans un champ électrique particulier Orbitrap. Le principe physique de cette détection s'appuie sur les effets électriques induits dans un conducteur métallique lorsqu'une particule chargée s'approche de la surface de deux plaques métalliques parallèles. En effet, le mouvement cohérent de rotation et d'oscillation subi par les ions entraîne un courant électrique mesurable sur les deux plaques de détection. Le courant induit par ces oscillations permet par une transformée de Fourier d'accéder aux $m/z$.

## 3.3 Techniques expérimentales d'analyse

L'objectif de cette partie du chapitre est de présenter les techniques expérimentales d'analyse utilisées lors de cette thèse. Dans un premier temps, nous parlerons de la spectrométrie de masse, qui permet principalement de séparer des ions moléculaires selon leur rapport masse-sur-charge ($m/z$), puis nous aborderons la spectrométrie de mobilité ionique qui est une technique d'analyse de la structure géométrique des systèmes moléculaires.

### 3.3.1 Spectrométrie de masse à temps de vol

La spectrométrie de masse à temps de vol (en anglais TOF : Time Of Flight) est une technique dont le principe repose sur la mesure du temps de vol des ions après accélération par un champ électrique. Un spectromètre TOF peut fonctionner selon deux modes différents : le mode linéaire et le mode réflectron. En ce qui concerne le mode linéaire, les ions traversent deux régions : la première est une zone d'accélération dans laquelle est appliquée un champ électrique (voir la figure 3.10). La seconde est définie par une région sans champ appelée zone de vol libre, et limitée par deux grilles : une première présente à l'entrée de la zone et une deuxième placée devant le détecteur. Dans la zone d'accélération, un ion de masse m, de charge z et de vitesse initiale nulle possède une énergie totale :

$$E_T = E_c + E_P \tag{3.9}$$

telles que $E_T$ est l'énergie totale ; $E_C$ est l'énergie cinétique et $E_P$ est l'énergie potentielle de l'ion. En sortant de l'espace d'accélération, l'énergie potentielle est transformée en énergie cinétique :

$$E_c = \frac{m\nu^2}{2} \simeq zeV \quad ; \quad \nu \simeq \sqrt{\frac{2zeV}{m}} \tag{3.10}$$

avec $V$ qui est le potentiel électrique accélérateur et z la charge de l'ion. On a une stricte égalité si $E_{c0}$ est nulle à t=0.

L'ion suit un mouvement rectiligne uniforme tout au long de la zone de vol libre de longueur L pendant un temps donné correspondant à :

$$t \simeq \frac{L}{\nu} \tag{3.11}$$

En remplaçant $\nu \simeq \sqrt{\frac{2zeV}{m}}$ dans l'équation 3.11, on obtient :

$$t \simeq L\sqrt{\frac{m}{2zeV}} \simeq \alpha\sqrt{\frac{m}{z}} \tag{3.12}$$

Par conséquent, les ions de rapport $m/z$ plus faible vont mettre moins de temps à parcourir la zone du vol libre que les ions dont le rapport $m/z$ est plus élevé. Si l'on mesure le temps d'arrivée des ions sur un détecteur situé après la zone de vol libre, on peut ainsi remonter au rapport $m/z$ des espèces ioniques présentes. La résolution en mode linéaire permet d'analyser des macromolécules de très haute masse mais généralement sans résolution isotopique dépendant de la charge du système moléculaire. La résolution du TOF en mode linéaire est réduite car des ions qui ont le même rapport masse sur charge $m/z$ mais des énergies cinétiques initiales différentes n'arriveront pas en même temps sur le détecteur.

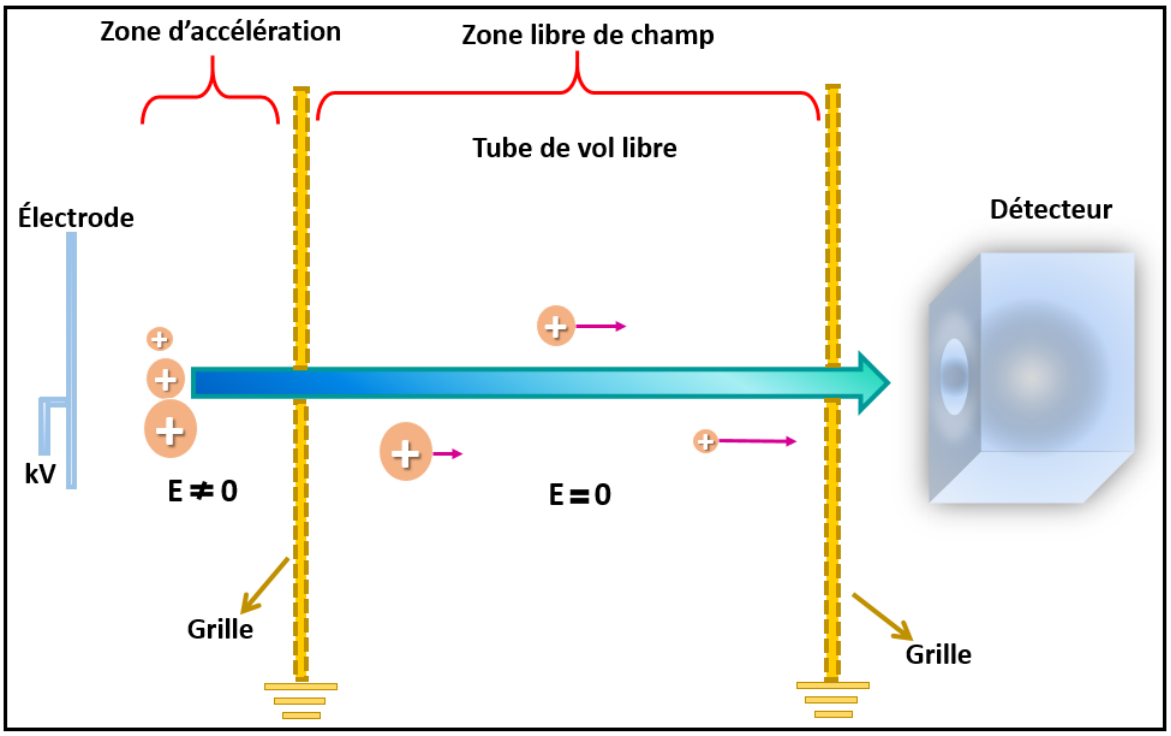


FIGURE 3.10 – Principe de séparation des ions dans un spectromètre de masse à temps de vol linéaire

Dans le but d'améliorer la résolution en masse du spectromètre à temps de vol, un miroir électrostatique dit "réflectron" peut être ajouté au mode linéaire (voir la figure 3.11). Ce réflectron est composé d'électrodes plates portées à un potentiel constant pour créer un champ électrique qui a pour but de jouer le rôle d'un miroir ionique. En effet, suite à leur parcours dans le tube de vol libre, les ions vont entrer dans le miroir ionique et vont être ralentis, puis réfléchis et ensuite accélérés

vers un détecteur. Cela permet une prolongation du temps de vol tout en diminuant la dispersion en énergie des ions ayant un rapport $m/z$ identique. Si nous considérons par exemple trois ions du même rapport masse sur charge $m/z$ mais d'énergies cinétiques initiales différentes, alors l'ion possédant l'énergie cinétique la plus élevée passera moins de temps dans les régions libres de champs mais plus de temps dans le réflectron puisque la réflexion se produit plus profondément dans ce dernier. Inversement, l'ion ayant l'énergie la moins élevée passera plus de temps dans les zones sans champ et moins dans le réflectron, ce qui conduira si les tensions sont bien réglées au même temps de vol total quelle que soit l'énergie cinétique initiale de l'ion. Par conséquent, le pic correspondant à ce rapport $m/z$ dans le spectre de temps de vol en mode réflectron présente une résolution plus grande (une résolution en masse de l'ordre de $10^4$-$10^5$ comparé au mode linéaire qui est de l'ordre de $10^3$-$10^4$). L'utilisation de la spectrométrie de masse à temps de vol en mode réflectron peut donc permettre de distinguer les isotopes des ions moléculaires monochargés de quelques dizaines de kDa.

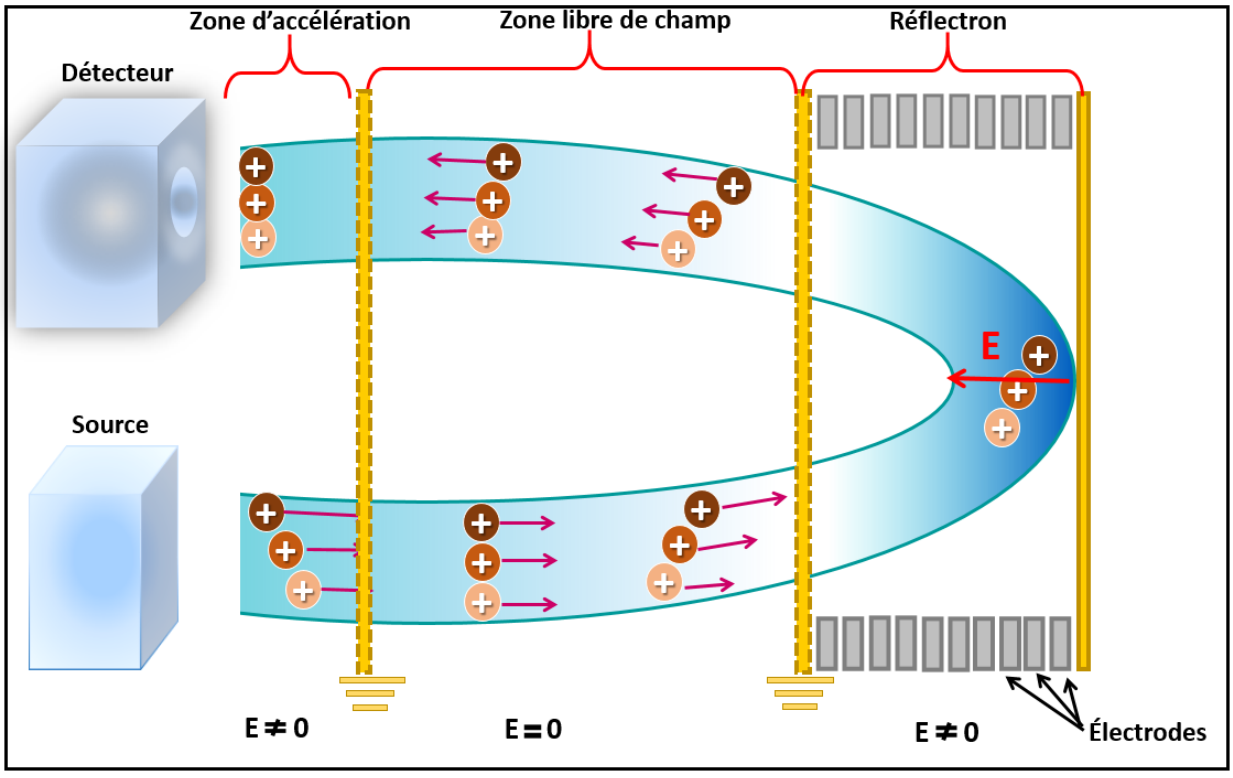


FIGURE 3.11 – Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse à temps de vol de type réflectron (miroir électrostatique)

### 3.3.2 Spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique

La spectrométrie de masse par résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier (en anglais Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry FT-ICR MS), est une technique présentant l'avantage d'avoir la plus grande résolution en masse disponible à ce jour (de l'ordre

de $\frac{m}{\Delta m} = 10^6$). C'est en 1974 que le brevet de cette invention fut déposé par Comisarow et Marshall [31] d'après les travaux de Lawrence et Livingston datant de 1932 [32] afin d'analyser les processus nucléaires en piégeant les ions atomiques. Son principe de fonctionnement consiste à piéger des ions en les faisant tourner autour d'un champ magnétique selon un mouvement cyclotronique. C'est la force de Lorentz qui s'exerce sur un ion ayant une vitesse initiale $V_0$ dans un champ magnétique uniforme qui est responsable de ce mouvement. Afin d'obtenir une meilleure résolution, la mesure du signal doit être relativement longue (plusieurs dizaines de secondes) puisque les ions peuvent résider dans la cellule ICR (Pression $10^{-10}$-$10^{-11}$ bar). Les caractéristiques de ce mouvement cyclotronique sont indépendantes de la vitesse $V_0$ de l'ion mais dépendantes de son rapport $m/z$ ainsi que du champ magnétique. Sa fréquence cyclotronique est définie par :

$$f_c = \frac{zB}{2\pi m} \tag{3.13}$$

avec B : l'intensité du champ magnétique. Cela offre la possibilité de distinguer les ions selon leur rapport $m/z$ en les faisant tourner dans une cellule ICR appelée aussi piège de Penning, une cellule cylindrique sous vide au sein d'un aimant supra-conducteur, par l'association d'un champ magnétique et d'un champ électrique qui les piègent d'une manière radiale et axiale, respectivement (voir la figure 3.12). Cette cellule est constituée de six plaques symétriques formant un cube dont deux plaques de piégeage, deux plaques d'excitation et deux plaques de détection. L'étape de détection réalisée par deux plaques réceptrices (voir la partie 3.2) consiste à enregistrer le courant induit par le mouvement cyclotronique périodique des ions en fonction du temps. Les ions suivent un mouvement oscillatoire périodique dû à la présence des deux plaques de piégeage placées perpendiculairement au champ magnétique afin de créer un puits de potentiel électrique permettant de confiner les ions au centre de la cellule suivant l'axe du champ magnétique. Le champ électrique ne peut pas être parfaitement homogène et parallèle au champ magnétique, ce qui créé une composante radiale du champ électrique, et induit un troisième mouvement appelé mouvement magnétron. Ce mouvement entraîne une affaiblissement de la fréquence cyclotronique. Les ions présents au centre de la cellule ont une orbite de rayon faible et des moments et des énergies cinétiques différents. Dans le but de piéger ces derniers et pour qu'ils aient un mouvement en phase avec une même orbite, un champ électrique radio-fréquence impulsionnel est appliqué à deux plaques d'excitation et induit une excitation des ions (voir la figure 3.12). Cette excitation permet aux ions d'augmenter le rayon de l'orbite. Ces ions vont être excités séparément et en paquet et ne pouvant être excités qu'à une fréquence égale à leur fréquence cyclotronique. Les autres ions ayant un rapport $m/z$ et des fréquences cyclotronique différentes de la fréquence d'excitation vont être maintenus au milieu du piège. Le rayon cyclotronique

est indépendant du rapport $m/z$ et de la vitesse initiale de l'ion. Il peut être calculé à partir de la formule ci-dessous [33] :

$$r = \frac{(V_p T_e)}{2dB} \tag{3.14}$$

tel que $V_p$ est la tension entre les deux plaques ; $T_e$ est la durée de l'excitation ; $d$ : la distance entre les deux plaques et $B$ est le champ magnétique appliqué.

Finalement, en appliquant une transformée de Fourier, Le signal est tracé en fonction de la fréquence, et il peut être converti en un spectre de masse grâce à la formule 3.13 [34].

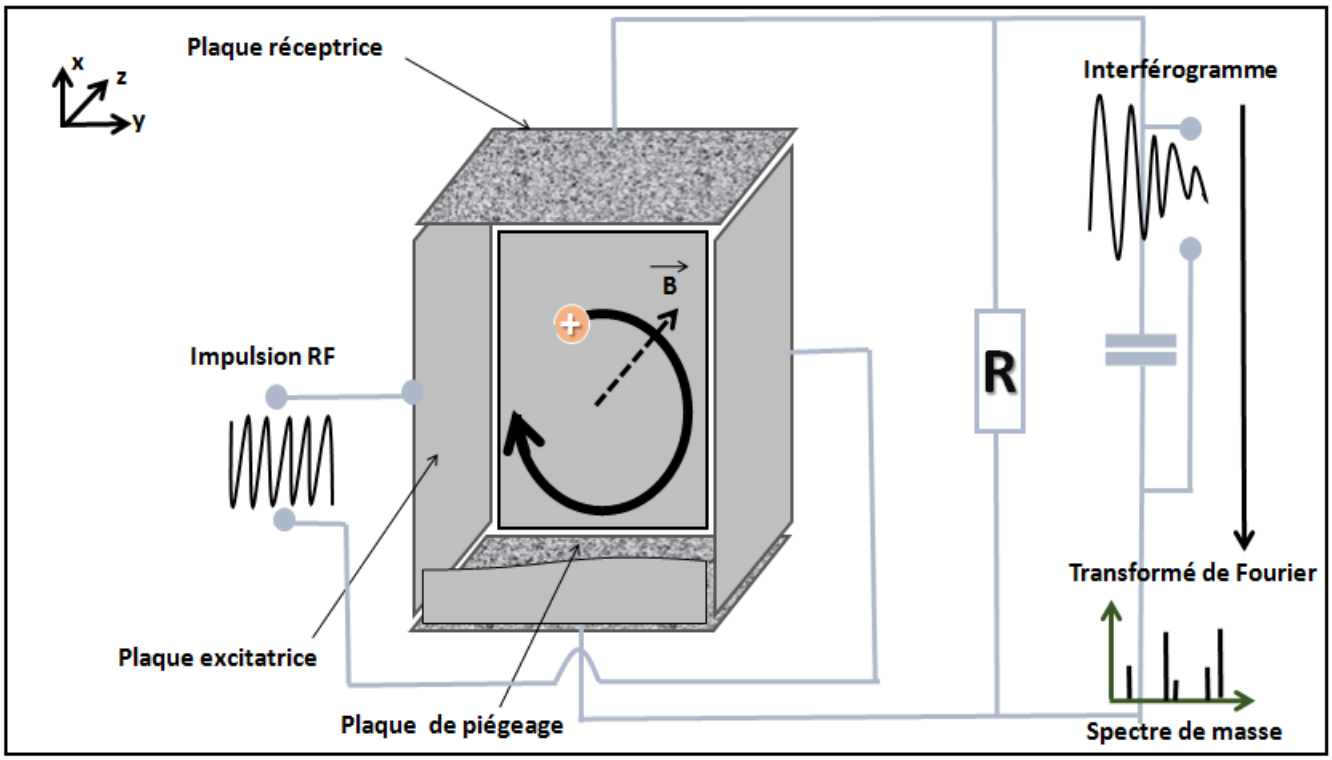


FIGURE 3.12 – Schéma représentant le principe de fonctionnement de la spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique et transformée de Fourier

### 3.3.3 Spectrométrie de mobilité ionique

Le principe initial de la spectrométrie de mobilité ionique réside dans l'influence de la structure géométrique (conformation) et de la charge d'un ion moléculaire en phase gazeuse sur sa vitesse lorsqu'il se déplace dans un gaz sous l'effet d'un champ électrique homogène et constant. En effet, le tube de mobilité ionique est constitué d'une série d'électrodes portées à des tensions constantes et il contient un gaz tampon inerte (généralement : $N_2$ ou He) à une pression constante de l'ordre de 10 mbar (voir la figure 3.13). Les ions seront ralentis par les collisions avec le gaz, d'autant plus que le nombre de ces collisions sera grand. Ces ions vont alors parcourir le tube à une vitesse appelée

"vitesse de dérive" proportionnelle à l'intensité du champ électrique $E$ et constante si $E$ est suffisamment faible. On a alors :

$$\nu_d = KE \tag{3.15}$$

où le coefficient de proportionnalité K est appelé "mobilité ionique".

La mobilité ionique est liée à la section efficace de collision de l'ion moléculaire sur le gaz. La section efficace de collision CCS (en anglais : Collision Cross-Section) est une grandeur relative au gaz tampon, à la charge et à la géométrie de l'ion étudié. Par conséquent, la mesure de la CCS permet d'obtenir des informations sur la structure intrinsèque des systèmes moléculaires en phase gazeuse. Une relation entre la mobilité ionique et la section efficace de collision est l'équation donnée par Revercomb et Mason [35]. Cette relation est valable si la masse de l'ion étudié de charge z et de masse M est très supérieure à la masse du gaz tampon :

$$K = \frac{3}{16}\frac{ze}{N}(\frac{1}{m} + \frac{1}{M})^{\frac{1}{2}}(\frac{2\pi}{k_B T})^{\frac{1}{2}}\frac{1}{\Omega} \tag{3.16}$$

avec N la densité du gaz, $k_B$ la constante de Boltzmann, T la température du gaz et $\Omega$ la section efficace de collision des ions.

Le temps de dérive est inversement proportionnel à K, d'après l'équation suivante :

$$t_D = \frac{L}{\nu_d} = \frac{L}{KE} \tag{3.17}$$

où L est la longueur du tube.

La mesure du temps de dérive permet d'obtenir K et donc $\Omega$. Si nous considérons par exemple deux ions dans un tube de mobilité ayant un même rapport $m/z$, mais de conformations différentes, plus la structure sera dépliée, plus sa section efficace de collision sera importante, plus l'ion subira de collisions, plus sa vitesse de dérive sera faible. Le réglage du débit de gaz tampon permet de contrôler la pression du gaz dans la cellule de mobilité ionique. En effet, dans le cas où le débit de gaz est trop faible, cela ne provoquera pas une séparation des ions à cause de la faible fréquence des collisions entre les ions et les molécules de gaz. En revanche, si le débit de gaz est trop important, cela va augmenter le temps de dérive des ions. De plus, si l'on veut obtenir des informations sur la géométrie de l'ion, on peut comparer la section efficace expérimentale avec une section efficace calculée avec des simulations que nous allons détailler par la suite dans la partie 5.2. La spectrométrie de mobilité ionique a été couplée avec la spectrométrie de masse et le premier développement basé sur ce couplage a été développé par McDaniel [36] [37], mis au point en 1962 et sa première commercialisation eut

lieu en 1970 [38].

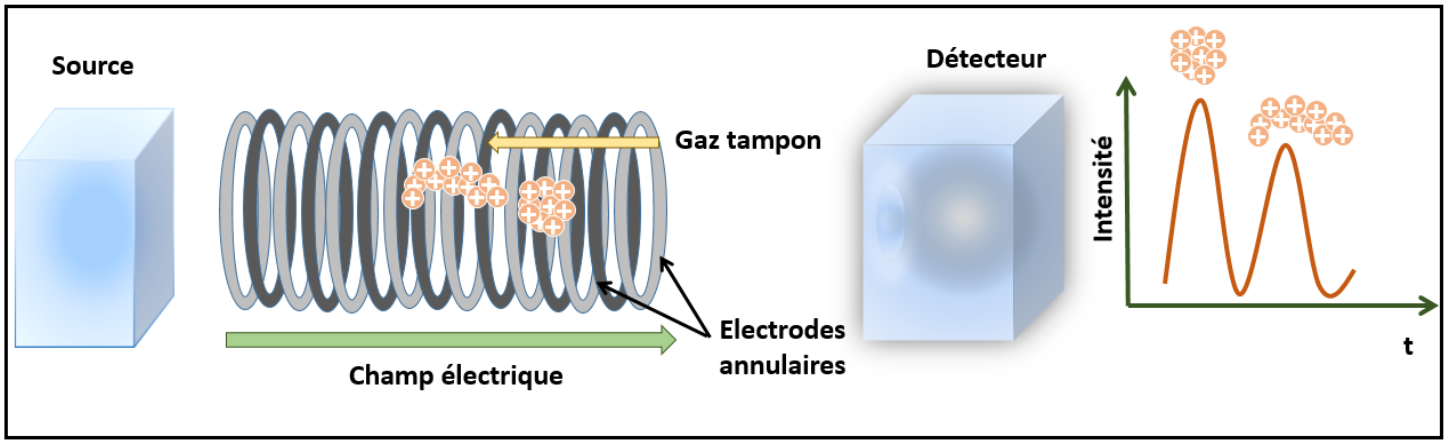


FIGURE 3.13 – Schéma représentant le principe de la séparation des ions dans une cellule de mobilité ionique du type "tube de dérive"

## 3.4 Activation des systèmes moléculaires

Après la mise en phase gazeuse, et la sélection selon le rapport m/z des ions moléculaires, on trouve plusieurs méthodes permettant de les activer d'une façon contrôlée. Tout d'abord, si on veut définir le verbe activer, cela signifie qu'une espèce moléculaire initialement dans son état stable, est soumise à un élément perturbateur, entraînant une transition vers un état excité grâce à une augmentation de son énergie interne. Différentes techniques d'activation existent et les processus de fragmentation des ions peuvent dépendre de la méthode employée : le mode le plus fréquemment utilisé est la méthode de fragmentation de l'ion par dissociation induite par collision (CID) mise en place dans la plupart des spectromètres de masse. D'autres techniques de fragmentation sont dues à des processus d'activation chimique : tout d'abord, la dissociation par détachement d'électron qui s'applique sur les ions multichargés négatifs ; ensuite, les fragmentations liées au transfert d'électron (ETD) et à la capture d'électron (ECD) qui peuvent être effectuées pour les ions multi-protonés. Toutes ces techniques seront présentées de manière détaillée dans cette partie.

### 3.4.1 Activation par collision avec un gaz

Nous allons tout d'abord décrire le mode d'activation par collision avec un gaz rare ou inerte. C'est la méthode la plus répandue et celle qui a été le plus étudiée, car c'est la plus simple à mettre en place techniquement. Deux types de collisions vont être abordés : à haute et à basse énergie cinétique.

La dissociation induite par collision (en anglais : Collision Induced Dissociation CID) consiste à injecter les ions parents dans une cellule remplie de gaz inerte (par exemple azote, hélium, argon...) dans laquelle ceux-ci sont accélérés. Lors de leur mouvement, il se produit des collisions entre ces ions et les molécules de gaz, et une partie de l'énergie cinétique de collision va être convertie en énergie interne ro-vibrationnelle, entraînant une augmentation d'énergie interne dans l'ion moléculaire. Cette énergie se distribue généralement dans tous les degrés de liberté de l'ion moléculaire et quand l'énergie interne devient supérieure à son énergie de liaison la plus faible, cela induit sa fragmentation. La dissociation induite par collision a été introduite pour les basses énergies pour lesquelles l'excitation est majoritairement vibrationnelle, et où l'ion moléculaire reste dans son état électronique fondamental [39]. Cette étude permet de réaliser des collisions avec des faisceaux d'ions de l'ordre d'une dizaine à une centaine d'eV. Initialement, l'énergie cinétique de collision était de l'ordre du keV, l'ion moléculaire pouvait donc atteindre un état électronique excité, et même dans certains cas être ionisé. Ce mode d'activation CID est la technique de fragmentation la plus utilisée permettant de comprendre et d'étudier les processus de fragmentation pour séquencer des peptides et protéines. Ces processus mènent principalement à la rupture des liaisons peptidiques et à la formation d'ions fragments de types b et y, ainsi qu'à des pertes de molécules neutres, notamment $H_2O$, $NH_3$ et $CO$. T.Vaisar et J. Urban ont étudié l'effet de proline sur la fragmentation des peptides protonés [40] : c'est la rupture de la liaison peptidique côté N-terminal des résidus de prolines qui est privilégiée. D'autres groupes ont utilisé la CID pour étudier la stabilité et les mécanismes de fragmentation pour différentes tailles et séquences de peptides protonés [41]. Ces voies de fragmentation peuvent souvent être expliquées par le modèle du proton mobile. En effet, la charge sous forme d'un proton est localisée majoritairement sur le site de plus grande affinité protonique. Lorsqu'elle est transférée vers des liaisons amide du squelette peptidique, cela entraîne des ruptures des liaisons peptidiques [42]. Par ailleurs, la CID permet aussi d'étudier le cas d'assemblages comme les complexes non covalents formés entre les molécules biologiques et leurs ligands [43]. Ces multiples activations entraînent un réarrangement structural, permettant de casser les liaisons non-covalentes entre le complexe, ce qui permet d'étudier la reconnaissance moléculaire entre un peptide et des ligands différents en mesurant la force de leur interaction [44] [45], ou bien comme l'observent B. Paizs et al. [42] dans le cas des complexes doublement protonés, la rupture des liaisons non covalentes dû à l'apport d'énergie par collisions induisant le détachement du proton mobile qui pourrait se fixer sur le récepteur lors de la fragmentation. Étant donné que la CID mène la plupart du temps à la rupture de la liaison la plus fragile, une limite de la technique est qu'elle ne fournit pas d'information sur la position des modifications post-traductionnelles des protéines, puisqu'elles sont en général attachées au peptide

par des liaisons peu robustes, elles sont donc les premières à se casser, et donc cela rend les sites de liaison difficile à identifier. Nous nous intéressons à ce sujet au chapitre 5.

Nous allons maintenant décrire une méthode de CID, qui se déroule dans la cellule d'un spectromètre FT-ICR (voir la partie 3.3.2). Elle nécessite l'injection d'un gaz dans la cellule ICR à un moment donné et pour une durée déterminée.

Dans la cellule ICR, l'ion d'intérêt est soumis à une fréquence d'excitation légèrement différente de sa fréquence cyclotronique ; de plus, l'ion est alternativement soumis à une fréquence d'excitation en phase ou en opposition de phase avec la fréquence cyclotronique de l'ion d'intérêt. L'excitation collisionnelle de cet ion entraîne une augmentation du rayon de leur orbite dû au temps d'activation long allant jusqu'à 500 ms, ce qui augmente leur énergie interne et donc la probabilité de collision qui peut être suivie par la fragmentation. Ce mode d'activation est appelé SORI-CID (Sustained Off-Resonance Irradiation-Collision Induced Dissociation) [46]. Afin d'obtenir une meilleure efficacité de fragmentation dans la cellule ICR, plusieurs paramètres sont accessibles, comme la durée d'excitation, la pression du gaz [47][48], l'amplitude d'excitation et le décalage en fréquence. Un autre mode appelé RE-CID (on-resonance excitation-Collision Induced Dissociation) peut être utilisé dans une cellule ICR [49]. Lors des collisions avec le gaz dans la cellule, l'ion est excité par une onde radio-fréquence identique à sa fréquence cyclotronique, pendant une courte durée (en dessous de 500 $\mu$s).

### 3.4.2 Activation par ajout ou détachement d'électron

#### 3.4.2.1 Dissociation par capture d'électron (ECD)

La dissociation par capture d'électron ECD (en anglais : "electron capture dissociation") a été développé par McLafferty et Zubarev [50]. C'est une méthode de fragmentation associée à la capture d'un électron libre de faible énergie cinétique (quelques eV) par un ion moléculaire positif multi chargé. Prenons par exemple la capture d'un électron par un ion multi protoné $[M+nH]^{n+}$ : un ion radicalaire est alors créé, et celui-ci peut se fragmenter selon l'équation suivante :

$$[M+nH]^{n+} + e^- \Longrightarrow [M+nH]^{(n-1)+\bullet} \Longrightarrow fragments \tag{3.18}$$

Comme les molécules radicalaires ont une réactivité en générale différente de celle des systèmes à couche fermée tels que les molécules protonées, l'ECD procure de nombreuses informations supplémentaires par rapport à la CID, notamment pour l'étude structurale des peptides et protéines. En

effet, la capture électronique entraîne des voies de fragmentation particulières comme la rupture des liaisons covalentes S-S des ponts disulfures et les liaisons N-$C_\alpha$ du squelette peptidique, tandis que les liaisons non-covalentes peuvent être conservées [51].

Par conséquent, les fragments de type c/z issus de la rupture N-$C_\alpha$ sont souvent observés [52] [53] [54] alors qu'en mode d'activation CID ce sont principalement les fragments du type b/y [55] [56]. Cette fragmentation spécifique a été expliquée par un caractère non ergodique [57], ce qui signifie que la fragmentation a lieu avant la redistribution de l'énergie de recombinaison dans la totalité des degrés de liberté vibrationnels de l'ion, n'entraînant pas nécessairement la rupture des liaisons non-covalentes avant la rupture des liaisons covalentes [58] [50]. Contrairement à la méthode d'activation CID, l'ECD fournit des informations spécifiques sur la localisation des modifications post-traductionnelles des peptides et protéines [59], notamment la glycosylation [60] et la phosphorylation [61] [62]. L'ECD offre également la possibilité d'étudier des complexes protéine-ligand non covalents et peut donner des indices structuraux sur ces derniers : les liaisons covalentes du squelette peptidique sont dissociées, alors que l'interaction non covalente est conservée[63]. Nous aborderons ce sujet dans le cadre de cette thèse.

#### 3.4.2.2 La dissociation par transfert d'électron (ETD)

La dissociation par transfert d'électron ETD (en anglais Electron-Transfer-Dissociation) est une méthode similaire à la dissociation par capture d'électron ; mais cette fois-ci un électron est transféré depuis un ion réactif chargé négativement jusqu'à un ion positif multi-chargé. Par la suite, l'ion positif moléculaire peut subir une fragmentation. L'ETD a été développée par Syka et co. [64] en utilisant un piège à ions linéaire quadripolaire décrit dans la partie 3.1.3, et des études postérieures ont été faites afin d'améliorer la résolution de masse en utilisant un piège à ions du type Orbitrap [65]. Cette technique nécessite le choix du réactif chimique pour assurer le transfert d'électron. Beaucoup d'études ont été réalisées initialement avec l'anthracène, qui est un hydrocarbure aromatique polycyclique composé de trois cycles benzéniques, pour créer des anions réactifs grâce à une source d'ionisation chimique [64]. Le nitrobenzène a également été utilisé [66], mais actuellement le fluoranthène est le réactif le plus performant et le plus couramment utilisé de par son affinité électronique assez faible qui mène à une efficacité de transfert d'électron mesurée à 40 % [67] [68]. Il est important de souligner que la technique ETD est considérablement utilisée pour l'étude des polymères et pour l'analyse de la séquence des peptides et protéines pour des états de charge supérieurs ou égaux à deux, afin de pouvoir produire des fragments qui portent au moins une charge. Les voies de fragmentation des peptides ou protéines par ETD sont similaires à celles observées en ECD et mènent à

la rupture de quasiment toutes les liaisons $N - C_\alpha$ [69], ce qui assure une excellente couverture de la séquence. Initialement, la technique ETD a été développée dans le but de caractériser le site de phosphorylation des protéines [64]. En effet, le transfert d'électron induit la dissociation du squelette peptidique sans la perte de l'information massique spécifique aux modifications post-traductionelles potentiellement présentes [70]. Contrairement à l'ECD, le transfert de proton est possible en ETD. Une étude sur les polymères a montré qu'il y a une compétition entre le transfert de proton d'un cation à un anion et le transfert d'électrons d'un anion à un cation [54]. En comparaison avec l'ECD, l'ETD produit plus de fragments de plus haut rapport m/z ayant une charge largement réduite par rapport au système initial, ainsi que des pertes de molécules neutres plus importantes.

#### 3.4.2.3 La dissociation par détachement d'électron (EDD)

Après avoir expliqué la dissociation par capture et transfert d'électron, nous allons décrire une autre méthode d'activation appelée dissociation par détachement d'électron EDD (en anglais Electron Detachment Dissociation) pour laquelle l'ion précurseur doit être au moins doublement chargé négativement, ce qui n'est pas toujours faisable, par exemple pour les protéines contenant peu de résidus acides. En effet, contrairement à l'ECD, l'EDD se produit par l'interaction entre des ions multi-déprotonés et des électrons de plus haute énergie (supérieure à 10 eV) pour détacher un ou plusieurs électrons comme le montre l'équation suivante :

$$[M - nH]^{n-} + e^- \Longrightarrow [M - nH]^{(n-1)-\bullet} + 2e^- \Longrightarrow fragments \tag{3.19}$$

L'EDD a été utilisée pour étudier les peptides pour lesquels cette méthode aura tendance à produire plusieurs types de fragments, avec d'une part la perte de $CO_2$, mais aussi des ions de type a et x et également des fragments provenant du squelette peptidique, après la rupture de la liaison $C_\alpha$-C [71]. La méthode EDD a également servi à l'étude des biopolymères contenant des fonctions acides, notamment les oligonucléotides.

## 3.5 Rayonnements ionisants

L'utilisation des rayonnements ionisants est important notamment dans la compréhension à l'échelle moléculaire des effets de ces rayonnements sur la matière biologique. Ces derniers jouent un rôle crucial dans le domaine médical, par exemple pour le traitement de certains cancers. Il est indispensable d'étudier le mécanisme des dommages radio-induits sur les cellules cancéreuses afin de les empêcher de se régénérer. C'est au siècle dernier et grâce à la découverte de la radioactivité

par Henri Becquerel en 1896 que les rayonnements ionisants ont commencé à être utilisés. Un rayonnement est défini comme ionisant si l'énergie déposée dans la matière est suffisamment importante pour arracher un ou plusieurs électrons aux atomes ou molécules. La classification des rayonnements ionisants consiste en deux catégories : d'un côté les particules chargées (les électrons, les protons, les ions lourds..) qui interagissent avec les noyaux, les atomes ou les électrons, et celles qui sont non chargées telles que les neutrons et les photons. Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéressons plus particulièrement aux photons. Nous allons voir dans les parties suivantes comment ils interagissent avec la matière.

### 3.5.1 Interaction photon-matière

Les photons peuvent interagir avec la matière selon trois processus fondamentaux qui dépendent de l'énergie du photon incident : l'effet photoélectrique, la diffusion Compton et la création d'une paire électron-positron. L'effet photoélectrique concerne les photons dont l'énergie est comprise entre une dizaine d'eV et quelques dizaines de keV. Au cours de ce processus, le photon transfère l'intégralité de son énergie à un électron lié à une molécule ou un atome de la cible (voir la figure 3.14).

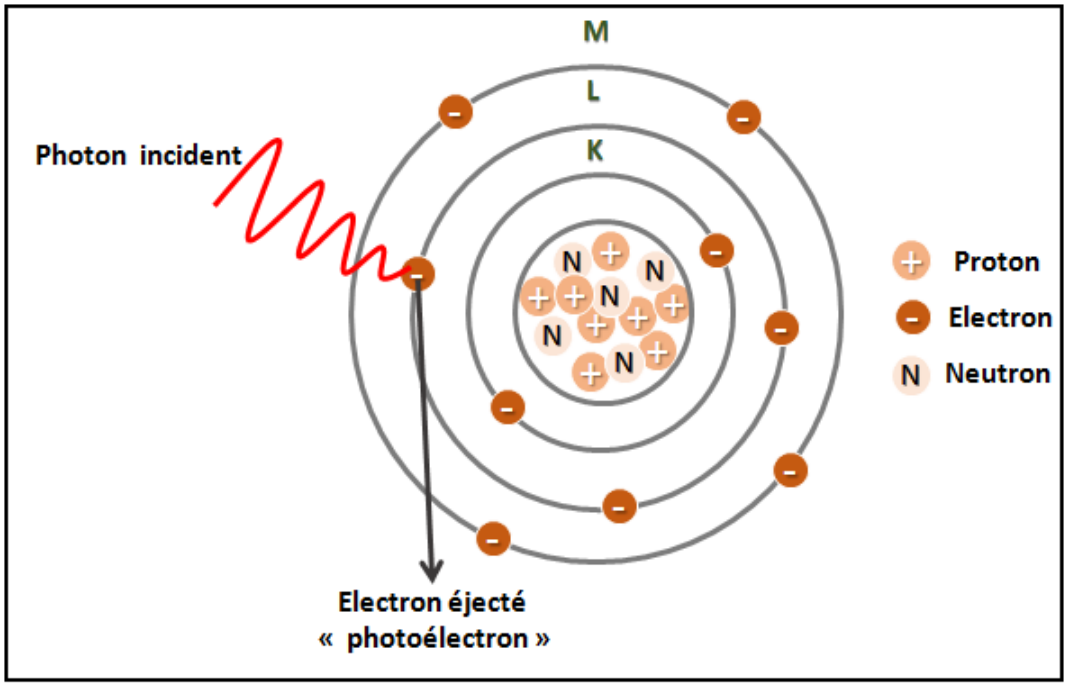


FIGURE 3.14 – Exemple d'absorption d'un photon ayant une énergie inférieure à 100 keV par effet photoélectrique et émission d'un photoélectron

Cet électron nommé aussi photoélectron va être éjecté dans le continuum avec une énergie cinétique correspondant à la différence entre l'énergie du photon et l'énergie de liaison de l'électron selon l'équation :

$$E_c = h\nu - E_L \tag{3.20}$$

tel que $\nu$ est la fréquence du photon absorbé, h est la constante de Planck et $E_L$ est l'énergie de liaison de l'électron expulsé. Par conséquent, si l'on mesure la distribution de l'énergie cinétique des photo-électrons émis par absorption d'un photon d'énergie donnée, on peut avoir des informations sur les orbitales atomiques ou moléculaires. Ensuite, entre 100 et 1000 keV, la diffusion Compton est l'effet dominant (voir la figure 3.15). Dans ce cas, le photon ne transmet pas la totalité de son énergie, comme dans le cas de l'effet photoélectrique, mais seulement une partie à un électron. Autrement dit, cette interaction peut être considérée comme une collision entre un photon et un électron. Ce dernier, appelé électron Compton, est expulsé du système. La trajectoire du photon va être modifiée par diffusion dans une direction faisant un certain angle $\theta$ par rapport à la direction d'origine.

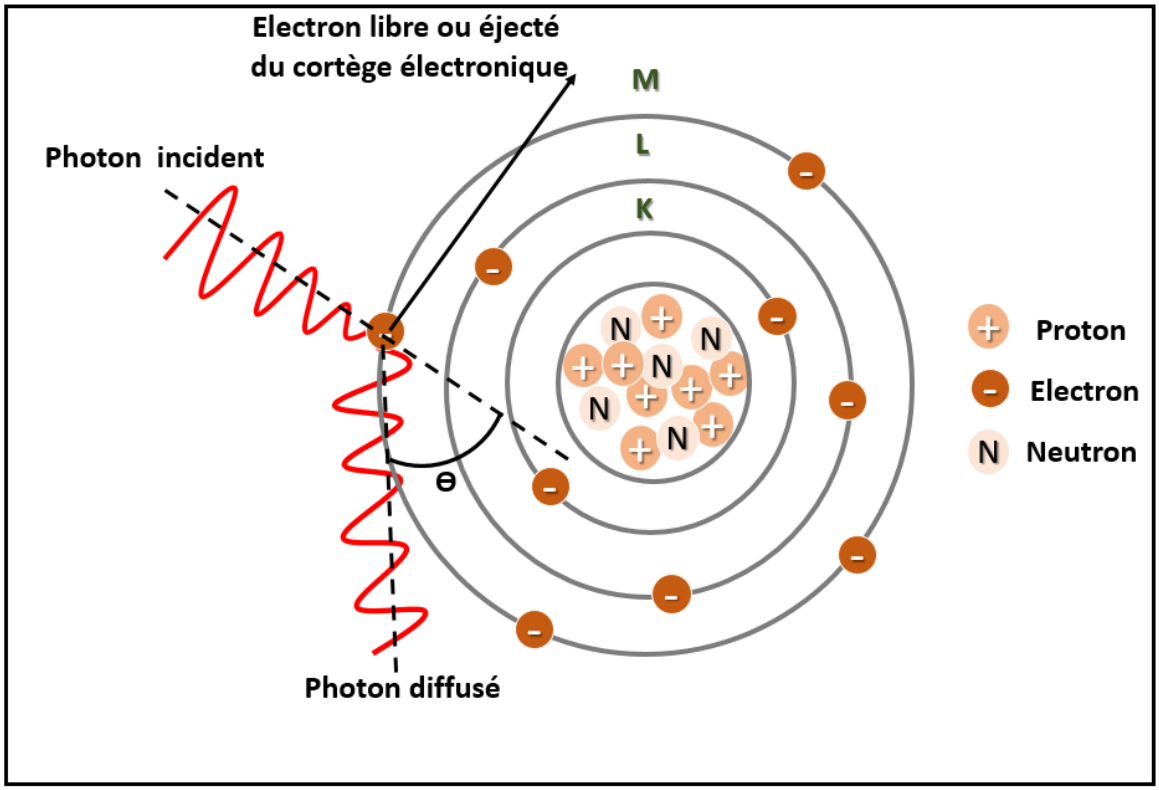


FIGURE 3.15 – Collision d'un photon ayant une énergie comprise entre 100 et 1000 keV avec un électron lié à un atome : effet Compton

Enfin, lorsque le photon a une énergie supérieure ou égale à la somme des énergies de masse au repos d'un électron et d'un positron, c'est-à-dire 2 x 0,511 MeV = 1,022 MeV, l'interaction avec les noyaux peut engendrer la production d'une paire électron-positron (voir la figure 3.16). Cette paire se propage alors dans la matière et constitue des rayonnements directement ionisants.

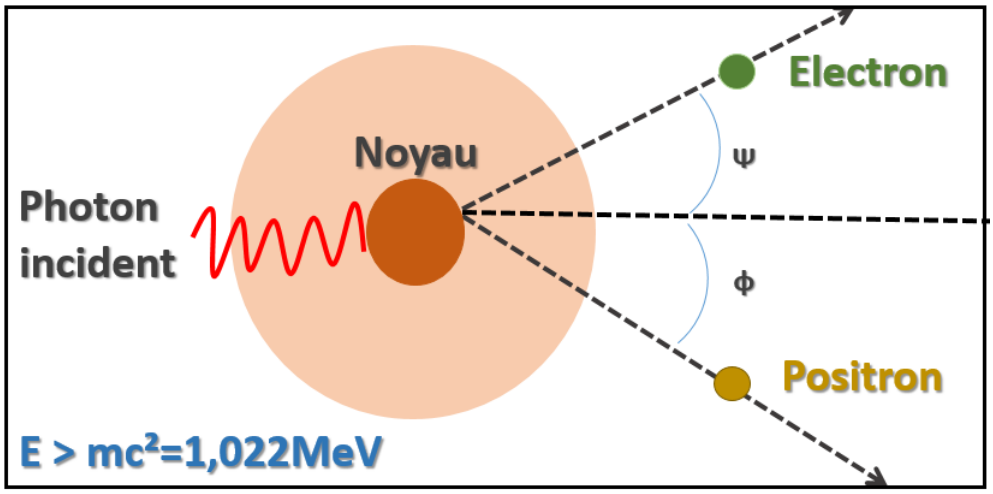


FIGURE 3.16 – Création d'une paire électron-positron (le photon ayant une énergie supérieure à 1.022 MeV)

Dans la partie suivante, nous allons détailler les processus mis en jeu par l'effet photo-électrique (ou photo-absorption) dans le cas d'une molécule.

### 3.5.2 Photo-absorption moléculaire

La photo-absorption moléculaire correspond à l'absorption d'un photon par une molécule de la cible. Pour cela, il faut en général que l'énergie du photon soit égale à la différence entre deux états rotationnels, vibrationnels ou électroniques (dans l'ordre croissant d'énergie, voir la figure 3.17). Après la photo-absorption, la molécule excitée se désexcite au bout d'un certain temps. Plusieurs processus de désexcitation sont susceptibles de se produire : l'émission d'un ou plusieurs photons, l'émission d'un ou plusieurs électrons ou encore la fragmentation. Dans cette thèse, nous nous sommes concentrés sur l'étude des interactions entre des molécules et des photons dans le domaine d'énergie VUV/X-mous en utilisant des faisceaux de photons émis par des synchrotrons. L'effet photo-électrique dominant largement dans cette gamme d'énergie, l'interaction va conduire à l'absorption de photons par les électrons du système moléculaire. Comme la figure 3.17 le montre, les photons VUV possèdent une énergie entre 10 et 120 eV, ce qui est suffisant pour entraîner l'ionisation ainsi que l'excitation électronique des molécules par photo-absorption des électrons des couches de valence. Quant aux rayons X (120-$5.10^4$ eV), ils permettent d'exciter ou d'éjecter des électrons des orbitales atomiques 1s de l'oxygène, du carbone et de l'azote, les principaux atomes lourds des molécules d'intérêt biologique et pharmaceutique [72]. Détaillons les phénomènes engendrés par la photo-absorption dans chacune de ces gammes d'énergie.

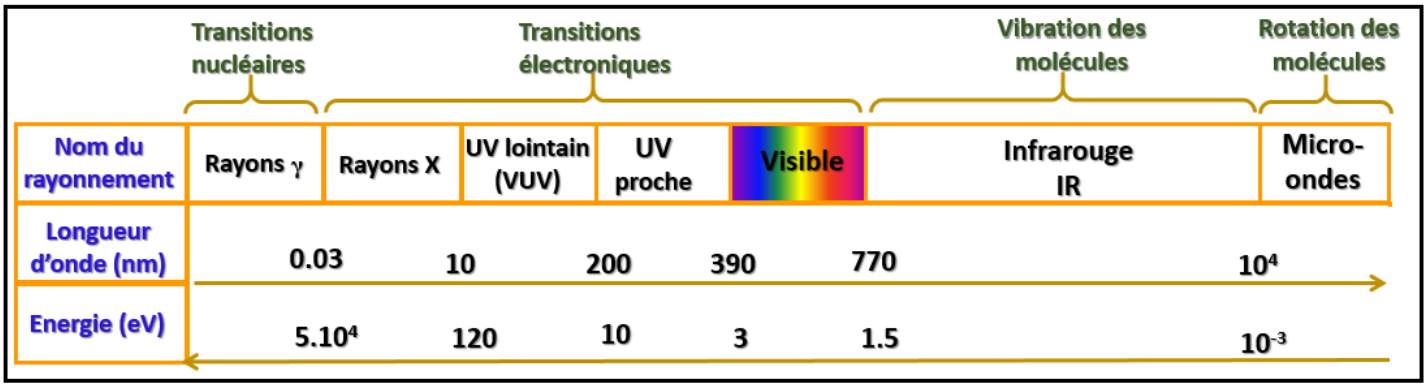


FIGURE 3.17 – Domaines du spectre électromagnétique par longueur d'onde et l'énergie photonique représentant les transitions nucléaires, électroniques, vibrationnelles et rotationelles

### 3.5.2.1 Photo-absorption UV-VUV

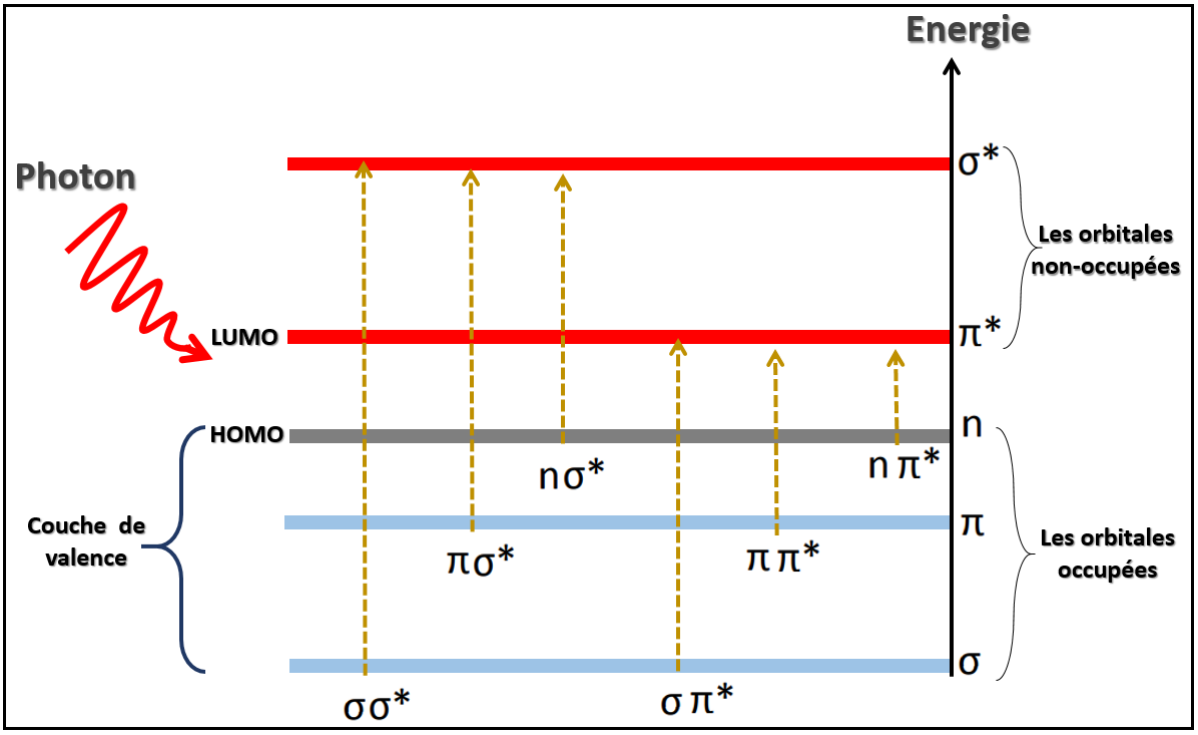


FIGURE 3.18 – Schéma présentant des exemples de transitions moléculaires lors de la photo-absorption UV-VUV

L'absorption d'un photon dans la gamme d'énergie UV (entre 3 et 10 eV) peut entraîner différentes transitions électroniques impliquant les électrons des orbitales de valence d'un système moléculaire 3.18). Les photons UV peuvent être absorbés par les nucléobases autour de 4.71 eV via une transition $\pi\pi^*$ [73] et l'état excité correspondant aura une durée de vie très courte inférieure à la pico-seconde [74]. Il a été montré pour les mononucléotides déprotonés que le photon peut être absorbé par la nucléobase [75]. Cette excitation peut être suivie par la fragmentation du système. Prenons par

exemple le cas d'une molécule protonée $[M+H]^+$ :

$$(M+H)^+ \Longrightarrow (M+H)^{+*} \Longrightarrow fragments \tag{3.21}$$

Après conversion interne, une fragmentation dans l'état électronique fondamental peut se produire si l'excès d'énergie vibrationnelle dans le système dépasse la limite de dissociation. L'absorption dans l'UV de la tyrosine, la tryptophane et la phénylalanine -les acides aminés possédant une chaîne latérale aromatique- se situe vers 4,5 eV [76]. En ce qui concerne les peptides contenant ces acides aminés, l'absorption se produit au niveau du chromophore des chaînes latérales des acides aminés. Et lorsque la longueur d'onde du photon est comprise entre 240 et 280 nm, elle entraîne dans la plupart des cas la rupture des liaisons peptidiques impliquant la formation des ions fragments de type b/y [77]. Pour des longueurs d'ondes inférieures à 240 nm, des ions fragments de type a, b, c et x, y et z sont formés [78]. Donc, la photo-absorption UV des acides aminés permet d'atteindre les états excités du système moléculaire. Mais dans le but d'étudier les caractéristiques et la stabilité de ces systèmes après ionisation et afin de cibler les couches électroniques plus profondes, il convient d'utiliser la photo-absorption VUV. La gamme d'énergie des photons VUV se situe entre 10 et 120 eV. L'absorption d'un photon VUV par une molécule permet de sonder les couches de valence profondes, impliquant parfois une excitation électronique si l'énergie du photon équivaut à une transition. Si l'énergie du photon est supérieure au seuil d'ionisation, l'électron peut être éjecté de la molécule et c'est l'ionisation (voir la figure 3.19). De nombreuses études d'irradiation par laser ont été menées sur des peptides et protéines protonés, les photons ayant une énergie inférieure à l'énergie de seuil d'ionisation. Ces travaux ont montré que le photon est particulièrement absorbé par les liaisons du squelette peptidique, entraînant un transfert de charge d'un électron d'une orbitale $\pi$ vers une orbitale $\pi^*$ [79] [80] [81] [82]. Cela peut être suivi par une conversion interne et une redistribution de l'énergie dans les modes de vibration, entraînant la fragmentation par la création des ions de squelette b/y et a/x, ou bien par une perte de molécules neutres . Dans le cas d'un photon VUV d'énergie avoisinant le seuil d'ionisation, la photo-absorption d'oligonucléotides a été étudiée et les résultats indiquent que la fragmentation est dominée par la rupture des liaisons glycosidiques entre nucléobases et désoxyriboses [83] [83]. Par ailleurs, la photo-absorption VUV du cytochrome C -une protéine comportant 104 acides aminés (12 kDa)- a été réalisée, [84] [85] et l'effet de la taille des peptides protonés de masse allant de 0.6 jusqu'à 2,8 kDa a pu être étudiée [86]. Il a été montré par l'équipe de L. Nahon que la conformation de la protéine était importante [87]. D'autres études ont été effectuées sur l'irradiation des peptides déprotonés après absorption d'un photon. Il a été observé

que la voie de relaxation majeure est le photo-détachement d'électron [88] [89], comme nous allons le voir dans une étude présentée plus loin également. Des études d'irradiation en phase gazeuse de protéines multi-chargées négativement ont montré le double détachement d'électrons [90]. D'autres encore ont montré que la perte d'une molécule $CO_2$ se produit pour certains peptides déprotonés après détachement ou excitation d'un électron des orbitales de valence [91] [92] [93] dû à un transfert ou détachement d'un électron du groupement $CO_2^-$, suivi d'une réaction radicalaire et de la perte d'une molécule de $CO_2$ [94]. Nous allons voir tous ces processus par la suite.

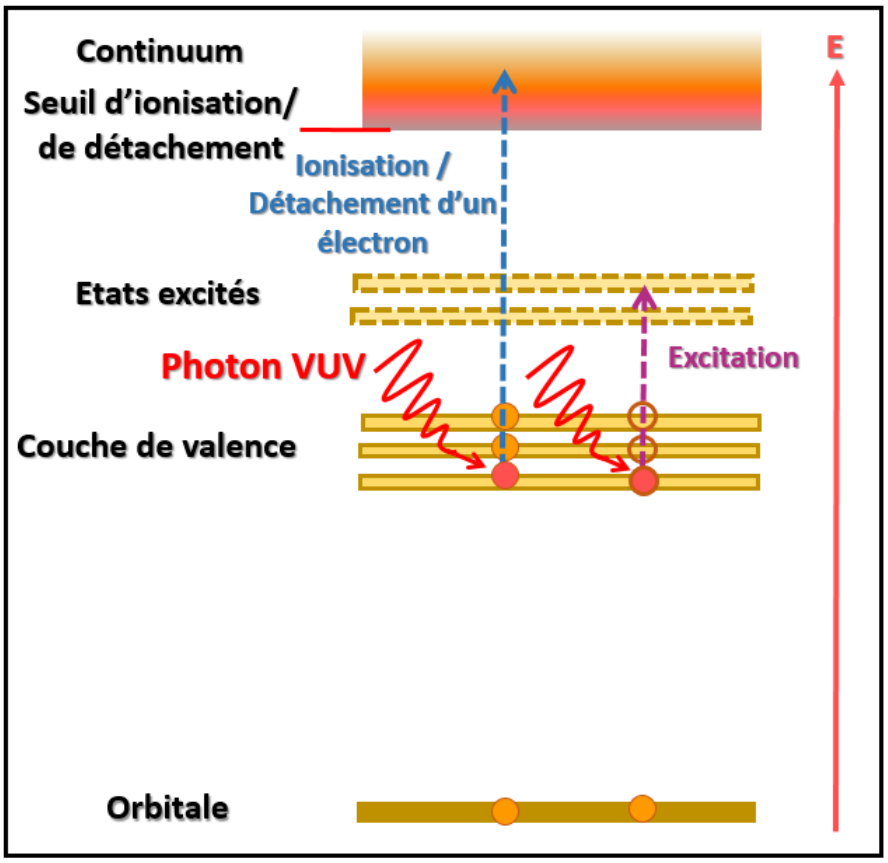


FIGURE 3.19 – Schéma représentant les processus d'ionisation et d'excitation après absorption d'un photon VUV par un système moléculaire isolé

#### 3.5.2.2 Photo-absorption X

Les rayons X ont été découverts par hasard lors d'une expérience menée par le physicien allemand Wilhelm Röntgen en 1895, récompensé pour ces travaux d'un prix Nobel de Physique en 1901. Les rayons X offrent la possibilité de cibler les couches électroniques internes d'un atome. Lorsque l'atome absorbe un photon X, deux mécanismes peuvent se produire (voir la figure 3.20) : tout d'abord, dans le cas où l'énergie du photon est plus basse que le seuil d'ionisation de l'orbitale considérée, l'électron qui absorbe sera conduit vers une orbitale non-occupée, menant l'atome dans un état excité. Lorsque l'énergie du photon est supérieure au seuil d'ionisation, l'électron est porté vers le continuum, laissant

l'atome dans un état ionisé. Dans les deux cas, un électron sera éjecté de l'atome par effet Auger, dont il existe deux types :

-L'effet Auger spectateur, dans lequel l'électron excité reste dans l'orbitale où il a été conduit, un autre électron occupe la lacune et un autre est éjecté vers le continuum avec une énergie cinétique égale à :

$$E_c = E_1 - E_2 - E_3 \tag{3.22}$$

avec $E_1$ l'énergie de liaison de l'électron de l'orbitale atomique 1s ; $E_2$ l'énergie de liaison de l'électron d'une couche plus élevée et $E_3$ l'énergie de liaison de l'électron éjecté vers le continuum.

-Et l'effet Auger acteur, dans lequel l'électron excité participe à la relaxation, soit pour combler la lacune, soit pour être émis dans le continuum. Entre ces deux effets, l'effet Auger spectateur est dominant.

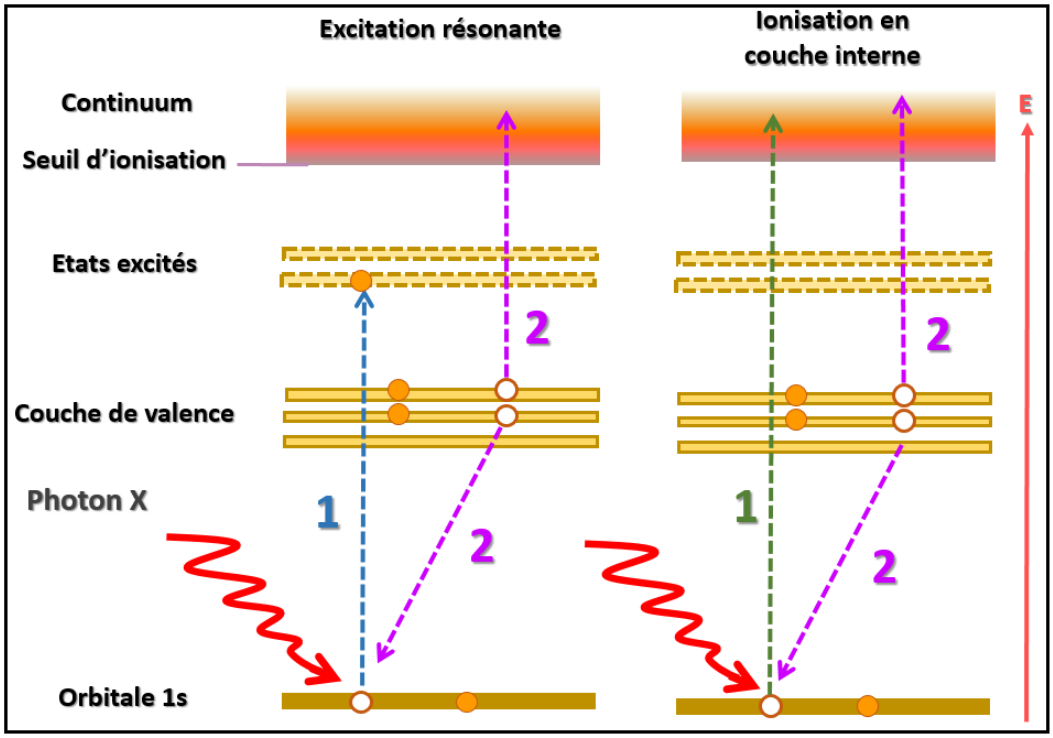


FIGURE 3.20 – Schéma représentant les processus d'ionisation (flèche verte) et d'excitation (flèche bleue) d'un atome après absorption d'un photon X en couche interne 1s, suivis de la désexcitation Auger (flèches violettes)

Dans le domaine d'énergie des X mous, l'énergie du photon X absorbé permet de cibler les électrons 1s des couches internes des atomes. Nous nous sommes intéressés, en particulier, à la photo-absorption aux énergies de 288 eV, 401,5 eV et 531,5eV puisqu'elles sont connues pour cibler

les électrons de carbone, azote et oxygène, respectivement, en induisant une excitation de résonance aux orbitales $\pi^*$ suivie par l'émission d'électron Auger alors que l'énergie électronique est convertie en énergie vibrationnelle. En dessous de 288eV, seuls les électrons de valence peuvent absorber le photon, alors qu'à partir de 288eV, des électrons situés dans les orbitales atomiques de carbone, azote et oxygène peuvent être impliqués. En effet, les mesures effectuées grâce aux spectres de masse réalisées à plusieurs énergies ont permis de construire des spectres NEXAFS (en anglais : Near Edge X-ray Absorption Fine Structure) avec lesquels il a été possible d'identifier les énergies des transitions électroniques résonantes entre les électrons d'une orbitale 1s et les orbitales moléculaires [95] (voir la figure 3.21). A ces énergies, la durée de vie des états excités ou ionisés dans une orbitale 1s est ultra courte (de l'ordre de picosecondes) [96].

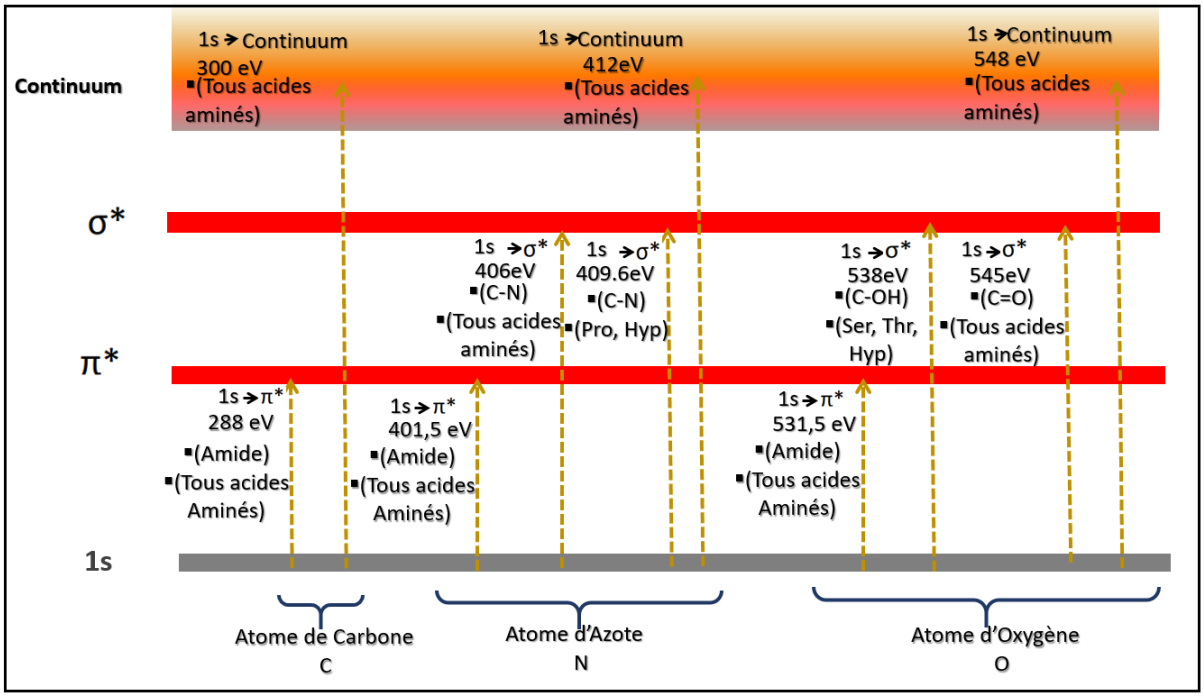


FIGURE 3.21 – Schéma présentant les transitions électroniques lors de la photo-absorption des électrons des orbitales 1s des atomes de carbone, azote et oxygène

Des études en phase condensée ont mesuré des spectres de structure fine d'absorption des rayons X pour trois pyrimidines et deux nucléobases, les principaux constituants de l'ADN et de l'ARN pour le carbone, l'azote et l'oxygène [97]. La photo-absorption d'un photon X par un électron d'une orbitale 1s a été réalisée également en phase gazeuse, sur les acides aminés. Il a été observé que la fragmentation est majoritaire pour cette taille de systèmes moléculaires [98]. Par ailleurs, des expériences en phase gazeuse ont été réalisées sur des protéines et peptides notamment le cytochrome C [72], la Leucine-Enképhaline [99] et l'ubiquitine [100], montrant la formation de fragments internes. En effet, la photo-absorption par la protéine cytochrome C a été étudiée la première fois en couplant

un piège à ions quadripolaire linéaire avec une ligne de faisceau synchrotron à rayons X [72]. Dans la gamme d'énergie entre 288 eV et 300 eV, il se produit une transition entre les processus d'excitation et d'ionisation après absorption d'un photon X par un électron 1s d'un atome de carbone. Une étude a été faite au sein de notre équipe sur les différents états de charge de deux modèles peptidiques de la triple hélice du collagène, constitués de trimères des peptides $(PPG)_{10}$ et $(POG)_{10}$ après irradiation d'un photon X dans la gamme d'énergie comprise entre 150 eV et 531.5 eV [101]. Il a été observé qu'à cette gamme d'énergie une double ionisation non-dissociative peut se produire en concurrence d'une simple ionisation [101] [102].

Finalement, toutes ces observations montrent que la taille du système moléculaire joue un rôle important sur sa stabilité et sa survie après multi-ionisation par absorption d'un photon X. Cela peut s'expliquer par sa capacité à redistribuer de l'énergie vibrationnelle déposée par le photon vers un plus grand nombre de degrés de liberté. En s'appuyant sur les différentes techniques et processus que nous avons évoqués dans ce chapitre, nous allons caractériser les systèmes moléculaires tels que ceux que nous avons présentés lors du chapitre 2, afin d'étudier la réponse de ces derniers sous irradiation en phase gazeuse.

# Chapitre 4

# Étude des processus photo-induits dans les complexes non-covalents de la vancomycine

## Sommaire


**4.1 Dispositif expérimental et lignes de faisceaux . . . . . 54**

4.1.1 Dispositif expérimental Paultje : Spectromètre de masse à temps de vol utilisée en mode linéaire ou réflectron . . . . . 54

4.1.2 Synchrotron BESSY II . . . . . 58

4.1.2.1 La ligne de photons VUV . . . . . 59

4.1.2.2 La ligne de photons X . . . . . 60

**4.2 Résultats et discussions . . . . . 60**

4.2.1 Étude des espèces protonées dans la gamme d'énergie VUV . . . . . 60

4.2.1.1 Vancomycine isolée protonée . . . . . 60

4.2.1.2 Effet de la dimérisation . . . . . 65

4.2.1.3 Modèle du récepteur . . . . . 68

4.2.1.4 Effet de la complexation du modèle du récepteur avec la vancomycine 71

4.2.2 Études des espèces déprotonées dans la gamme d'énergie VUV . . . . . 76

4.2.2.1 Vancomycine isolée déprotonée . . . . . 76

4.2.2.2 Complexe déprotoné . . . . . 78

4.2.3 Identification d'un ensemble de modifications post-traductionelles par photo-absorption X . . . . . 81

**4.3 Conclusion . . . . . 91**

Nous avons examiné dans les chapitres précédents, les différents concepts expérimentaux, ainsi que les systèmes moléculaires nécessaires à la compréhension des résultats présentés et obtenus au sein de ce chapitre. La première partie de celui-ci sera consacrée à la description du dispositif expérimental, puis des lignes de faisceaux au synchrotron BESSY II. La seconde partie exposera une étude en phase gazeuse des ions positifs et négatifs d'un complexe non-covalent d'intérêt pharmaceutique composé d'un antibiotique, la vancomycine, et d'un modèle de la partie de son récepteur reconnue spécifiquement. Nous évoquerons ainsi les différents processus induits par la photo-absorption, dans la gamme d'énergie VUV et X afin de comprendre comment les interactions non-covalentes impliquées dans la reconnaissance moléculaire sont affectées par les rayonnements ionisants. Afin d'illustrer ces concepts, nous allons décrire tout d'abord les molécules. Notre choix s'est porté sur la vancomycine qui est un médicament antibactérien utilisé depuis de nombreuses années, découvert au milieu des années 1950 [103]. C'est un antibiotique glycopeptidique, jouant un rôle important en tant que médicament clinique, car il est actif contre les infections du sang, de la peau et des os causées par des bactéries Gram-positif, telles que le Staphylocoque doré, qui a une couche épaisse de peptidoglycane qui entoure la cellule [104]. La vancomycine bloque la formation de ce type de paroi cellulaire en se liant spécifiquement et très fortement sur l'extrémité des précurseurs de ce peptidoglycane se terminant par la séquence ${}^{D}A^{D}A$ : cela induit une inhibition de la croissance cellulaire, entraînant la mort de la bactérie [105]. Les interactions moléculaires pour la formation du complexe entre la vancomycine et des modèles de son récepteur ont été largement étudiées par de nombreux groupes afin de mieux comprendre la reconnaissance moléculaire entre médicaments et récepteurs biologiques en déterminant expérimentalement les constantes d'affinité entre ces complexes par RMN [106] et par spectrophotométrie [107]. Des études de cristallographie sur la structure du complexe entre la Vancomycine et son récepteur ont été menées dans les années 1980. Il a été montré que la partie réceptrice du peptidoglycane est constituée de trois acides aminés (${}^{L}K^{D}A^{D}A$) [108]. En effet, les peptides qui se terminent par ${}^{L}K^{L}A^{L}A$ ne forment pas de complexes avec la vancomycine [109]. Il a alors été montré que la Vancomycine est fortement liée au modèle de son récepteur $Ac_2^{L}K^{D}A^{D}A$ comme le montre la complémentarité des surfaces moléculaires de la structure cristallographique (voir figure 4.1) du complexe non covalent [110].

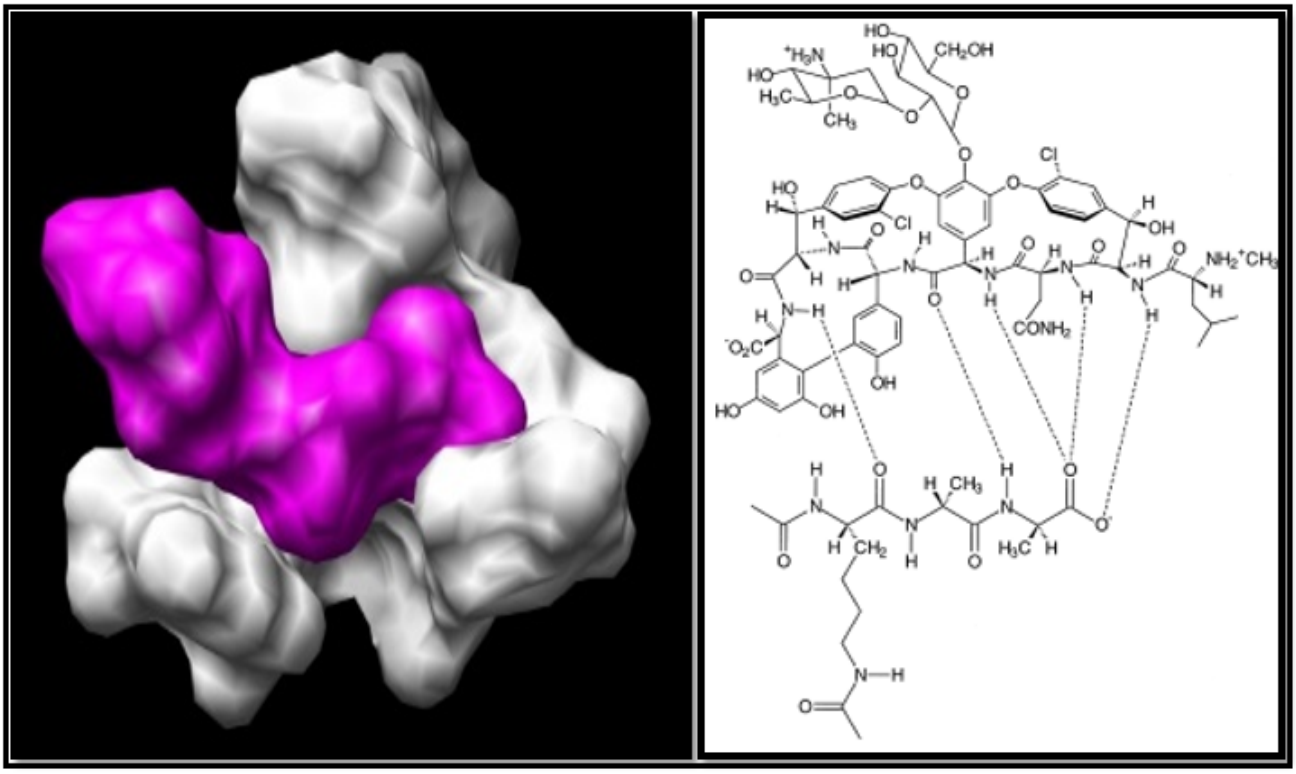

FIGURE 4.1 – Surfaces moléculaires de la structure en phase condensée du complexe non covalent entre la Vancomycine en blanc et le modèle $Ac_2\ {}^{L}K^{D}A^{D}A$ de son récepteur en violet, à droite, la structure chimique du complexe en solution à pH = 7, avec les liaisons H entre les deux molécules représentées en tirets dans le cas de la structure native.

Les premières études par spectrométrie de masse ont montré que les complexes vancomycine-récepteur peuvent être conservés en phase gazeuse, grâce aux techniques d'ionisation douce telles que l'électrospray [111] (décrite dans le chapitre 2). Des études de CID ont montré que les complexes protonés et déprotonés n'ont pas le même comportement. En effet, il a été observé que le complexe en mode positif n'était pas stéréospécifique alors qu'en mode négatif, le récepteur $Ac_2^L K^L A^L A$ se lie beaucoup plus fortement à la vancomycine que le récepteur $Ac_2^L K^L A^L A$ [45]. De même, des études avec la spectroscopie IR à dissociation multi-photonique (IRMPD), dont les spectres expérimentaux ont été comparés à des calculs de chimie quantique ont montré que les interactions spécifiques entre la vancomycine et le modèle du récepteur $Ac_2\ {}^{L}K^{D}A^{D}A$ sont conservées après ionisation par électrospray, mais uniquement pour les espèces déprotonées car le récepteur se lie fortement à la poche de liaison de la vancomycine [112]. En ce qui concerne les espèces protonées, il a été découvert que le récepteur se trouve en dehors de la poche de liaison de la vancomycine, et donc la reconnaissance moléculaire est perdue [113]. Cela est dû à la protonation du groupe carboxylate du récepteur en mode positif qui perturbe probablement fortement les liaisons H dans la poche de liaison de la vancomycine.

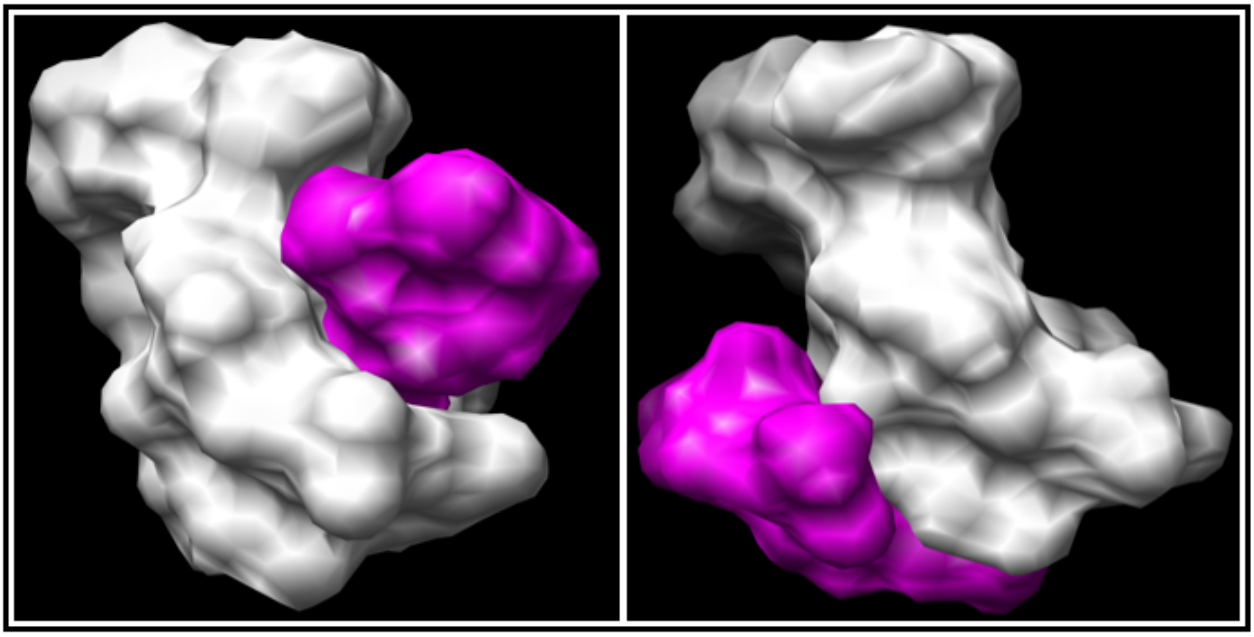

FIGURE 4.2 – Surfaces moléculaires de la structure en phase gazeuse du complexe non covalent entre la Vancomycine en blanc et le modèle $Ac_2\ ^{L}K^{D}A^{D}A$ de son récepteur en violet, à droite en mode positif et à gauche en mode négatif

## 4.1 Dispositif expérimental et lignes de faisceaux

Ces expériences et les résultats présentés dans ce chapitre sont le fruit d'une collaboration avec le groupe de Thomas Schlathölter de l'université de Groningen aux Pays Bas (Zernike Institute for Advanced Materials). Tout d'abord, nous décrivons le dispositif expérimental ayant permis de réaliser les mesures. Ensuite, nous présenterons les lignes de faisceaux du synchrotron BESSY II utilisées.

### 4.1.1 Dispositif expérimental Paultje : Spectromètre de masse à temps de vol utilisée en mode linéaire ou réflectron

L'irradiation de la vancomycine et de son modèle de récepteur décrite dans ce chapitre a été réalisée en couplant le dispositif Paultje avec les lignes de lumière synchrotron VUV où l'on a utilisé le spectromètre de masse en mode linéaire (basse résolution) et en mode réflectron (haute résolution) pour les rayons X. Ces derniers seront détaillés dans la partie 4.1.2.

La figure 4.3 présente une photo du dispositif expérimental prise lors de nos expériences au synchrotron BESSY II à Berlin. Ce dispositif a été décrit auparavant en détails dans différents documents, notamment dans des thèses [81] [114]. Les molécules, initialement en poudre de plus de 80% de pureté, ont été achetées auprès de Sigma-Aldrich. Une solution a été préparée en utilisant un mélange

d'eau et de méthanol avec des proportions égales en volume [50 :50] et une concentration finale de 50 $\mu$mol.$l^{-1}$. Nous ajoutons également 1% d'acide formique pour protoner les molécules ou d'hydroxyde de potassium afin d'obtenir des espèces déprotonées. Dans la suite, les tensions données sont valables pour des ions positifs.

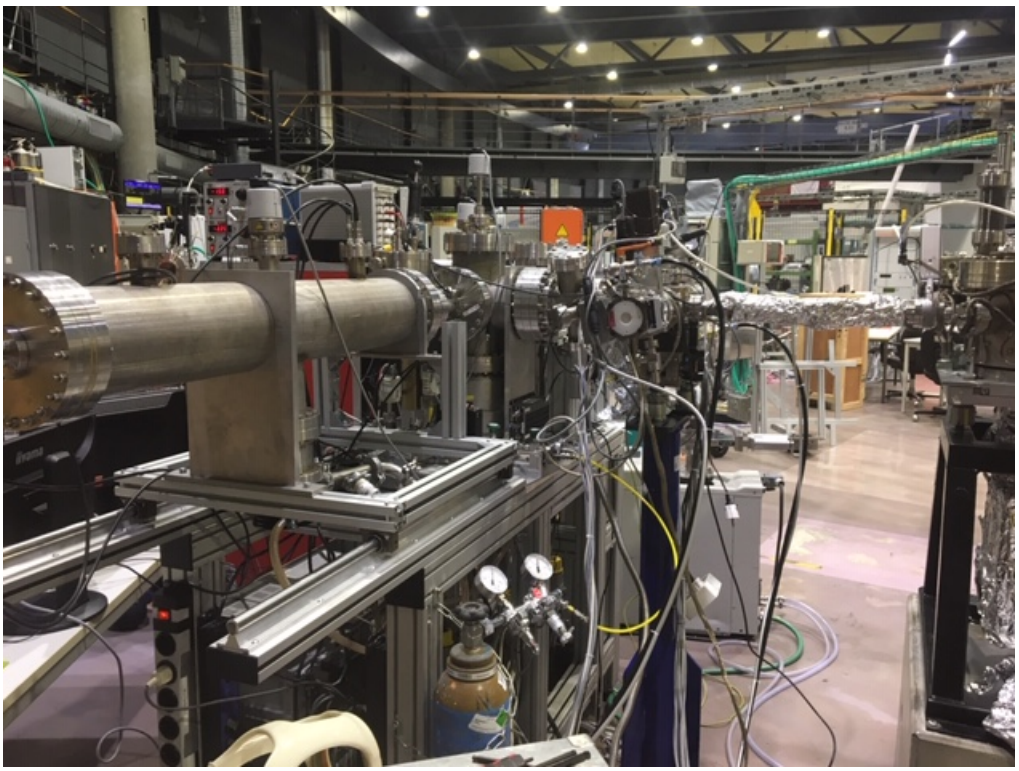

FIGURE 4.3 – Photo du dispositif expérimental Paultje couplé à une ligne de lumière synchrotron

Les molécules, sous forme d'une solution, introduite dans une seringue, dont le piston est poussé à un flux de 1 µL/min, sont mises en phase gazeuse à l'aide d'une source électrospray (ESI) (voir la figure 4.4). La solution passe dans un capillaire qui se termine par une aiguille métallique creuse. En appliquant une haute tension autour de 3,5 kV sur l'aiguille métallique de la source ESI placée sous pression atmosphérique, un champ électrique élevé est créé entre l'aiguille et un capillaire métallique chauffé à une température comprise entre 50 $^o$C et 100 $^o$C, jouant le rôle d'une contre électrode. Suite au processus d'évaporation décrit dans la partie 3.1.1, les ions sont transportés vers la première chambre à vide à une pression d'environ $10^{-1}$ mbar et focalisés le long d'un funnel de 26 électrodes sur lesquelles un potentiel d'une fréquence RF $\simeq$ 160 kHz et de $\simeq$ 350 V d'amplitude est appliqué, afin qu'ils soient guidés dans la chambre à vide suivante. La pression y est proche de $10^{-4}$ mbar grâce à un diaphragme jouant le rôle d'une simple lentille électrostatique polarisée soumise à une tension généralement inférieure à 14 V. Les ions sont ensuite guidés à l'aide d'un octopôle porté à un potentiel RF autour de 400 V d'amplitude et de fréquence de 600 kHz. A la sortie de cet octopôle

se trouve une lentille (notée lentille d'injection dans la figure 4.4) dont le potentiel est contrôlé par un générateur d'impulsions. Lorsqu'on veut que les ions traversent l'octopôle et soient injectés dans le piège (voir la figure 4.4), ce potentiel est 0V. Lorsqu'on veut qu'ils restent dans l'octopôle, on met ce potentiel à une valeur supérieure à celle du diaphragme de sortie du funnel. En effet, c'est l'endroit où le libre parcours moyen des ions devient de l'ordre des dimensions des chambres à vide, donc où les collisions avec le gaz résiduel sont négligeables. Par la suite, l'ion moléculaire d'intérêt est sélectionné selon son rapport masse sur charge (m/z) dans un analyseur en masse quadripolaire (QMS) (Pression $\simeq 10^{-7}$mbar, RF $\simeq$ 800 kHz, Vpp $\simeq$ 2000 V) . Les ions filtrés sont alors accumulés dans un piège RF tridimensionnel (piège de Paul) dont l'électrode annulaire est portée à une tension radiofréquence dont l'amplitude est variable de 0 à 2kV à une fréquence de 1 MHz. La tension appliquée à l'électrode d'entrée, pendant l'extraction, est de 30 V et la tension de l'électrode de sortie est de -630 V. Ces ions seront soumis à une injection d'hélium grâce à une vanne contrôlée par un générateur d'impulsions pendant une durée de quelques dizaines de millisecondes pour dissiper l'énergie cinétique des ions. Ceux-ci peuvent alors rester piégés pendant plusieurs secondes. Après une centaine de millisecondes, le temps que l'hélium soit pompé, le faisceau de photons traverse le piège perpendiculairement à l'axe de propagation des ions (comme illustré sur la figure 4.4) en passant par deux trous dans l'électrode annulaire. Nous pouvons aussi mentionner que le flux de photons est mesuré par une photodiode et le temps d'irradiation est contrôlé par un obturateur électromécanique via le générateur d'impulsions et est généralement compris entre 100 et 1000 ms. Une seconde injection de gaz d'hélium est appliquée afin de dissiper l'énergie cinétique des fragments produits après irradiation, ce qui permet de les garder dans le piège tout en conservant une petite taille du paquet d'ions. Juste avant l'extraction des ions moléculaires du piège, et dans le but de limiter la collision avec le gaz conduisant à la fragmentation des molécules, nous devons pomper de nouveau le gaz d'hélium dans le piège avec une pompe turbomoléculaire d'une capacité de 500 $L/s$ pendant une durée de 100 ms. Ensuite, tous les ions piégés sont extraits grâce à une tension pulsée appliquée aux électrodes d'entrée (+30 V) et de sortie (-630 V) du piège pendant une durée de l'ordre de quelques microsecondes. Les ions sortant du piège sont alors fortement accélérés par une tension de l'ordre de -4kV appliquée sur les électrodes d'un spectromètre de masse à temps de vol. Enfin, ils sont détectés par des galettes à micro-canaux (MCP) dont la face avant est polarisée à -5 ou -10 kV. Le signal électrique est alors traité par un oscilloscope numérique déclenché par le générateur d'impulsions qui permet d'obtenir le signal en fonction du temps de vol des ions. Ce spectre de temps de vol est ensuite converti en spectre de masse par une calibration (voir partie 3.3.1). La figure 4.4 représente le schéma du dispositif expérimental ainsi que le chronogramme décrivant les étapes de déroulement

d'un cycle pour détecter les fragments produits après irradiation (dans la figure 4.4).

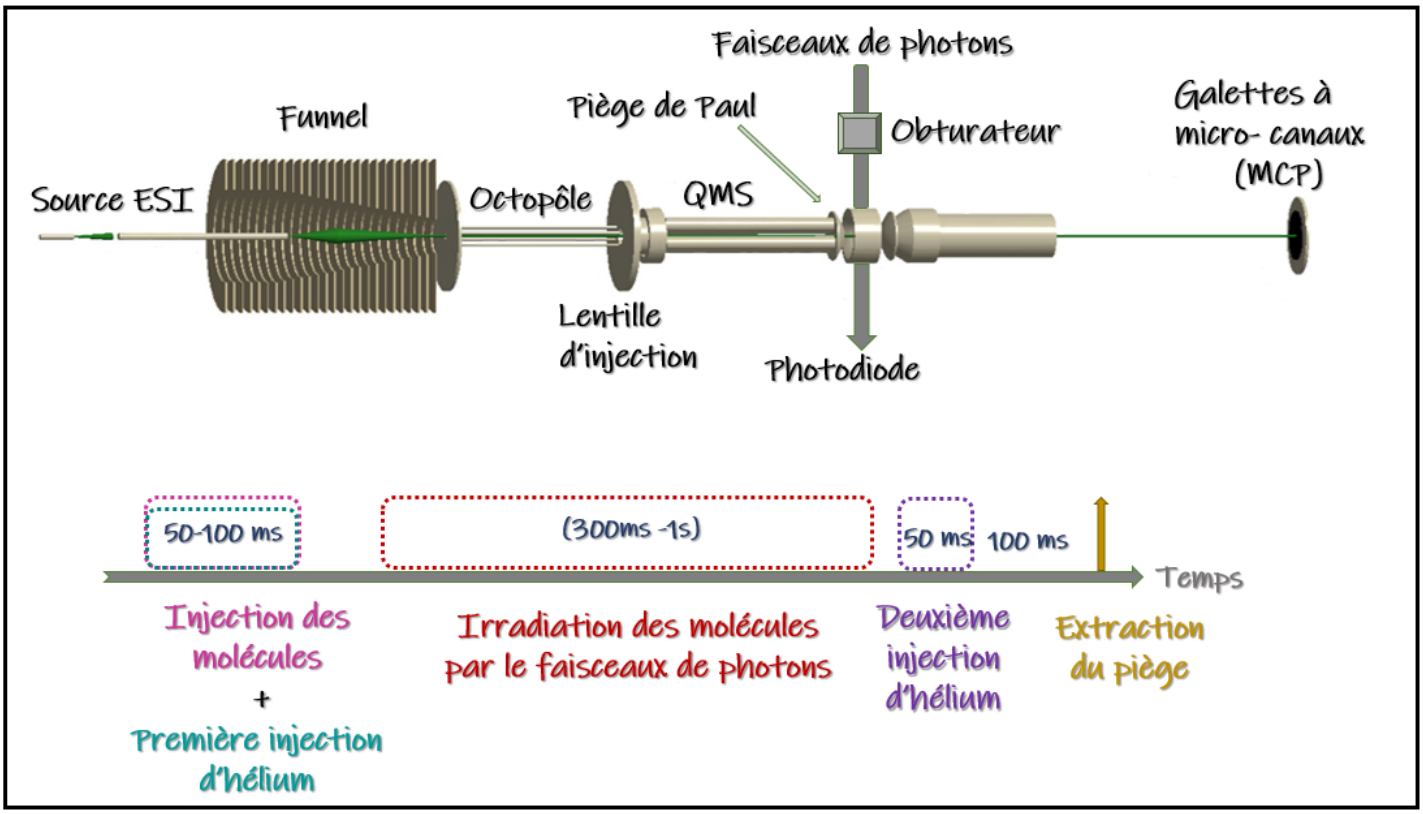


FIGURE 4.4 – Schéma simplifié du dispositif expérimental Paultje avec la ligne de lumière émettant des photons VUV ou X, et en dessous, une séquence temporelle présentant les étapes et le temps nécessaire pour un cycle complet du dispositif

Nous avons enregistré un spectre de masse pour chaque énergie d'irradiation. Mais se posent les questions suivantes : contiennent-ils uniquement des pics dus à l'irradiation des molécules d'intérêt ? Combien y a-t-il de photons absorbés par le système étudié ?

Pour répondre au mieux à ces questions, toutes nos données sont acquises en trois étapes. La première étape consiste à enregistrer un spectre de masse sans faisceau de photons qu'on note (ESI) afin de déterminer l'abondance initiale d'ions précurseurs injectés dans le piège. Dans la seconde, un spectre de masse avec le faisceau de photons mais sans injection d'ions précurseurs est également enregistré et noté (faisceau) dans le but de distinguer les pics provenant du "gaz résiduel". Ensuite, un spectre de masse avec injection d'ions précurseurs et irradiation avec le faisceau de photons est enregistré et noté (ESI+faisceau). Enfin, nous soustrayons le spectre (ESI) du spectre (ESI+faisceau). Lorsque l'absorption d'un photon mène à un changement du rapport m/z suite à l'ionisation et/ou la fragmentation de l'ion précurseur, l'intensité du pic correspondant devient moins négative et d'autres pics d'intensité négative apparaissent. Par conséquent, le spectre (ESI+Faisceau)-(ESI) montre un

pic négatif qui correspond à l'ion précurseur et tous les pics positifs sont dus au faisceau de photons. Nous calculons l'aire sous chaque pic présent sur le spectre de masse pour obtenir l'abondance des espèces formées par la photo-absorption. Celle-ci est ensuite normalisée par l'aire sous le pic de l'ion précurseur, qui est proportionnelle au nombre d'ions qui ont absorbé un photon. Une correction des abondances est également réalisée dans le but de tenir compte de l'efficacité de détection par les MCP, qui baisse avec la vitesse des ions. Comme ces ions sont accélérés par un champ électrique, leur vitesse $v$ est liée à leur rapport m/z, qui suit la relation :

$$zU = \frac{mv^2}{2} \Longrightarrow v = \sqrt{\frac{2zU}{m}} \tag{4.1}$$

où U est la différence de potentiel entre le piège et la face avant des galettes. Nous avons divisé chaque abondance par le facteur :

$$P = \frac{1 + tanh(\frac{v - 28500}{11000})}{2} \tag{4.2}$$

avec $v$ la vitesse des ions. On peut noter aussi que toutes les abondances sont normalisées par la somme des abondances des produits formés après la photo-absorption, permettant ainsi de s'affranchir des fluctuations intervenant entre les différentes énergies. En ce qui concerne le nombre de photons absorbés par la molécule, il faut tenir compte du flux de photons typique lors de nos expériences $10^{12-13}\ s^{-1}$. Il est bien inférieur aux flux des lasers femtosecondes (de l'ordre de $10^{26}\ s^{-1}$), où plusieurs photons sont absorbés en même temps. Par conséquent, chaque absorption de photon dans nos expériences est un événement indépendant. L'absorption du deuxième photon ne dépend donc pas de l'absorption du premier photon. Si $p$ est la probabilité d'absorber le premier photon, alors $p^2$ est la probabilité d'absorber deux photons. Nous négligeons les absorptions suivantes. Et si nous faisons en sorte d'avoir 10% maximum de perte de l'ion précurseur, cela nous amène à $p^2+p < 0.1$ et donc $p < 0.09$ ce qui nous donne $p^2 < 0.0081 < 10\ \%p$. La probabilité d'absorber deux photons est donc négligeable devant l'absorption d'un seul photon.

### 4.1.2 Synchrotron BESSY II

Pour mener les expériences d'irradiation décrites dans ce chapitre, nous nous sommes rendus au synchrotron BESSY II à Helmholtz-Zentrum Berlin (HZB). C'est une source de rayonnement synchrotron de troisième génération qui permet de produire des faisceaux de photons dans une

gamme d'énergie de 6 meV en allant jusqu'à 150 keV. Pour ces expériences d'irradiation de molécules en phase gazeuse, dont la densité est très faible (de l'ordre $10^{14}$ $m^{-3}$, ce qui équivaut à une pression de l'ordre de $10^{-8}$ mbar à température ambiante), nous avons utilisé une source de photons de type synchrotron car elle permet d'avoir une brillance extrêmement élevée pouvant aller jusqu'à $10^5$ fois celle d'un tube à rayons X classique [115]. BESSY II comporte un accélérateur linéaire où les électrons subissent une première accélération afin d'être dirigés vers le "booster". L'énergie des électrons va passer de 100 MeV à sa valeur maximale de 1700 MeV grâce à un champ électrique oscillant et généré dans une cavité accélératrice qui leur fournit, à chaque passage, une quantité d'énergie cinétique supplémentaire. Ensuite, les électrons accélérés dans le booster circulant à une vitesse proche de celle de la lumière, vont être accumulés dans un anneau de stockage à l'aide d'aimants pulsés. De nombreux éléments magnétiques dirigent (dipôles) et focalisent (quadripôles) le faisceau d'électrons le long d'une trajectoire circulaire. La présence d'onduleurs fait osciller un grand nombre de fois les électrons qui génèrent le rayonnement ; à chaque ondulation, les électrons émettent du rayonnement. La direction de la lumière synchrotron peut être ajustée à l'aide de miroirs, et son énergie est déterminée en utilisant des monochromateurs. Pour nos expériences, nous avons utilisé deux lignes : la ligne VUV U125_2NIM et la ligne des rayons-X U49-2_PGM-1, que nous détaillerons dans la prochaine partie.

#### 4.1.2.1 La ligne de photons VUV

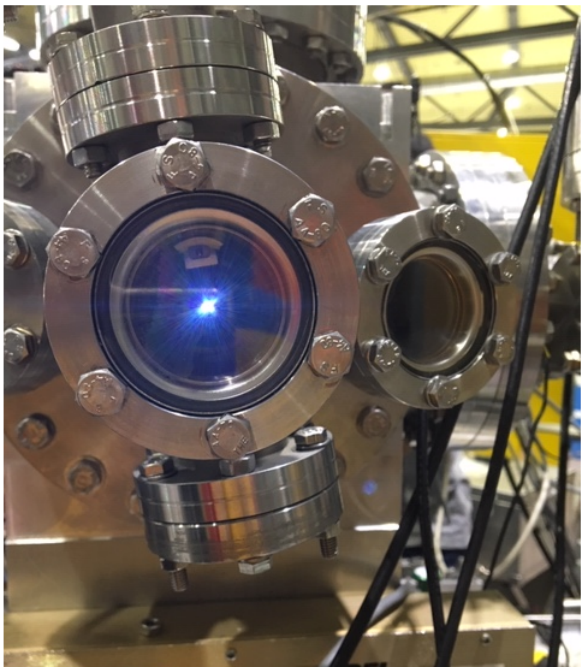

FIGURE 4.5 – Photo du faisceau de lumière à la sortie du monochromateur d'ordre 0 traversant le centre du piège après alignement

Cette ligne de faisceau synchrotron VUV U125_2NIM délivre des photons situés dans une gamme d'énergie entre 4 et 40 eV avec un flux autour de $10^{12}$ photons/s. L'intensité du faisceau mais aussi la résolution en énergie sont affectés par la présence des fentes au niveau de la ligne. Afin de maximiser l'intensité, nous les avons gardées grandes ouvertes, ce qui induisait une résolution en énergie de $\Delta E/E = 0{,}04$ %, c'est-à-dire au maximum une dizaine de meV pour $\Delta E$. Des recherches précédentes [116] ont montré que la largeur des bandes provoquant des transitions électroniques moléculaires est approximativement de 1 eV, ce qui montre que cette résolution est suffisante. Pour empêcher le faisceau d'être pollué par des photons d'harmoniques supérieures, nous n'avons pas utilisé le faisceau à des énergies inférieures à 13 eV.

#### 4.1.2.2 La ligne de photons X

La ligne U49-2_PGM-1 délivre un faisceau de photons X dans une gamme d'énergie comprise entre 85 et 1600 eV. Cette dernière influe sur le flux de photons qui est de l'ordre de $10^{13}$ photons/s dans l'intervalle d'énergie [85-500] eV et de l'ordre de $10^{12}$ dans l'intervalle [500-1600] eV. Comme dans le cas des énergies VUV, nous avons laissé les fentes largement ouvertes pour avoir un maximum d'intensité. La résolution en énergie est $\Delta E/E = 0{,}1$ %, c'est-à-dire $\Delta E$ de l'ordre de quelques centaines de meV. Là encore, cette résolution est suffisante pour nos études, car nous avons exploré la gamme 100-531.5 eV par pas de 50 eV minimum.

## 4.2 Résultats et discussions

### 4.2.1 Étude des espèces protonées dans la gamme d'énergie VUV

Dans cette section, nous étudierons les processus se déroulant au sein de systèmes moléculaires protonés covalents et non-covalents contenant la vancomycine et/ou un modèle de son récepteur après l'absorption d'un photon VUV dans la gamme d'énergie entre 13 eV et 32 eV. Dans un premier temps, nous présenterons l'effet de l'état de charge en montrant les résultats de la photo-absorption de la vancomycine isolée protonée, et ensuite, l'effet de la complexation sur la dissociation de la vancomycine.

#### 4.2.1.1 Vancomycine isolée protonée

Sur la figure 4.7, nous pouvons comparer les spectres de masse après absorption d'un photon VUV de la vancomycine simplement et doublement protonée. La figure du haut montre les spectres

de masse de la vancomycine simplement protonée $[V + H]^+$ après absorption d'un seul photon à 14, 20, et 32 eV. Nous constatons sur ces spectres que le pic à m/z = 1450 correspond à l'ion précurseur, son intensité est négative, à cause de la méthode d'analyse des données décrite dans la section expérimentale 4.1.1. L'axe des abscisses est étalé entre m/z = 0 et m/z = 1600. En dehors de cette gamme, il n'y a pas de pics observés. En bas de la figure 4.7, nous pouvons voir les spectres de masse de la vancomycine doublement protonée $[V+2H]^{2+}$ après absorption d'un photon unique à 14, 20 et 32 eV, le pic de l'ion précurseur étant situé à m/z = 725,5. Nous pouvons remarquer l'existence, à 14 eV et pour les deux états de charges différents, de pics dus à l'ionisation non dissociative de l'ion précurseur (notée NDI) situés à m/z = 725 pour $[V + H]^{2+}$ et à m/z = 483,7 pour $[V + 2H]^{3+}$. Ceci est cohérent avec l'énergie d'ionisation mesurée pour des peptides simplement et doublement protonés dans la gamme d'énergie 10-12 eV [117]. Tous les autres pics présents sur les spectres sont dus à la fragmentation. Dans cette gamme d'énergie, les spectres sont dominés par des pics attribués à des fragments monochargés.

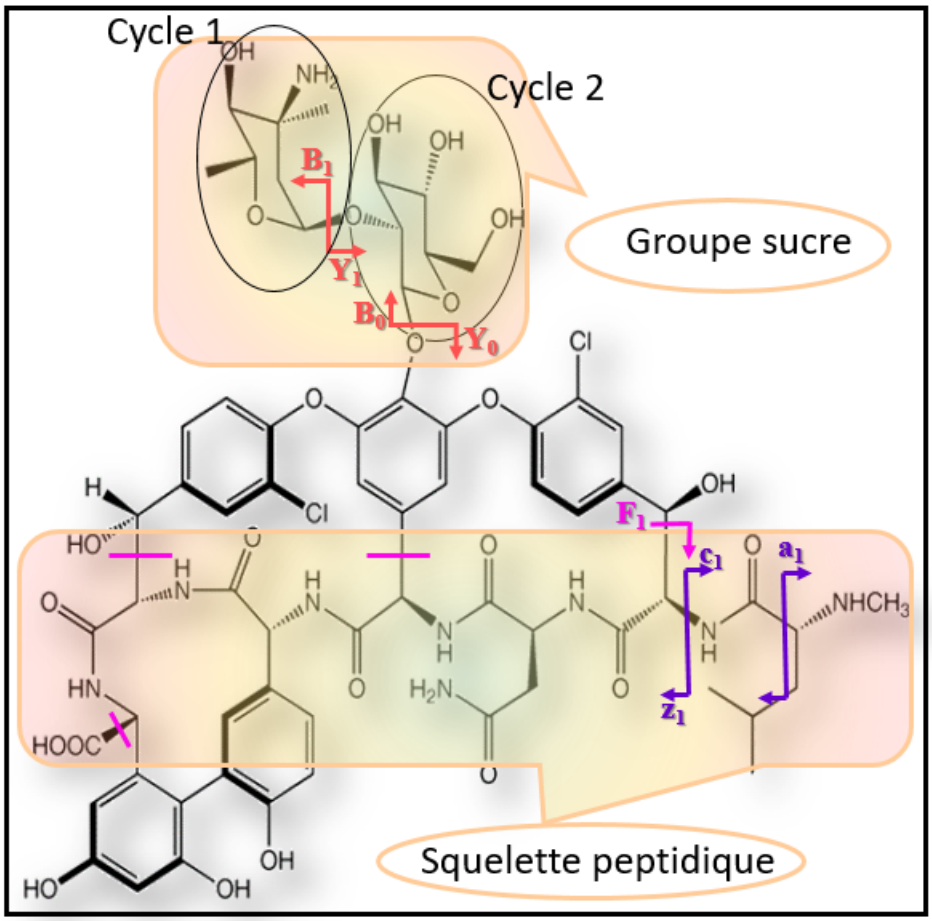


FIGURE 4.6 – Structure chimique de la vancomycine ($C_{66}\ H_{75}\ Cl_2\ N_9\ O_{24}$, masse moyenne : 1449.3 g/mol). La notation habituelle pour la fragmentation des oligosaccharides et des squelettes peptidiques est utilisée, sauf pour le fragment F créé par la rupture des trois liaisons indiquées en rose et $S_1$ et $S_2$.

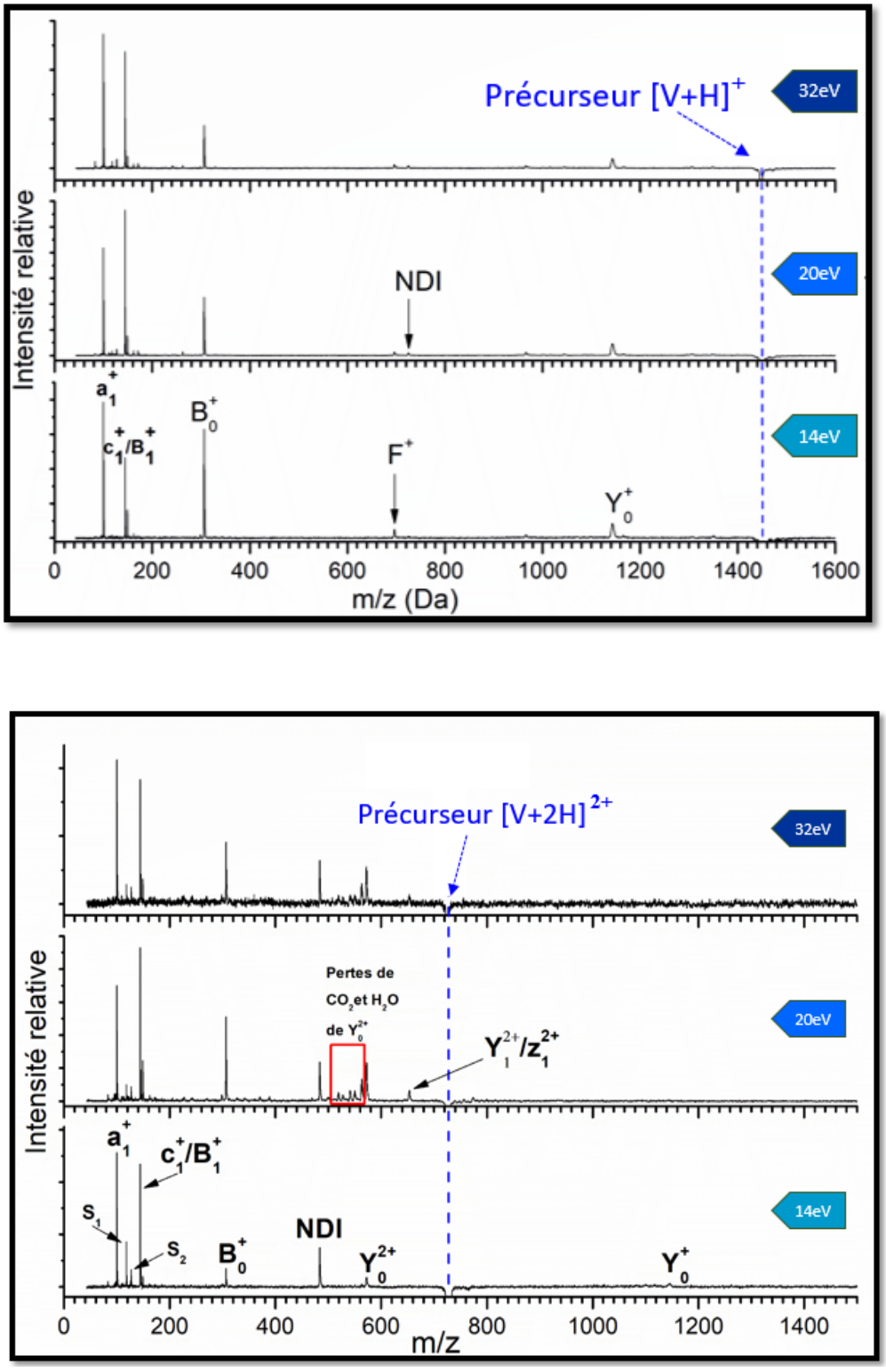


FIGURE 4.7 – Spectres de masse de la vancomycine doublement protonée (m/z = 725.5) en bas et celle de la vancomycine simplement protonée (m/z = 1450) en haut, après absorption d'un seul photon dans la gamme d'énergie entre 14 eV et 32 eV. La notation habituelle pour la fragmentation des saccharides et des peptides est utilisée sauf pour les fragments F, $S_1$ et $S_2$. NDI indique l'ionisation non dissociative. La perte des molécules neutres du fragment $Y_0^{2+}$ est aussi indiquée.

Il est intéressant de noter que la somme de m/z = 306 et m/z = 1144 correspond à la vancomycine protonée. Ces deux fragments complémentaires $B_0^+$ et $Y_0^+$ correspondent à la rupture de la liaison

glycosidique qui relie le cycle phénol central et le groupe sucre de la vancomycine (voir la fig 4.6). L'observation du pic à m/z = 144 peut venir de deux processus : l'un est la séparation des deux cycles saccharides composant le groupe sucre donnant l'ion $B_1^+$, et l'autre est la rupture de la liaison du squelette peptidique côté N-terminal donnant $c_1^+$. La perte d'une molécule $CO_2$ de cet ion $B_1^+$ pourrait expliquer la présence du pic situé à m/z = 100, mais un réarrangement compliqué serait nécessaire, nous l'avons donc attribué à l'ion fragment $a_1^+$ du squelette peptidique. Les trois pics noté $S_1^+$, $S_2^+$ et $S_3^+$ situés aux rapports m/z = 127, 118 et 82 proviennent du groupe sucre, le premier produit après une perte d'un OH du fragment $B_1^+$ (144 - 17 = 127), le deuxième correspond à une perte d'une molécule $C_2H_2$ du fragment $B_1^+$ (m/z = 144 - 26 = 118) ; le dernier est formé de la perte d'un $CH_4O_4$ du cycle 2 du groupe sucre (m/z = 162 - 80 = 82). Le pic noté $F^+$ situé à m/z = 696 correspond à la rupture des trois liaisons entre le squelette peptidique et le cycle central contenant les trois cycles benzéniques avec la perte de $CO_2H$ (voir la figure 4.6). Ces fragments ont été observés et rapportés par Florencio et al suite à des expériences de dissociation induite par collision de $[V+H]^+$ sur de l'argon et de l'hélium en phase gazeuse à une énergie cinétique de l'ordre de 4 keV, qui permet d'atteindre l'ionisation [118].

D'autres pics apparaissent sur les spectres de la vancomycine doublement protonée. Par exemple celui à m/z =1144 ($Y_0^+$) est également détecté doublement chargé $Y_0^{2+}$ à m/z = 572. Nous nous attendons à ce que les deux protons soient liés au groupe disaccharide (plus précisément son groupement $NH_2$) et au N-terminal du peptide (ces deux groupements sont les plus basiques. De plus, ils peuvent s'éloigner vu la flexibilité du groupe sucre, ce qui diminue la répulsion coulombienne). Le fragment $Y_0$ ne devrait donc conserver qu'un seul proton, et donc une seule charge. Par conséquent, on s'attend à ce que le fragment $Y_0^{2+}$ soit formé après une ionisation. La présence de l'ionisation dissociative est confirmée par la présence à 20 et 32 eV d'un pic situé à m/z = 653 qui correspond au fragment de masse 1306 mais doublement chargé ($Y_1^{2+}$), complémentaire du fragment $B_1^+$. De plus, à 20 eV, on observe des pics correspondant à des pertes multiples et successives de $H_2O$ et $CO_2$ du fragment $Y_0^{2+}$. En augmentant l'énergie du photon, les mêmes pics sont observés mais leur abondance relative change. Afin d'avoir une meilleure compréhension des processus menant à la fragmentation de la vancomycine, nous présentons dans la figure 4.8 l'évolution des différents fragments détectés après absorption d'un seul photon en fonction de l'énergie du photon VUV.

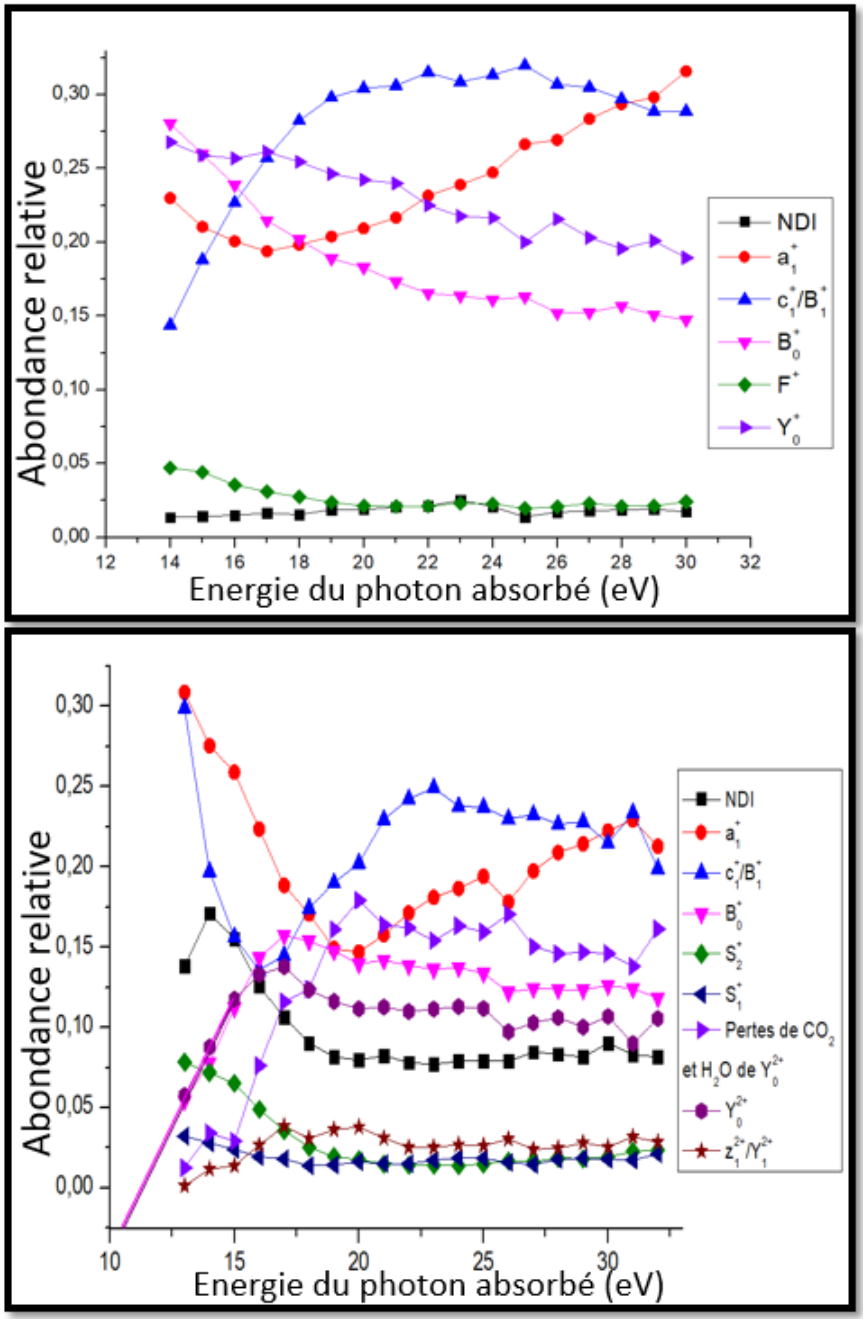


FIGURE 4.8 – Abondance relative des ions produits après photo-absorption de la vancomycine simplement protonée en haut et doublement protonée en bas, en fonction de l'énergie du photon.

Pour les deux états de charges, les abondances des fragments $B_0$ et $Y_0$ montrent la même évolution sur toute la gamme d'énergie, ce qui confirme qu'ils proviennent de la rupture de la même liaison. Il est intéressant d'observer pour la vancomycine à proton unique $[V+H]^+$ que l'abondance de $B_0^+$ diminue plus rapidement que celle de $Y_0^+$, tandis que le fragment $c_1^+/B_1^+$ augmente. Ceci pourrait s'expliquer par une fragmentation secondaire de $B_0^+$ en $B_1^+$. De plus, $Y_0^+$ se fragmente en $a_1^+$, dont l'abondance augmente à partir de 17 eV. Ces processus de fragmentation secondaire sont connus en CID à basse énergie de molécules protonées, en particulier de peptides, et ont été expliqués par une

augmentation de l'énergie vibrationnelle transférée au système [42]. En ce qui concerne $[V+2H]^{2+}$, l'extrapolation à 0 de la partie linéaire de l'abondance des deux fragments complémentaires $B_0^+$ et $Y_0^{2+}$ entre les énergies 14 et 16 eV donne une valeur de 11 eV qui est située dans la gamme d'énergie d'ionisation des peptides doublement protonés (voir la figure 4.8), ce qui peut s'expliquer par une faible énergie d'activation de la rupture de la liaison glycosidique. L'abondance relative de la somme des pertes de $CO_2$ et $H_2O$ de $Y_0^{2+}$ augmente parallèlement à celles de $Y_0^{2+}$ et $B_0^+$ entre les énergies 15 et 20 eV, avec un décalage autour de 2 eV, attribuable à l'énergie d'activation de ce processus. Des énergies d'activation de quelques eV ont également été mesurées par Canon et al. pour des pertes de molécules neutres après photo-ionisation du peptide substance P [119].
En résumé, nous avons observé que la photo-absorption dans la gamme d'énergie [13-32] eV de la vancomycine isolée induit principalement la fragmentation, notamment la rupture de la liaison glycosidique due à une faible énergie d'activation. Des fragments provenant du squelette peptidique sont également observés et produisent les ions $a_1^+$ et $c_1^+$. Un résultat intéressant observé est la formation des fragments après une ionisation attribués à des processus de fragmentation secondaire dus à une augmentation de l'énergie vibrationnelle transférée au système.

#### 4.2.1.2 Effet de la dimérisation

Pour étudier les effets de la complexation sur les processus induits par la photo-absorption, nous avons étudié le dimère de la vancomycine triplement protonée. Les résultats sont présentés sur la figure 4.9 après photo-absorption d'un photon VUV unique à 14, 20 et 32 eV. Étant donné que le système initial contient probablement une vancomycine doublement chargée, il est surprenant de détecter principalement des espèces simplement chargées. Nous pouvons remarquer en majorité les mêmes fragments déjà observés pour la vancomycine isolée. Le seul ion doublement chargé est attribué à la vancomycine intacte : en effet, ici la résolution en masse n'est pas suffisante pour distinguer $[V+2H]^{2+}$ de $[V_2+3H]^{4+}$, mais elle l'est pour les expériences avec des photons X (voir partie 4.2.3), c'est pour cela qu'on l'attribue à $[V+2H]^{2+}$. Sa présence ainsi que celle de la vancomycine simplement protonée sont dues à la rupture des liaisons non-covalentes entre les deux vancomycines, ce qui n'est pas surprenant puisque ces liaisons sont moins énergétiques que les liaisons covalentes. Cependant, un pic très intéressant est situé à m/z = (1451+1144)/3 = 865, correspondant au complexe triplement chargé $(V+Y_0)^{3+}$ entre la vancomycine doublement protonée et le fragment $Y_0^+$. Cela indique une perte de l'ion fragment $B_0^+$ de la vancomycine après ionisation du dimère sans la rupture de toutes les liaisons non-covalentes reliant les deux molécules. Ce processus a été observé pour le dimère d'eremomycine triplement protoné (un antibiotique similaire à la vancomycine) après dissociation

par capture d'électron pour laquelle les réactions radicalaires dominent [120].

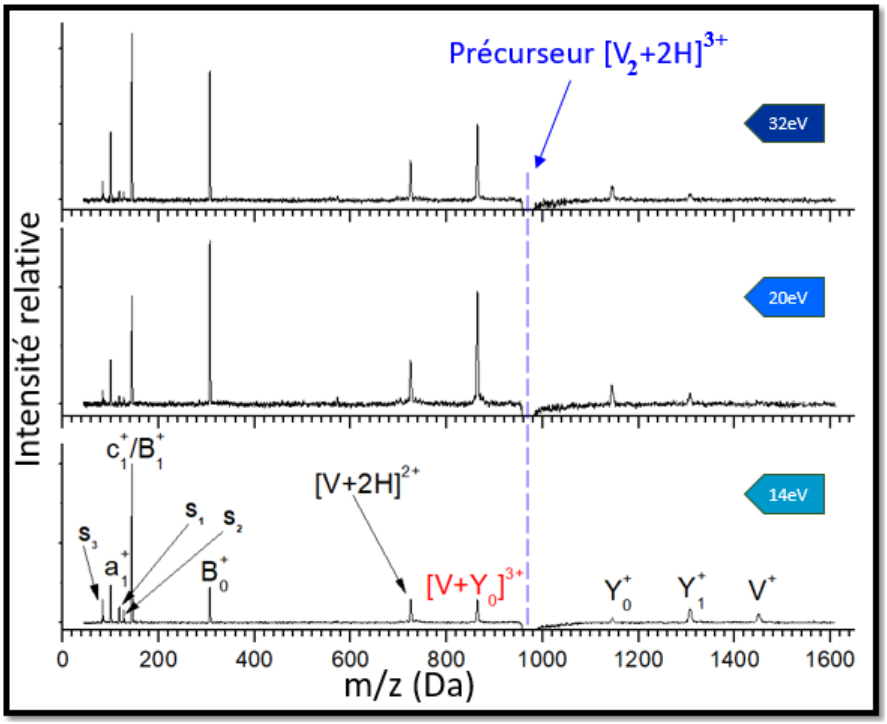


FIGURE 4.9 – Spectre de masse du dimère de la vancomycine $[V_2 + 3H]^{3+}$ (m/z=967) après absorption d'un unique photon pour une énergie comprise entre 14 et 32 eV. La même nomenclature que celle de la vancomycine seule a été utilisée. Le complexe entre la vancomycine et le fragment $Y_0$ est indiqué en rouge.

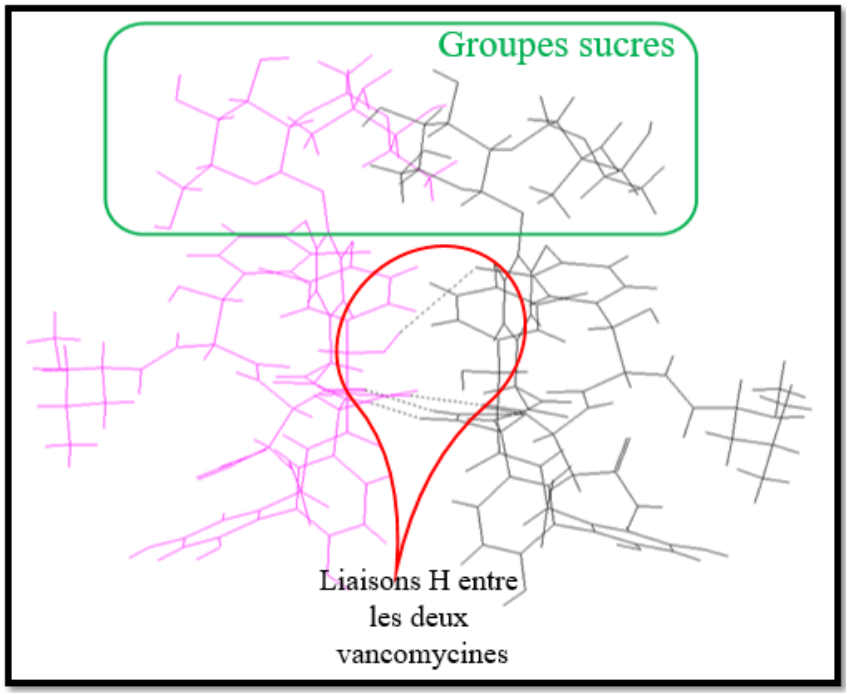


FIGURE 4.10 – Structure cristallographique du dimère de la vancomycine issue de la Protein Data Bank (PDB 1AA5), avec les liaisons H intermoléculaires représentées en tirets et entourées en rouge, et les deux molécules de vancomycine colorées de rose et noir. Les groupes sucres sont encadrés en vert.

Il pourrait s'expliquer par une énergie d'activation inférieure à l'énergie de liaison entre les deux molécules de vancomycine. Lorsqu'on observe la structure cristallographique du dimère de la vancomycine sur la figure 4.10, nous pouvons voir que les deux vancomycines sont liées par quatre fortes liaisons hydrogènes, ce qui signifie qu'il y a une énergie de liaison élevée. De plus, le groupe sucre de chaque vancomycine n'est lié au reste du système que par la liaison glycosidique. Si cette structure est conservée en phase gazeuse, on peut s'attendre à la rupture de la liaison glycosidique après ionisation comme nous l'avons vu pour la vancomycine isolée (voir la partie 4.2.1.1), conduisant à la formation du fragment $B_0^+$ qui peut facilement quitter l'ion complexe $(V + Y_0)^{3+}$.

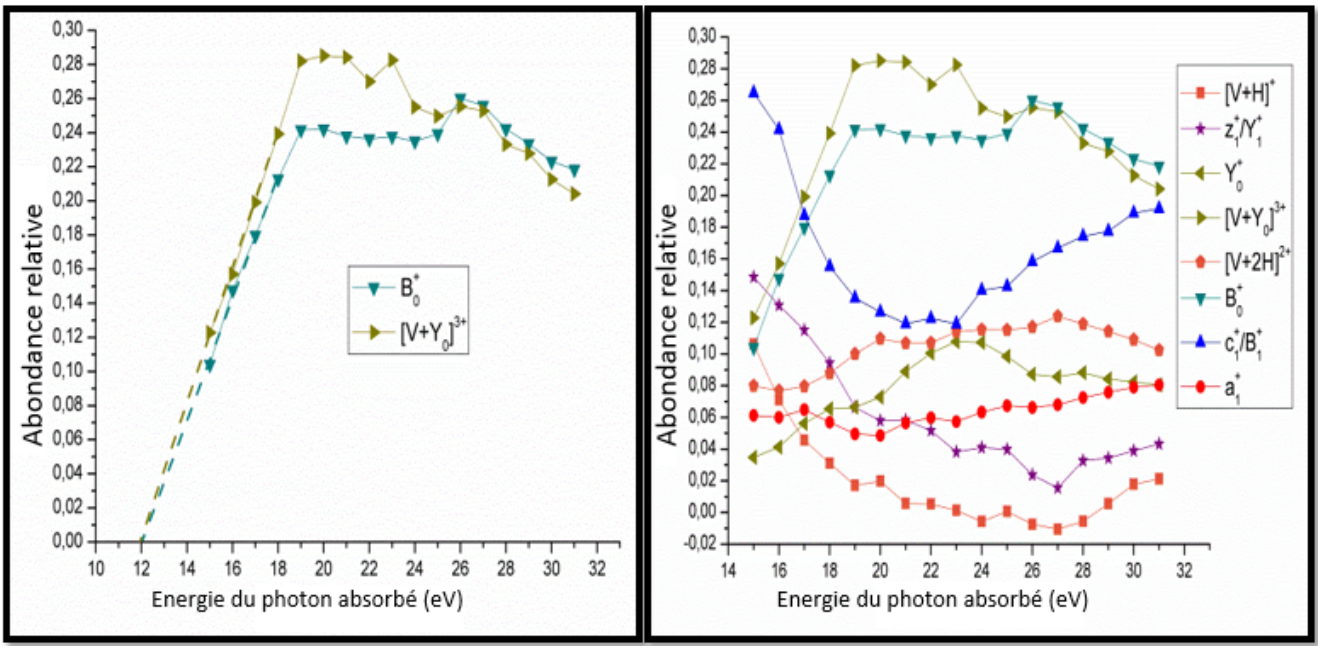


FIGURE 4.11 – A droite, l'évolution de l'abondance des différents ions formés après photo-absorption dans les énergies VUV du dimère de la vancomycine. A gauche, les lignes pointillées sont présentes pour guider la lecture de la valeur d'énergie correspondant à une abondance des fragments $B_0^+$ et $Y_0^{2+}$ extrapolée à zéro.

Pour obtenir des informations supplémentaires sur la réponse du dimère à l'absorption d'un photon VUV, la figure 4.11 présente l'évolution de l'abondance des fragments détectés en fonction de l'énergie du photon absorbé. Tout d'abord, nous pouvons remarquer que l'abondance des ions complémentaires $(V + Y_0)^{3+}$ et $B_0^+$ est presque identique, comme les ions $Y_0^{2+}$ et $B_0^+$ pour la vancomycine isolée. Cela confirme notre hypothèse précédente. Leur augmentation linéaire de 14 à 19 eV indique qu'ils proviennent de l'ionisation du dimère $(V_2 + 3H)^{3+}$. L'énergie d'ionisation du dimère devrait être proche de la valeur de 12 eV obtenue par une extrapolation de leurs abondances à zéro [117], indiquant une faible énergie d'activation de la rupture de la liaison glycosidique, comme pour la vancomycine isolée. L'abondance des fragments complémentaires $c_1^+/B_1^+$ et $z_1^+/Y_1^+$, ainsi que de

$[V+H]^+$ baisse dans la même gamme d'énergie, ce qui signifie que ces espèces ne sont pas dues à l'ionisation. Ce n'est pas surprenant d'observer ce processus car nous avons récemment expliqué un comportement similaire pour des complexes de peptides protonés par une photo-excitation suivie d'une conversion interne puis de la fragmentation dans l'état fondamental [121]. De plus, la tendance similaire de leurs évolutions indique qu'ils sont formés par le même processus : a priori, une photo-excitation du dimère suivie par la séparation des deux molécules en $[V+H]^+$ et $[V+2H]^{2+}$ et d'une fragmentation de la vancomycine doublement protonée donnant les ions $c_1^+/B_1^+$ et $z_1^+/Y_1^+$. Le fait que l'abondance $[V+H]^+$ soit plus petite que celle des ions complémentaires $c_1^+/B_1^+$ et $z_1^+/Y_1^+$ peut venir du fait que $[V+H]^+$ se fragmente en donnant majoritairement les ions $c_1^+/B_1^+$, puisque leur abondance est la plus élevée. Ainsi, le dimère de vancomycine constitue un autre exemple montrant que la photo-absorption à une énergie supérieure au seuil d'ionisation peut mener à l'excitation.

#### 4.2.1.3 Modèle du récepteur

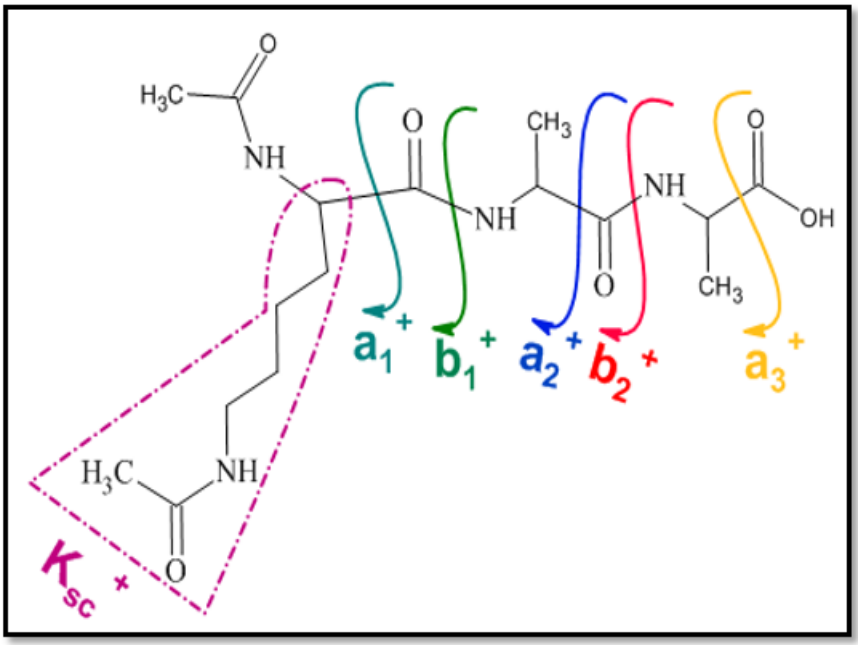


FIGURE 4.12 – La structure chimique du modèle du récepteur $Ac_2^L K^D A^D A$. La notation habituelle pour la fragmentation des peptides est utilisée, excepté pour le fragment $K_{sc}^+$, incluant la chaîne latérale de la lysine et indiqué en pointillés.

Nous avons également étudié le tri-peptide $Ac_2^L K^D A^D A$, appelé "récepteur" dans la suite et composé de 3 acides aminés (Lysine, Alanine, Alanine). Sa structure chimique est illustrée dans la figure 4.12. Ce peptide est un modèle du récepteur de la vancomycine (voir l'introduction de la partie 4). Il contient deux groupes acétyles notés Ac, qui sont liés au N-terminal et au N de la chaîne latérale de la lysine pour inhiber la protonation. En effet, si les groupes $NH_2$ de la lysine et du N-terminal

étaient conservés, ils seraient protonés en solution, modifiant les interactions entre la vancomycine et le modèle de son récepteur. Car en phase condensée, la chaîne latérale de la lysine n'intervient pas dans la reconnaissance moléculaire, et de plus, le squelette peptidique du vrai récepteur est plus long que le tri-peptide. Par ailleurs, la sélectivité de cette reconnaissance vis-à-vis des énantiomères D des alanines est connue [109], nous avons donc choisi le peptide reconnu par la vancomycine.
La figure 4.13 présente les spectres de masse obtenus après absorption d'un photon de 18 eV pour le peptide $Ac_2^L K^D A^D A$ et son dimère simplement protoné. Nous pouvons tout d'abord mentionner que les résultats sont présentés uniquement pour l'énergie 18 eV puisque les spectres sont quasiment équivalents en changeant l'énergie du photon. Nous pouvons remarquer que les spectres sont dominés par des pics attribués à des fragments monochargés provenant du squelette peptidique, principalement $a_1^+$, $a_2^+$, $b_1^+$ et $b_2^+$ mais aussi des fragments internes de rapport m/z inférieur à 150, dus à la rupture d'au moins deux liaisons proches du résidu de lysine.

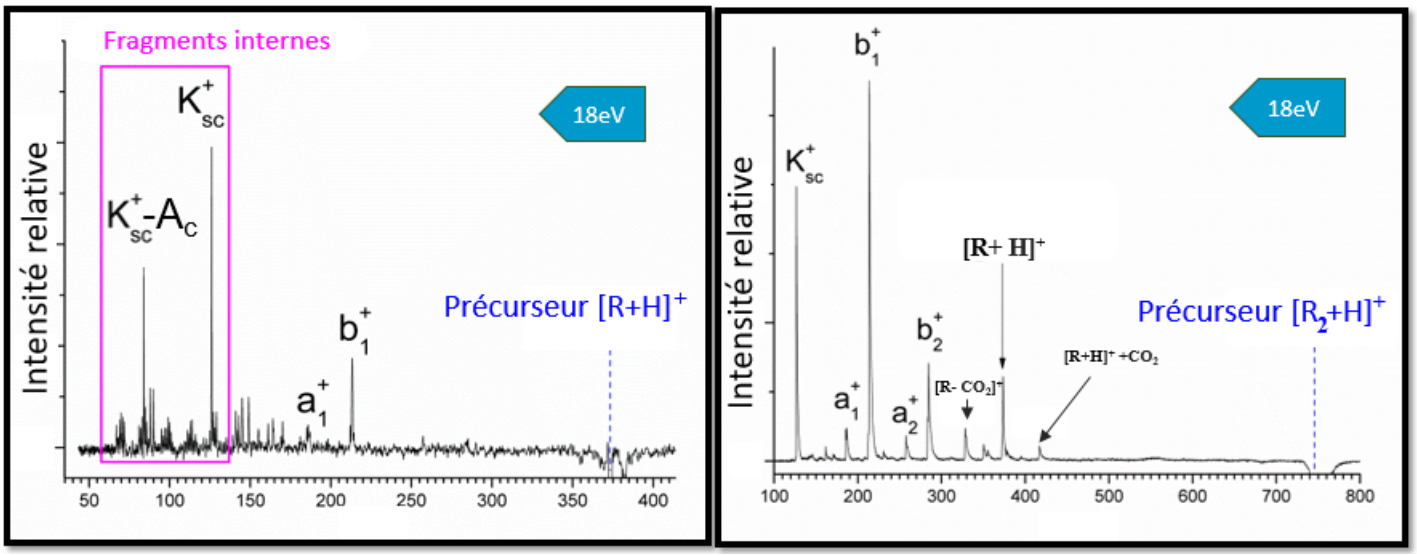


FIGURE 4.13 – Les spectres de masse du peptide $Ac_2^L K^D A^D A$ simplement protoné à gauche, et du dimère à droite après absorption d'un seul photon d'énergie 18 eV. La notation habituelle pour la fragmentation des peptides est utilisée, voir la figure 4.12

Les plus intenses sont à m/z = 126 et à m/z = 84 et nous les avons attribués à la rupture des deux liaisons autour du $C_\alpha$ lié à la chaîne latérale du résidu de lysine, sans et avec la perte du groupe acétyle du résidu de lysine après un transfert de H ou de proton. Le fragment $b_1^+$ situé à m/z = 213 a déjà été observé par Z.Yang et co. [122] après dissociation de $[V+Ac_2KAA+H]^+$ induite par collision sur une surface, où la dissociation est due au transfert du proton à l'état électronique fondamental après un dépôt d'énergie interne vibrationnelle, comme c'est le cas pour des collisions à faible énergie avec un gaz rare [42]. Cela indique que le même mécanisme explique la présence de ce fragment du squelette peptidique dans les spectres de masse. La dominance de $b_1^+$ ainsi que

la présence des fragments $a_2^+$ à m/z = 256 et $b_2^+$ à 284 dans le cas du dimère du récepteur et non du monomère est due probablement au doublement de la taille du système moléculaire, qui permet de redistribuer l'énergie vibrationnelle déposée parmi deux fois plus de degrés de liberté, ce qui diminue la fragmentation multiple. La dissociation intermoléculaire du dimère du récepteur explique la présence du monomère protoné intact $[R+H]^+$ à m/z = 373, ce qui n'est pas surprenant, puisqu'on a vu le même processus pour le dimère de la vancomycine. Mais le plus intéressant, ce sont les deux pics autour de celui du récepteur protoné, que nous attribuons au récepteur protoné qui a gagné une molécule de $CO_2$, situé à m/z = 417 et au récepteur ionisé radicalaire qui a perdu une molécule de $CO_2$ à m/z = 328. Pour en savoir plus sur le processus sous-jacent, nous avons effectué une recherche de conformation par dynamique moléculaire avec échange de répliques appelée REMD [123], appliquée pour étudier le dimère du récepteur protoné afin de connaître sa structure géométrique. C'est une méthode d'échantillonage accélérée en utilisant de hautes températures permettant de simuler des transitions de conformation qui ne sont pas observables à la température classique appliquée lors de simulations à 300K puisqu'ils ont de grandes barrières d'énergie libre [113] [123].

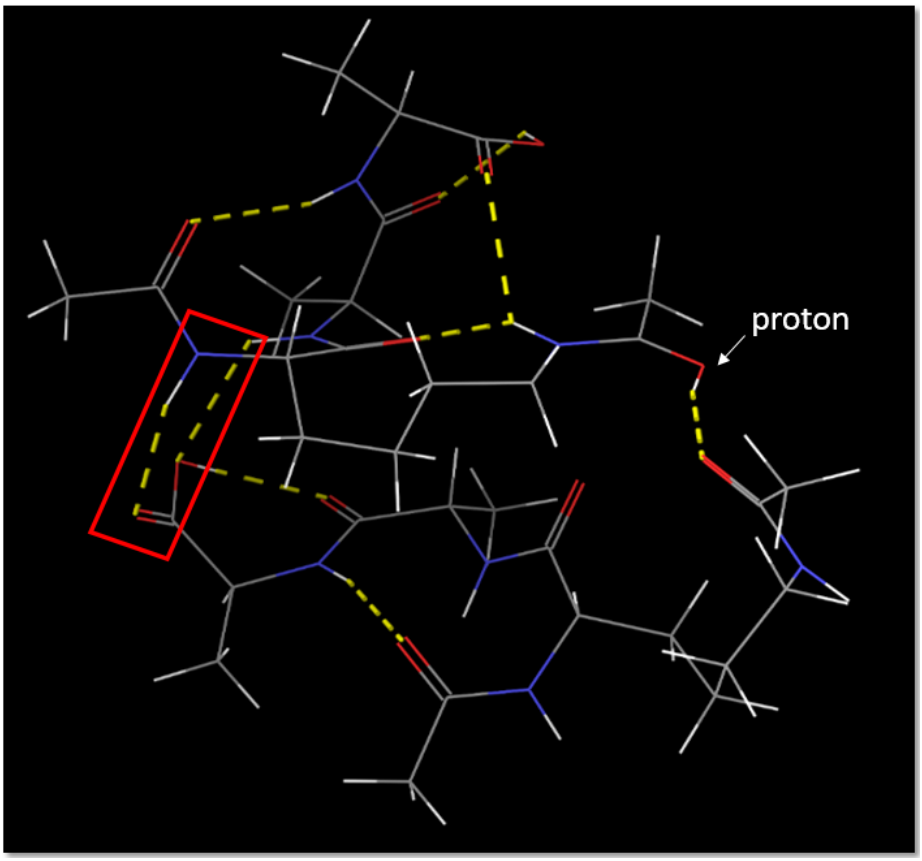


FIGURE 4.14 – La structure de plus basse énergie du dimère de récepteur protoné issue d'une recherche de conformation par dynamique moléculaire avec échange de répliques. Les liaisons H inter- et intra-moléculaires sont indiquées en pointillés jaunes. Celles impliquant le groupe $CO_2H$ du récepteur neutre attaché au récepteur protoné sont encadrés en rouge.

Le site de protonation montré sur la figure 4.14 est choisi au niveau de l'atome d'oxygène du groupe acétyle de la chaîne latérale de la lysine qui a remplacé le groupement $NH_2$ qui possède l'affinité protonique la plus élevée dans la molécule. Nous avons utilisé le champ de force AMBER99 [124] et 30 répliques qui ont été simulées à différentes températures suivant une progression géométrique allant de 20 à 600 K. Chaque réplique a été propagée pendant 20 ps afin d'atteindre l'équilibre thermique, puis pendant 2 ns supplémentaires par pas de 1 fs, la structure étant enregistrée toutes les 40 ps. Le thermostat Berendsen [125] a été utilisé pour contrôler l'équilibre thermique avec une constante de couplage de 0,1 $ps^{-1}$. Toutes les structures ainsi trouvées ont été optimisées avec AMBER99, puis la conformation de plus basse énergie du système a été optimisée au niveau B3LYP / 6-31g(d) grâce au logiciel Gaussian09 [126]. La figure 4.14 représente cette structure. Le groupe $CO_2H$ du récepteur neutre est lié au récepteur protoné $[R+H]^+$ par deux liaisons H encadrées en rouge sur la figure : par conséquent, l'observation du $CO_2$ attaché au récepteur protoné $[R+H]^+$ pourrait signifier qu'après ionisation du récepteur neutre, il y a un transfert d'hydrogène du $CO_2H$ vers le groupement $CO$, la rupture de la liaison $C-CO_2$, puis séparation des deux peptides. Cela implique que ces deux liaisons H non-covalentes restent intactes après la rupture d'une liaison covalente. Cela peut être dû à une faible énergie d'activation indiquant que des processus radicalaires sont à l'origine de ces observations. Des mécanismes radicalaires ont déjà été évoqués dans des peptides déprotonés contenant des groupements carboxyles pour expliquer la perte d'une molécule de $CO_2$ [127].

#### 4.2.1.4 Effet de la complexation du modèle du récepteur avec la vancomycine

Après irradiation de la vancomycine et du modèle de son récepteur isolés, nous allons désormais nous intéresser au cas du complexe non-covalent entre les deux molécules, dans le cas où le récepteur n'est pas dans la poche de liaison de la vancomycine, c'est-à-dire en l'absence des liaisons impliquées dans la reconnaissance moléculaire. Les spectres de masse du complexe non-covalent doublement protoné $[V+R+2H]^{2+}$ après absorption d'un photon unique à 14, 20 et 32 eV sont présentés sur la figure 4.15. Nous pouvons directement remarquer l'absence du complexe ionisé intact qui devrait se situer à m/z = 607,7, bien que l'énergie d'ionisation soit probablement inférieure à 14 eV. Cela montre que le complexe se fragmente systématiquement après photo-absorption, sans doute en raison d'une faible énergie de liaison. Nous détectons également la vancomycine doublement chargée ainsi que le récepteur simplement protoné, qui sont des fragments complémentaires après ionisation. La vancomycine ayant une affinité protonique beaucoup plus élevée que le récepteur $Ac_2^LK^DA^DA$, il est fortement probable que la vancomycine soit doublement protonée dans le complexe et que le récepteur soit neutre, comme l'ont montré des expériences de spectroscopie IRMPD [113]. Ceci

pourrait impliquer un transfert intermoléculaire de proton de la vancomycine vers le récepteur après la photo-absorption. Nous pouvons clairement remarquer qu'il y a des fragments déjà observés dans les spectres de la vancomycine isolée et de $Ac_2^L K^D A^D A$ isolé : ceci peut s'expliquer par la dissociation du complexe suivie de la fragmentation de la vancomycine et/ou du peptide, due au transfert d'énergie interne après photo-absorption.

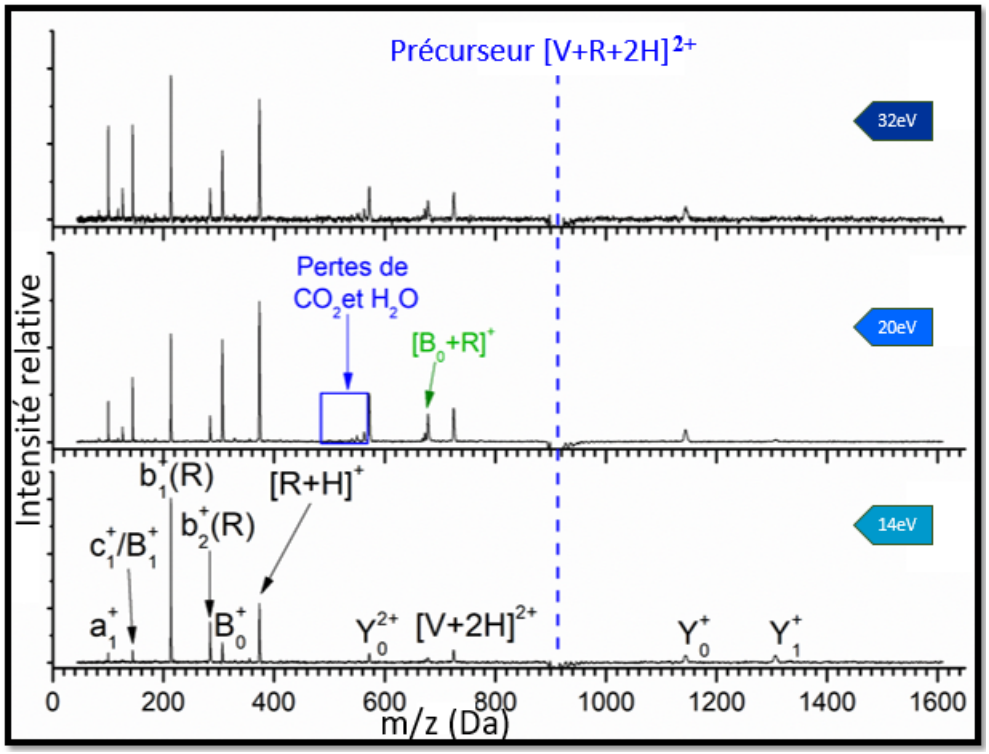


FIGURE 4.15 – Spectres de masse du complexe doublement protoné (m/z 911,5) entre la vancomycine et le peptide $Ac_2K^DA^DA$ après absorption d'un seul photon de 14, 20 et 32eV. La notation habituelle pour la fragmentation des oligosaccharides et des squelettes peptidiques est utilisée. Les lettres 'V' et 'R' désignent respectivement la vancomycine et le récepteur. Les pertes de molécules neutres du fragment $Y_0^{2+}$ de la vancomycine sont encadrées en bleu.

Il est également intéressant de constater que les pertes de molécules neutres $CO_2$ et $H_2O$ de $Y_0^{2+}$ sont beaucoup moins intenses que pour la vancomycine doublement chargée (voir la figure 4.7), ce qui confirme que leur formation est également due au transfert d'énergie vibrationnelle. Comparée au cas de vancomycine isolée, cette énergie est redistribuée en une quantité plus grande de degrés de liberté. Nous pouvons observer un pic situé à m/z = 678. Il est intéressant de mentionner qu'il est absent de tous les spectres présentés précédemment ; nous l'attribuons au complexe noté $[B_0 + R]^+$ entre le fragment $B_0^+$, provenant de la rupture de la liaison glycosidique de la vancomycine, et le peptide neutre $Ac_2^L K^D A^D A$. Le fragment complémentaire est $Y_0$, que nous détectons simplement chargé et doublement chargé. Le fait qu'on observe ce fragment $[B_0 + R]^+$ implique la rupture de la liaison glycosidique sans la rupture de toutes les liaisons H qui relient le groupe sucre et le récepteur

dans le complexe doublement protoné [113]. C'est le second exemple de ce type avec le dimère de la vancomycine, et dans les deux cas c'est la liaison glycosidique qui se rompt.

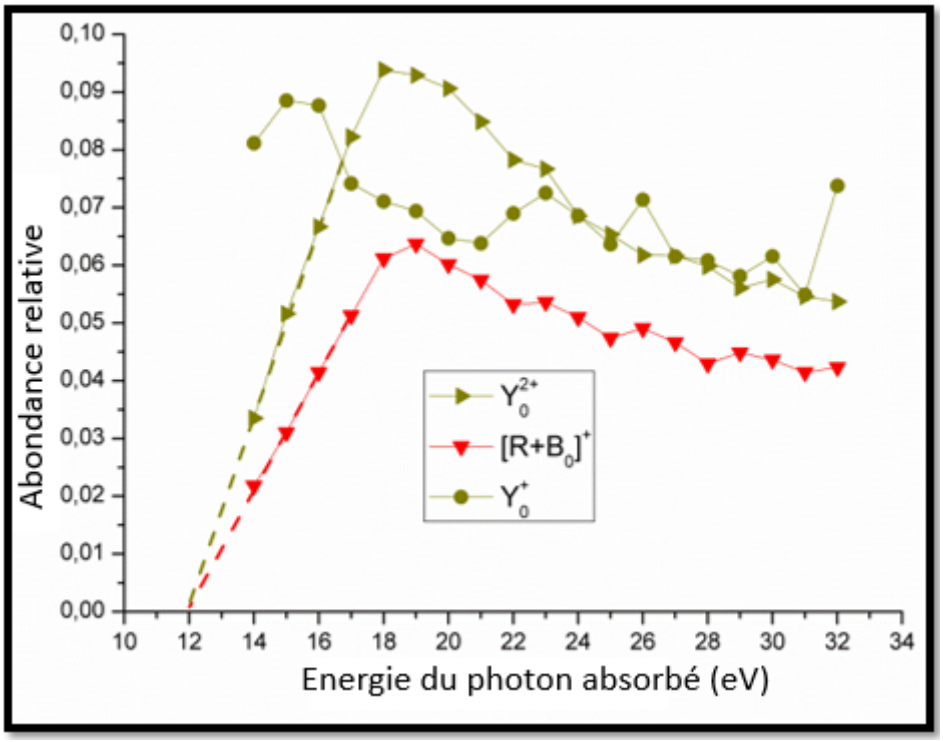


FIGURE 4.16 – Abondance relative de trois fragments formés après absorption d'un seul photon par le complexe $[V+R+2H]^{2+}$ en fonction l'énergie du photon VUV. Les pointillés sont présents pour guider la lecture de la valeur de l'énergie du photon qui correspond à une abondance nulle.

Pour savoir si ce processus est déclenché par l'ionisation, comme c'est le cas du dimère de la vancomycine, nous montrons dans la figure 4.16 les abondances relatives du fragment $[B_0+R]^+$ et des deux fragments $Y_0^+$ et $Y_0^{2+}$ en fonction de l'énergie du photon absorbé. Nous pouvons constater que les abondances de $[B_0+R]^+$ et $Y_0^{2+}$ augmentent linéairement entre 14 eV et 17 eV. Afin d'extraire leur énergie d'apparition, nous extrapolons ces deux droites et nous trouvons une valeur commune égale à 12 eV. Cette valeur est identique à celle observée pour le dimère de la vancomycine (voir figure 4.11) et très proche de celle de la vancomycine isolée (voir figure 4.8), indiquant le même mécanisme : l'ionisation de la vancomycine, suivie de la rupture de la liaison glycosidique avec une faible énergie d'activation. De plus, nous observons dans le complexe entre la vancomycine et le modèle de son récepteur que le fragment $B_0^+$ reste lié au peptide $Ac_2^LK^DA^DA$ alors que ce n'est pas le cas du dimère de la vancomycine où le fragment $Y_0^{2+}$ reste attaché à la vancomycine. Ceci est cohérent avec la structure de ces complexes : en effet, dans le complexe $[V+R+2H]^{2+}$, le groupement $NH_3^+$ du sucre établit des liaisons H fortes avec des groupements carbonyles du récepteur neutre [113]. L'abondance du fragment $Y_0^+$ n'est pas corrélée avec celle du complexe $[B_0+R]^+$, ce qui tendrait à montrer qu'ils

sont probablement formés par des mécanismes différents. Ces résultats confirment l'influence de la structure géométrique sur la fragmentation des complexes non-covalents induite par photo-ionisation.

A présent, nous allons nous intéresser à l'évolution de la somme des abondances de tous les fragments du récepteur et de ceux de la vancomycine, ainsi qu'à celles de l'abondance du récepteur intact et de la vancomycine (voir la figure 4.17).

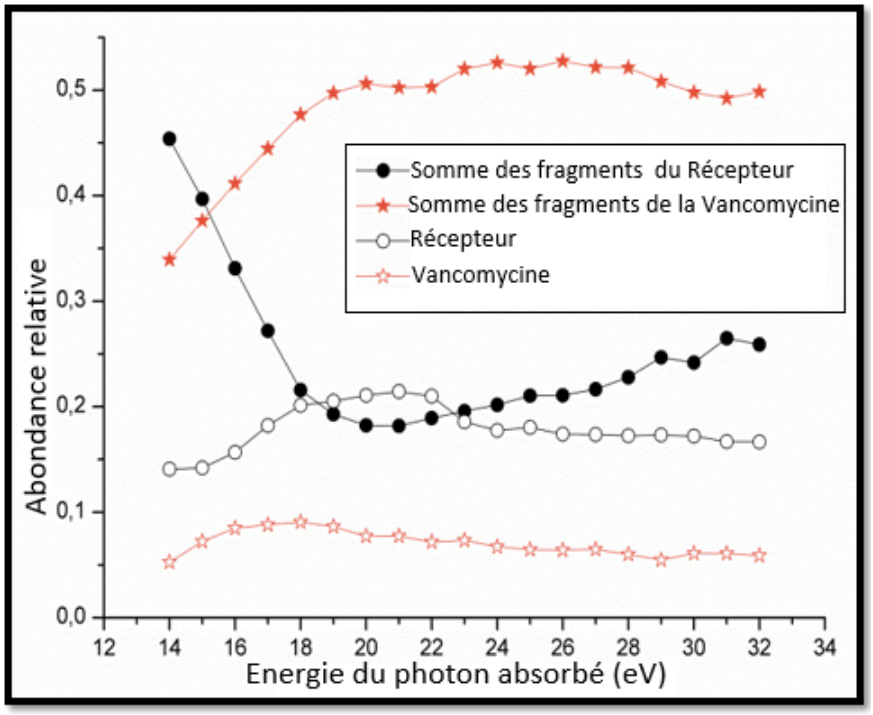


FIGURE 4.17 – Somme des abondances relatives des fragments du récepteur et de ceux de la vancomycine produits après photo-absorption VUV. L'abondance du récepteur protoné intact et de la vancomycine intacte sont indiqués par «Récepteur» et «Vancomycine», respectivement.

Entre 14 et 20 eV, nous observons une tendance inverse et le croisement autour de 15 eV des sommes des abondances des fragments du récepteur et de la vancomycine. La fragmentation du récepteur est dominante pour les basses énergies et c'est l'inverse pour la vancomycine. De plus, l'abondance du récepteur intact protoné suit une tendance opposée à celle de la somme des fragments du récepteur, mais sans la compenser ; ce qui signifie que tous les fragments ne proviennent pas du récepteur protoné. Nous attribuons cette contribution complémentaire à l'ionisation du récepteur neutre suivi de sa fragmentation. Lorsque l'énergie augmente, l'ionisation de la vancomycine devient plus probable. Elle peut donner naissance à un transfert de proton entre la vancomycine et le récepteur, suivi par la dissociation du complexe et le détachement de $[R+H]^+$, dont l'abondance augmente entre 14 et 20 eV, comme les processus liés à la photo-ionisation. L'augmentation de l'énergie du photon au delà de 20 eV entraîne une diminution de l'abondance de $[R+H]^+$ intact due à

sa fragmentation et compensée par une augmentation de la somme de tous les fragments du récepteur.

Dans le but d'approfondir nos études sur l'effet de la complexation non-spécifique du modèle du récepteur avec la vancomycine, nous allons nous intéresser au complexe entre la vancomycine et deux peptides $Ac_2^L K^D A^D A$. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 4.18. Nous pouvons noter qu'il n'y a pas de changement majeur sur les spectres, par rapport au complexe avec un seul récepteur $Ac_2^L K^D A^D A$ : en effet, seuls deux nouveaux pics apparaissent. L'un est visible au rapport m/z = 962 et est attribué au complexe entre le fragment $B_0^+$ correspondant à la rupture de la liaison glycosidique de la vancomycine, un des deux récepteurs ainsi qu'un fragment $b_2^+$ du deuxième récepteur.

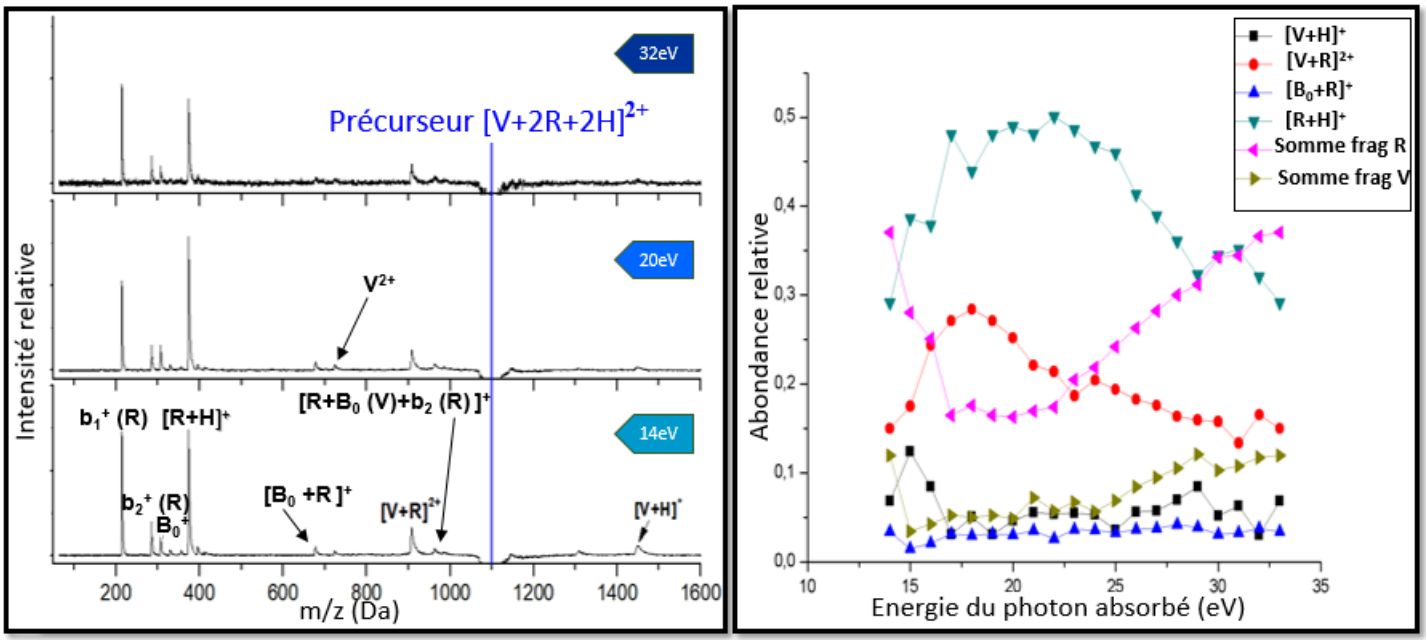


FIGURE 4.18 – À gauche, spectres de masse du complexe entre la vancomycine et deux peptides $Ac_2^L K^D A^D A$ (m/z = 1097,5) après absorption d'un unique photon à 14, 20 et 32eV. À droite, abondance relative des différentes voies de relaxation après photo-absorption de $[V + 2R + 2H]^{2+}$ en fonction de l'énergie du photon, montrant ainsi la somme de tous les fragments produits du récepteur et de la vancomycine.

A notre connaissance, ceci constitue un exemple inédit de rupture de deux liaisons covalentes induit par absorption d'un photon unique, avec conservation des liaisons non-covalentes liant trois espèces moléculaires. Le second pic, plus intense, est attribué au complexe doublement chargé entre la vancomycine et le récepteur, formé après la perte d'un peptide neutre dû à la photo-excitation ou d'un cation radicalaire ou protoné du peptide après la photo-ionisation. La présence de ce complexe intact est probablement due à l'augmentation de la taille du système, permettant la redistribution de l'énergie vibrationnelle déposée par le photon en une quantité plus grande de degrés de liberté par rapport au complexe avec un seul récepteur. Nous pouvons mentionner que l'absence des fragments

en dessous de m/z = 200 sur les spectres est due à l'élévation du seuil de piégeage, causée par une valeur de l'amplitude de la tension RF du piège plus élevée que dans le cas du complexe entre la vancomycine et un seul récepteur. Nous pouvons directement observer que les spectres sont dominés par la présence du peptide protoné et de ses fragments, probablement à cause de la présence de deux récepteurs. La présence du récepteur protoné peut être expliquée par deux processus : un transfert de proton de la vancomycine (comme il a été montré précédemment pour le complexe avec un récepteur), mais aussi une simple dissociation du complexe s'il est composé d'une vancomycine protonée et d'un dimère de récepteur protoné. Il est à noter que le fait d'observer des évolutions très similaires des fragments complémentaires $[R + H]^+$ et $[V + R]^{2+}$ indique qu'ils sont formés par le même processus d'ionisation. L'abondance plus faible du complexe $[V + R]^{2+}$ pourrait être expliquée par une fragmentation supplémentaire. La somme des abondances des fragments du récepteur et de ceux de la vancomycine augmentent à partir de 20 eV tandis que baissent l'abondance du récepteur intact et celle du complexe entre la vancomycine et son récepteur, ce qui indique un dépôt d'énergie croissant menant à leur fragmentation.

Lors de cette première partie dédiée aux résultats, nous avons pu étudier la photo-absorption VUV des espèces protonées. Afin de comprendre l'influence et les effets du signe de l'ion et de la structure géométrique, nous allons présenter maintenant la photo-absorption des espèces déprotonées.

### 4.2.2 Études des espèces déprotonées dans la gamme d'énergie VUV

Comme indiqué dans l'introduction de ce chapitre, en phase gazeuse la reconnaissance moléculaire spécifique est conservée pour les complexes vancomycine/$Ac_2^L K^D A^D A$ déprotonés, et le récepteur est dans la poche de liaison de la vancomycine. Afin d'en savoir plus sur les processus induits dans ces espèces déprotonées après photo-absorption, nous allons étudier l'absorption, d'abord par la vancomycine seule déprotonée puis par son complexe avec le récepteur, d'un photon unique VUV dans la gamme d'énergie [14-32] eV.

#### 4.2.2.1 Vancomycine isolée déprotonée

Nous avons étudié la vancomycine doublement déprotonée après absorption d'un photon d'énergie 16 eV. Ce spectre est présenté sur la figure 4.19 : il est similaire à ceux obtenus dans la gamme [14-32] eV. Ces énergies sont supérieures au seuil de photo-détachement d'un électron (inférieur à 5 eV pour la plupart des biomolécules multi-déprotonées [128]), mais aussi au seuil de double photo-détachement de l'insuline 5 fois déprotonée (11,4 eV) [129]. Cependant, dans le cas présent, on s'attend à observer uniquement un seul détachement d'électron puisque dans le cas où deux électrons se détachent, il n'est

pas possible de détecter des fragments puisque le système devient neutre. Nous pouvons directement nous rendre compte que le spectre est très différent de ceux des espèces protonées.

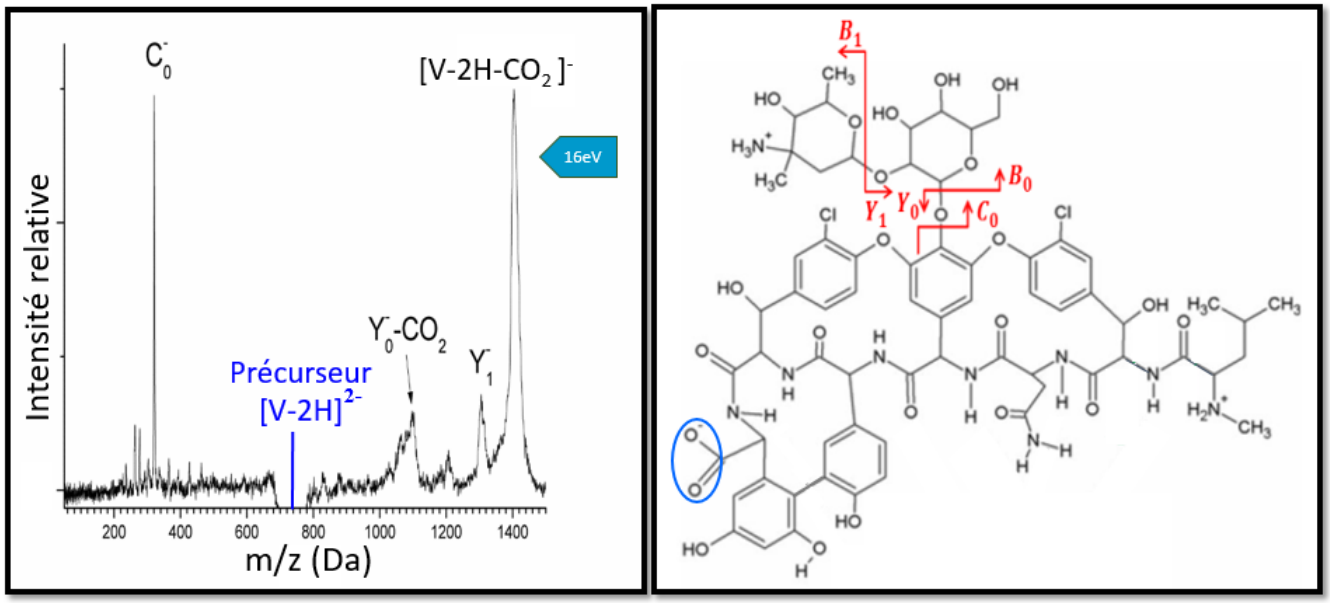


FIGURE 4.19 – Spectre de masse de la vancomycine doublement déprotonée de rapport m/z = 723,5 après absorption d'un seul photon à 16 eV (à gauche). À droite, la structure chimique de la vancomycine à pH = 7 en solution, le groupe $CO_2^-$ est entouré en bleu. La notation des fragments du groupe sucre est indiquée en rouge.

Nous observons beaucoup moins de voies de fragmentation majoritaires. Le pic le plus intense est situé à m/z = 1404 et correspond à la perte d'une molécule de masse 44 de la vancomycine après photo-détachement. Nous l'attribuons à une molécule de $CO_2$ formant l'anion radicalaire $[V-2H-CO_2]^-$. Comme on peut voir sur la structure chimique de la vancomycine (voir la figure 4.19), il est possible qu'après photo-détachement d'électron du groupe $CO_2^-$, il y ait une rupture de la liaison entre le groupe $CO_2$ et la vancomycine. Ce processus de perte du $CO_2$ a été signalé par plusieurs études pour des peptides et protéines déprotonés après excitation ou détachement d'un électron des orbitales de valence [91] [92] [93]. Il a été expliqué par un transfert ou détachement d'un électron du groupement $CO_2^-$, suivi d'une réaction radicalaire et de la perte d'une molécule de $CO_2$ [94]. Un autre pic à m/z = 322 correspond au fragment $C_0^-$ causé par la rupture de la liaison reliant le cycle phényle central et l'atome d'oxygène attaché au groupe disaccharide. De plus, nous voyons deux pics de faible intensité à m/z = 1304 et m/z = 1100 , que nous avons attribués aux fragments $Y_1^-$ et $Y_0^- - CO_2$ pouvant être formés après la rupture des liaisons provenant du groupe sucre (voir la figure 4.19).

#### 4.2.2.2 Complexe déprotoné

Dans la même gamme d'énergie VUV, nous avons de nouveau irradié le complexe non-covalent entre la vancomycine et son récepteur mais cette fois doublement déprotoné. Les résultats sont donnés dans la figure 4.20 : nous remarquons tout de suite qu'ils sont totalement distincts du cas du complexe protoné.

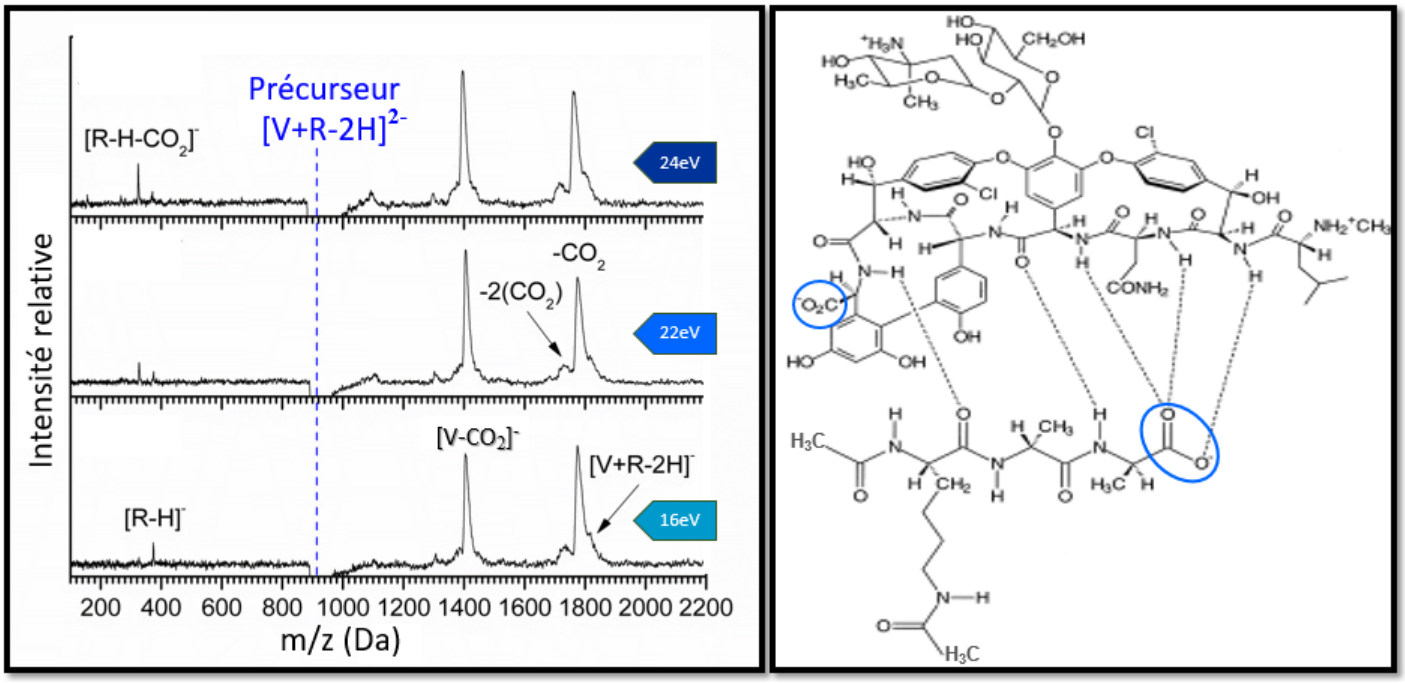


FIGURE 4.20 – A gauche : spectres de masse du complexe doublement déprotoné entre la vancomycine et son récepteur (m/z = 909,5) après photo-absorption à 16, 22 et 24 eV. Á droite, la structure chimique du complexe en solution à pH = 7, avec les liaisons H entre les deux molécules représentées en tirets dans le cas de la structure native. Les deux groupes $CO_2$ de la vancomycine et de récepteur sont entourés en bleu.

En effet, on observe la présence d'un signal autour du rapport m/z = 1819 du complexe intact après détachement d'un électron, alors que ce n'était pas le cas pour le complexe protoné. Un pic intense situé à m/z = 1775 attribué à $[V + R - 2H - CO_2]^-$ correspond à la perte d'une molécule $CO_2$ après photo-détachement d'un électron : comme pour la vancomycine isolée, on peut supposer que l'électron est détaché d'un groupe $CO_2^-$ et la même réaction radicalaire mène à la perte de $CO_2$. Cela veut dire que la rupture d'une liaison covalente se produit sans la rupture de toutes les liaisons non covalentes entre la vancomycine et son modèle du récepteur. L'autre pic intense à m/z = 1404 est attribué à la vancomycine déprotonée après la perte de $CO_2$. Le complexe déprotoné contient deux groupes $CO_2^-$, comme l'a montré une étude précédente de spectroscopie IR [112]. Par conséquent, le détachement d'électron de l'un des deux groupes $CO_2^-$ peut expliquer les pertes de $CO_2$ observées. D'après cette étude, il y a un groupe $CO_2^-$ dans la vancomycine et un dans le récepteur $Ac_2^L K^D A^D A$,

ce qui signifie que la perte d'un $CO_2$ après détachement d'un électron peut provenir de la vancomycine, tel qu'on l'a vu pour la vancomycine doublement déprotonée sur la figure 4.19, mais peut aussi provenir du récepteur. Nous observons également deux pics attribués à $[R-H-CO_2]^-$ et $[R-H]^-$ qui sont probablement dus à la dissociation du complexe après un détachement d'électron de la vancomycine. Nous pouvons remarquer que leur intensité est faible, indiquant une énergie de liaison du complexe plus élevée après le détachement d'électron de la vancomycine que du récepteur. Ceci nous amène à conclure que le signal faible du pic correspondant au complexe intact est dû au détachement d'électron de la vancomycine et non du récepteur. Cela est cohérent avec le fait que la structure native du complexe est conservée en phase gazeuse : en effet, comme nous pouvons l'observer sur la figure 4.20, le groupe $CO_2^-$ du récepteur est fortement lié à la poche de liaison de la vancomycine par des liaisons hydrogène. De plus, le groupe $CO_2^-$ de la vancomycine n'est pas lié au récepteur après détachement d'électron de ce groupe ; la molécule de $CO_2$ peut donc quitter la vancomycine sans perte du complexe. Enfin, l'influence de la structure native est également responsable de la faible intensité du pic attribué à une perte supplémentaire de $CO_2$ menant au complexe qui a perdu deux molécules de $CO_2$. En effet, si le récepteur perd un $CO_2$, toutes les liaisons hydrogène avec la vancomycine ont de fortes chances d'être rompues. Cette perte de $CO_2$ est sans doute la conséquence du détachement d'un électron du groupe $CO_2^-$ du récepteur, et dans ce cas, c'est la vancomycine qui est chargée. Le détachement d'électron peut être suivi d'un transfert d'énergie interne vibrationnelle et de la dissociation du complexe, puis d'une perte de $CO_2$ de la vancomycine déprotonée. Ces observations sont cohérentes avec des résultats expérimentaux de dissociation induite par collision à basse énergie [45], et de dissociation par absorption IR multi-photonique du complexe non-covalent entre la vancomycine et son modèle de récepteur déprotoné [112], où la fragmentation est causée par un dépôt d'énergie vibrationnelle. En augmentant l'énergie du photon, nous pouvons constater que l'intensité des pics attribués à $[V-H-CO_2]^-$ et $[R-H-CO_2]^-$ augmente alors que l'intensité du pic correspondant à $[R-H]^-$ diminue, ce qui confirme notre hypothèse que ces espèces sont dues à un transfert d'énergie interne vibrationnelle après le détachement d'un électron.

Nous présentons sur la figure 4.21 les spectres de masse du complexe doublement déprotoné de la vancomycine avec deux récepteurs $Ac_2^L K^D A^D A$ après absorption d'un photon d'énergie entre 14 et 24 eV. Il est intéressant de remarquer que si l'on observe les mêmes pics que pour le complexe entre la vancomycine avec un seul récepteur, leur intensité relative est cependant différente. Cette fois, le complexe intact $[V+R-2H]^-$ est le plus intense, tandis que la vancomycine qui a perdu une molécule $CO_2$ est beaucoup moins intense. Le deuxième récepteur est probablement neutre, et il ne

se trouve pas dans la poche de liaison de la vancomycine, impliquant que son énergie de liaison est sans doute beaucoup plus faible que celle du premier récepteur. Cela explique la faible abondance du complexe de la vancomycine avec deux récepteurs après détachement d'un électron. Cependant, l'évaporation du récepteur neutre conduit à un complexe intact $[V + R - 2H]^-$ plus intense que $[V + R - 2H - CO_2]^-$, contrairement au complexe avec un seul récepteur. Ceci est cohérent avec une redistribution de l'énergie vibrationnelle transférée dans un plus grand nombre de degrés de liberté, à cause du deuxième récepteur. De plus, l'évaporation du récepteur diminue la température et donc la quantité d'énergie vibrationnelle du système. Il peut aussi se produire un effet de "cage" qui empêche le groupe $CO_2$ de partir, contribuant à la présence du complexe intact $[V + R - 2H]^-$. Dans ce cas, on peut penser que le récepteur neutre est lié au $CO_2^-$ de la vancomycine, en raison des fortes interactions charge-dipôle qui peuvent le relier aux groupements $NH$ du récepteur neutre.

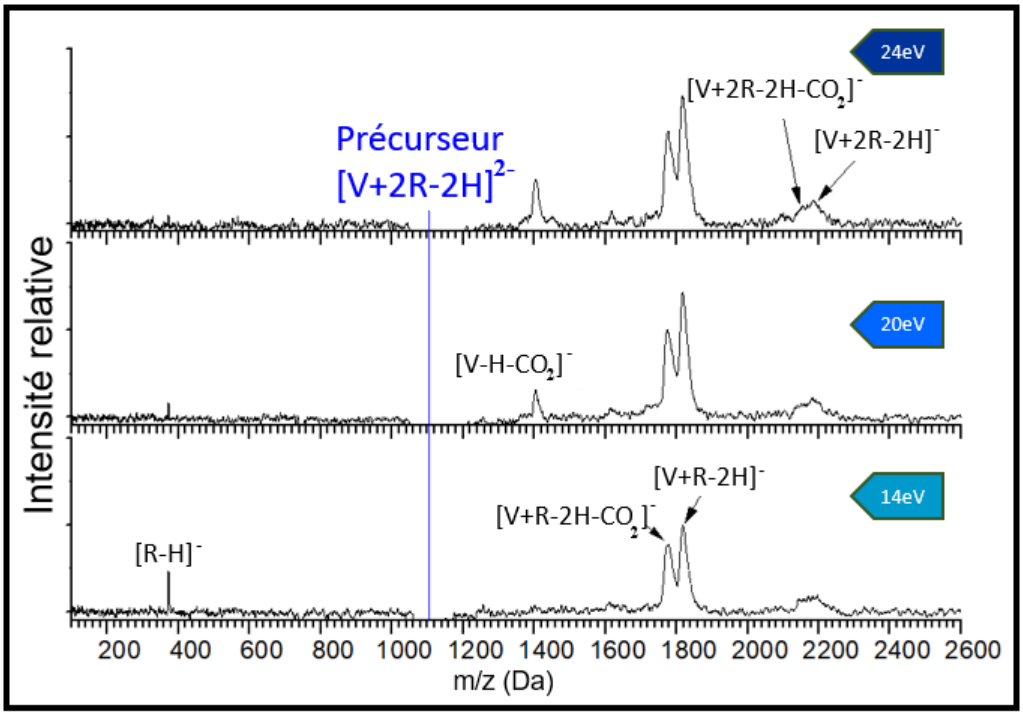


FIGURE 4.21 – Spectres de masse du complexe doublement déprotoné de la vancomycine avec deux récepteurs (m/z = 1095,5), après absorption d'un seul photon à 14, 20 et 24 eV. Un lissage est appliqué aux spectres via la méthode de la moyenne mobile sur 100 points consécutifs

Il est intéressant de noter qu'en changeant l'énergie, le spectre de masse évolue : en effet, à 14 eV, nous observons la présence du pic attribué au récepteur déprotoné $[R - H]^-$ et l'absence du pic correspondant à la vancomycine déprotonée qui a perdu une molécule $CO_2$, alors qu'à 24 eV l'inverse se produit. Pour former l'ion $[V - H - CO_2]^-$, il faut que l'électron soit détaché du récepteur déprotoné et que les deux récepteurs se détachent, ce qui peut être facilité par une énergie de photon élevée car la quantité d'énergie vibrationnelle transférée est plus grande. Mais ce raisonnement s'applique aussi

a priori à l'observation du récepteur déprotoné, bien que celui-ci ait un comportement opposé. Une explication résiderait dans l'existence de processus de photo-excitation menant à la dissociation de $[V + 2R - 2H]^{2-}$ en $[V + R - H - CO_2]^-$ et $[R - H]^-$. La probabilité de photo-excitation baissant avec l'énergie du photon dans cette gamme d'énergie, des études plus poussées sont donc nécessaires afin d'expliquer ce comportement.

Tous les résultats évoqués jusqu'à présent montrent les différents processus de relaxation après excitation et/ou ionisation en couche de valence par des photons VUV. Par la suite, nous nous intéresserons à une gamme d'énergie plus élevée allant jusqu'au rayons X. Nous étudierons certains processus physico-chimiques n'ayant pas pu être observés dans les énergies VUV, puisque les rayons X offrent la possibilité d'induire l'excitation ou l'ionisation en couche atomique interne. Nous allons voir que d'autres voies de fragmentation peuvent s'ouvrir, et que ces processus sont potentiellement intéressants en protéomique.

### 4.2.3 Identification d'un ensemble de modifications post-traductionelles par photo-absorption X

Nous allons aborder dans cette partie l'étude de l'ionisation et de la fragmentation de la vancomycine après interaction avec des rayons X afin d'identifier les modifications post-traductionnelles particulièrement complexes présentes dans la vancomycine. Une modification post-traductionnelle (PTM) est l'ajout ou la perte d'un groupement chimique sur les chaînes latérales des acides aminés des protéines (voir la partie 2.2.2.3). Parmi les plus courantes, on compte par exemple la phosphorylation, la glycosylation, l'acétylation, la lipidation et la protéolyse. Les modifications post-traductionnelles jouent un rôle important sur l'activité des protéines en modifiant leur structure et/ou leur stabilité par la création ou/et la rupture de liaisons covalentes. Par exemple, l'hydroxylation des prolines et des lysines d'un acide aminé est une modification post-traductionnelle : elle augmente la stabilité de la structure en triple hélice du collagène, responsable des propriétés spécifiques des tissus conjonctifs tels que la peau, le cartilage, et les os [130]. Certains types de PTM sont également les conséquences du stress oxydatif agissant sur les acides aminés contenant des cycles aromatiques ou du soufre. Ces acides aminés sont impliqués dans des réactions chimiques qui conduisent à la formation de liaisons covalentes entre chaînes latérales (c'est la réticulation) [131]. Ces processus ont un rôle important pour la synthèse des antibiotiques de la famille des glycopeptides, notamment pour la vancomycine. La synthèse de cette dernière commence par une chaîne peptidique possédant sept résidus. Ensuite, plusieurs modifications post-traductionelles se produisent dans les chaînes latérales des cinq

tyrosines, impliquant des processus d'hydroxylation, de crosslinking, l'ajout d'atomes de chlore et une glycosylation. Ces modifications permettent la rigidification de la poche de liaison favorisant la reconnaissance moléculaire du récepteur via des liaisons non-covalentes. Dans cette partie, nous allons donc étudier la photo-absorption de la vancomycine par rayons X dans la gamme d'énergie [100-531,5] eV, et montrer que la spectrométrie de masse permet d'obtenir une signature robuste des modifications post-traductionelles de la vancomycine. Les spectres présentés dans cette section ont été obtenus avec le dispositif expérimental Paultje que nous avons déjà détaillé précédemment dans la partie 4.1.1, couplé à la ligne de lumière synchrotron U49-2_PGM-1 de BESSY II à Berlin, décrite dans la partie 4.1.2.2. Ces expériences nous permettront de comparer ces résultats avec ceux obtenus dans la gamme d'énergie VUV, où les électrons de valence absorbent le photon. Nous nous sommes intéressés, en particulier, à la photo-absorption à des énergies supérieures à 288 eV, celle-ci pouvant cibler les électrons des orbitales atomiques 1s. La photo-absorption a donc été étudiée à 288, 401,5 eV et 531,5eV : ces énergies correspondent à l'excitation d'un électron d'une orbitale 1s des atomes de carbone, azote et oxygène, respectivement. Tous ces processus sont expliqués en détail dans la section 3.5.2.

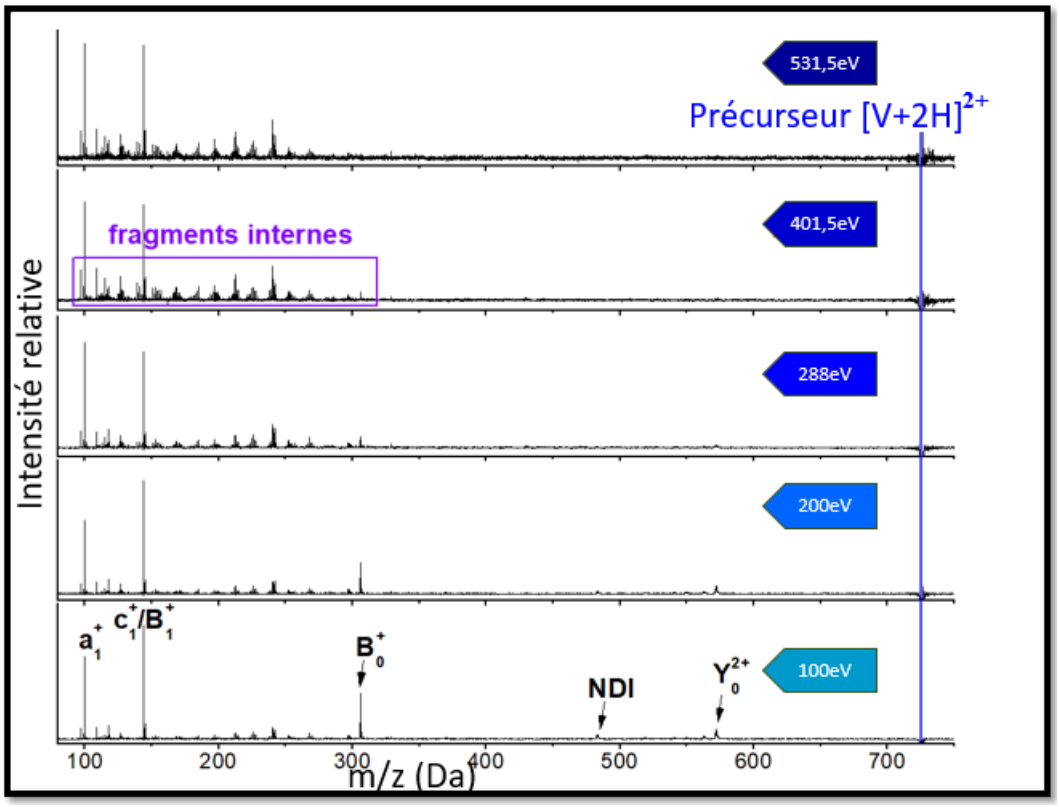


FIGURE 4.22 – Spectres de masse de la vancomycine doublement protonée après absorption d'un seul photon X entre 100 et 531,5 eV. La position de l'ion précurseur est indiquée en bleu à m/z 725,5. Les fragments internes formés par au moins deux ruptures de liaisons sont encadrés en violet.

La figure 4.22 présente les spectres de masse de la vancomycine doublement protonée $[V+2H]^{2+}$

obtenus après absorption d'un photon X. Par rapport aux résultats présentés précédemment pour la vancomycine isolée dans la gamme d'énergie VUV, nous pouvons noter que les mêmes pics sont observés à l'énergie de 100 eV, dus notamment à l'ionisation non dissociative (NDI) de l'ion précurseur, mais aussi aux fragments complémentaires $B_0^+$ et $Y_0^{2+}$, qui proviennent de la rupture de la liaison glycosidique de la vancomycine, et au fragment du squelette peptidique $a_1^+$. Lorsque l'énergie du photon augmente, une nouveauté apparaît : on observe un grand nombre de pics de rapport m/z inférieur à 300 encadrés en violet sur les spectres de masse, alors qu'après la photo-absorption VUV, la fragmentation conduit uniquement à des pics de rapport m/z = 100, 118, 127, 144, 149.

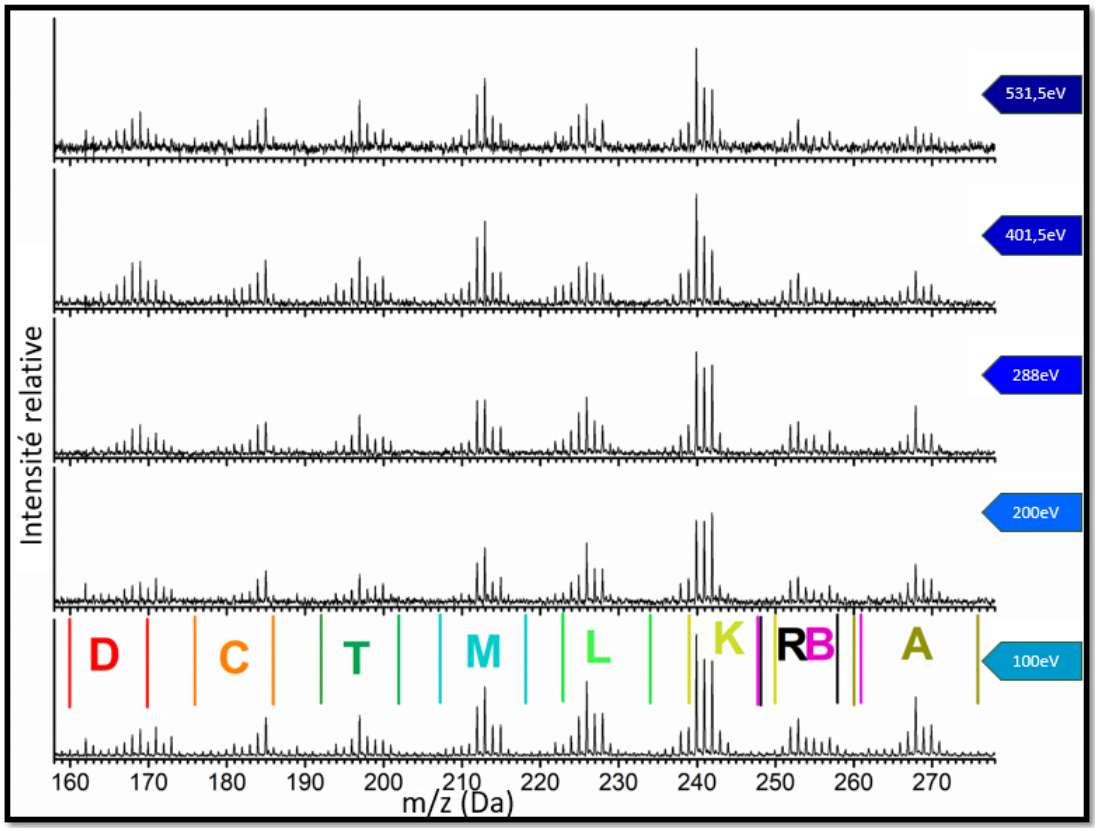


FIGURE 4.23 – Spectres de masse de la $[V + 2H]^{2+}$ après photo-absorption d'un photon X entre 100 et 531,5 eV où les fragments internes qui apparaissent entre m/z = 158 et m/z = 278 sont nommés par des lettres au dessus de chaque groupe de pics. Les barres verticales autour de chaque groupe de pics correspondent aux rapports m/z de chaque fragment de la figure 4.26 sans aucun atome d'hydrogène et avec un maximum d'atomes d'hydrogène sans changer l'ordre des liaisons, respectivement

Pour avoir davantage d'informations sur ces pics, nous présentons sur la figure 4.23 la partie zoomée du spectre de masse de la vancomycine doublement protonée correspondant à la région située entre m/z = 158 et m/z = 278. Comme nous pouvons le voir, cette partie des spectres contient des groupes de pics séparés par une unité de masse ; nous les avons donc attribués à des fragments simplement chargés. Ces fragments n'ont pas été observés lors des expériences de CID ou SID à basse

énergie (de l'ordre de 10 eV) [122]. Suite à des expériences CID sur de l'argon et de l'hélium en phase gazeuse à une énergie cinétique de l'ordre de 4 keV, une autre étude sur la vancomycine simplement protonée montre des groupes de pics similaires mais il n'est pas possible de distinguer la masse exacte des fragments, et les auteurs n'en parlent pas [118]. A cette énergie, les collisions peuvent entraîner l'ionisation de la vancomycine, comme la photo-absorption X, ce qui indique que ces fragments sont créés après ionisation. De plus, ces groupes de pics sont séparés par environ la masse d'un atome lourd (carbone, azote ou oxygène) et le nombre important de pics séparés d'une masse font penser à l'existence de nombreux transferts d'hydrogène.

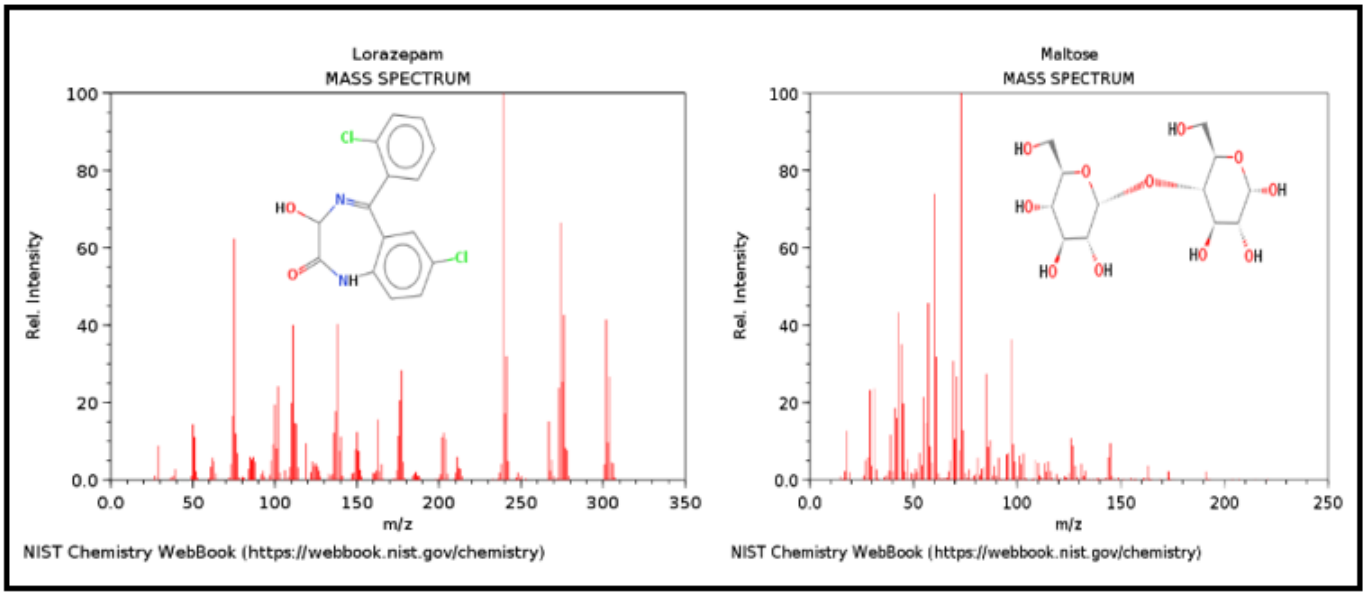


FIGURE 4.24 – Spectres de masse du lorazépam (masse molaire = 322.166 g/mol), et du maltose (masse masse molaire = 342.2965 g/mol) ainsi que leurs structures chimiques, issus du site internet du NIST [132].

Ce processus a été déjà observé par exemple dans le cas d'une molécule aromatique contenant un cycle benzénique : le 3-aminophénol [133], pour lequel des calculs de chimie quantique ont montré que les fragmentations à plus basse énergie s'accompagnent d'un transfert d'hydrogène, qui contribue à rompre l'aromaticité des cycles benzéniques. De plus, cet aspect de groupe de pics est typique des spectres de masse des molécules contenant des cycles aromatiques et riches en hydrogène, notamment dans des études d'ionisation par impact d'ions à des énergies de l'ordre du keV et du MeV [134] [135] ou bien aussi par photo-absorption par des rayons X [136]. D'autres spectres de masse obtenus par impact électronique à 70 eV -par exemple sur le lorazépam illustré sur la figure 4.24, de masse molaire = 322.166 g/mol, qui est une molécule contenant trois cycles aromatiques substitués par deux atomes de chlore- montrent des groupes de pics séparés par une unité de masse dans la même gamme de rapport m/z [132]. Sur la même figure, nous présentons le spectre de masse du maltose,

un disaccharide formé par la combinaison de deux molécules de glucose et ressemblant au groupe sucre de la vancomycine. La plupart des rapports m/z des pics de ce spectre sont en dessous de 100 bien que la masse molaire du maltose soit de 342.2965 g/mol [132]. Par conséquent, les groupes de pics observés dans la figure 4.23 ne proviennent sans doute pas du groupe sucre.

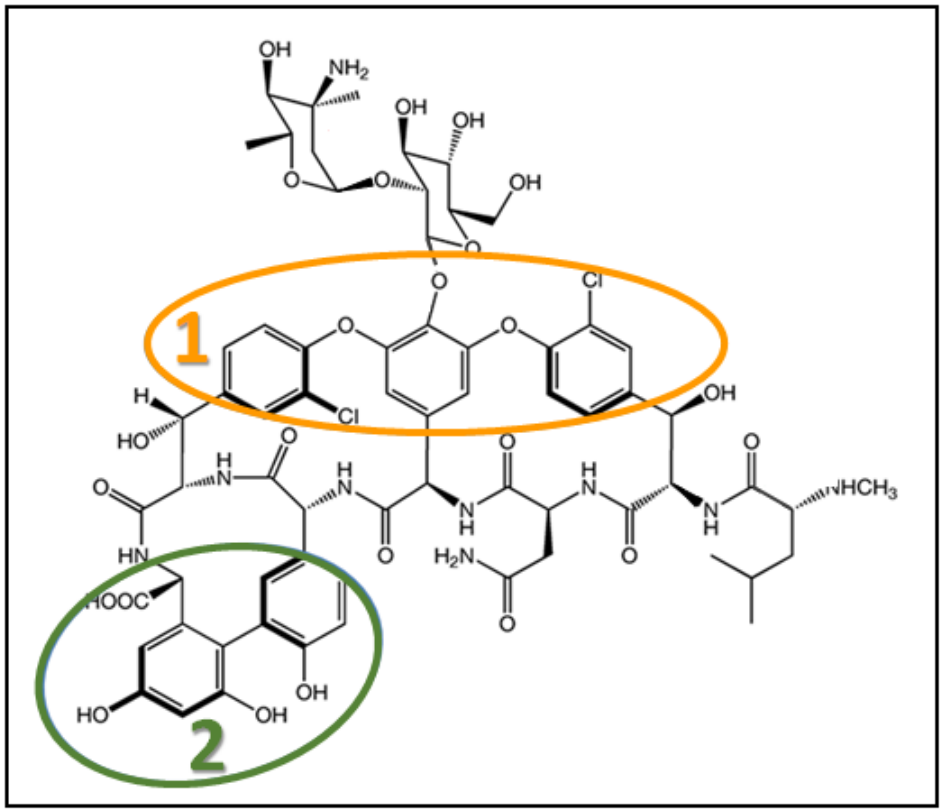


FIGURE 4.25 – Structure chimique de la vancomycine montrant le groupe central noté 1 et le cycle biphénol noté 2

Il est intéressant de noter que dans la vancomycine il y a cinq cycles aromatiques substitués par des groupements hydroxyl ou des atomes de chlore comme présenté sur la figure 4.25 : un groupe central contenant trois cycles phényles noté 1 sur la figure 4.25, et un autre, noté 2 sur la figure 4.25 et contenant deux cycles phényles liés à l'extrémité C-terminale du squelette pseudo-peptidique . Nous avons alors calculé la masse des fragments issus de ces groupes, et trouvé trois chemins réactionnels qui expliquent la présence des pics de la figure 4.23. En effet, chaque cycle aromatique peut être identifié séparément. Par conséquent, les fragments responsables de ces groupes de pics proviennent sans doute de ces deux parties de la vancomycine. Nous avons ainsi tracé sur la figure 4.23 des barres verticales marquant chaque groupe de pics correspondant aux rapport m/z minimale et maximale de chaque fragment. Les barres à plus basses masses correspondent à aucun ajout d'atome d'hydrogène et les barres de masses les plus élevées, à l'ajout du maximum possible d'atomes d'hydrogène sans changer les ordres des liaisons. Nous avons attribué ces groupes de pics aux fragments internes dont

la structure est visible sur la figure 4.26.

Ces groupes de pics peuvent donc être considérés comme une signature spectrale de masse du réseau des modifications post-traductionelle assez complexe de la vancomycine. Nous pouvons remarquer que l'intensité relative de ces pics ne varie que très légèrement, et que leurs formes restent pratiquement stables, ce qui est important pour identifier la signature de modifications associées à la rupture d'une liaison. Il est également intéressant de remarquer sur la figure 4.23 qu'en augmentant l'énergie du photon, l'intensité relative des pics est à peu près constante. Ce comportement peut être attribué à une barrière d'énergie potentielle très élevée entraînant la formation de ce groupe de pics qui nécessite la rupture d'au moins deux liaisons. Cela signifie qu'un seul photon peut déclencher la rupture de plusieurs liaisons, jusqu'à huit liaisons pour certains fragments. Cela contraste fortement avec la majorité des fragments observés après photo-absorption VUV, pour lesquels une seule liaison est rompue.

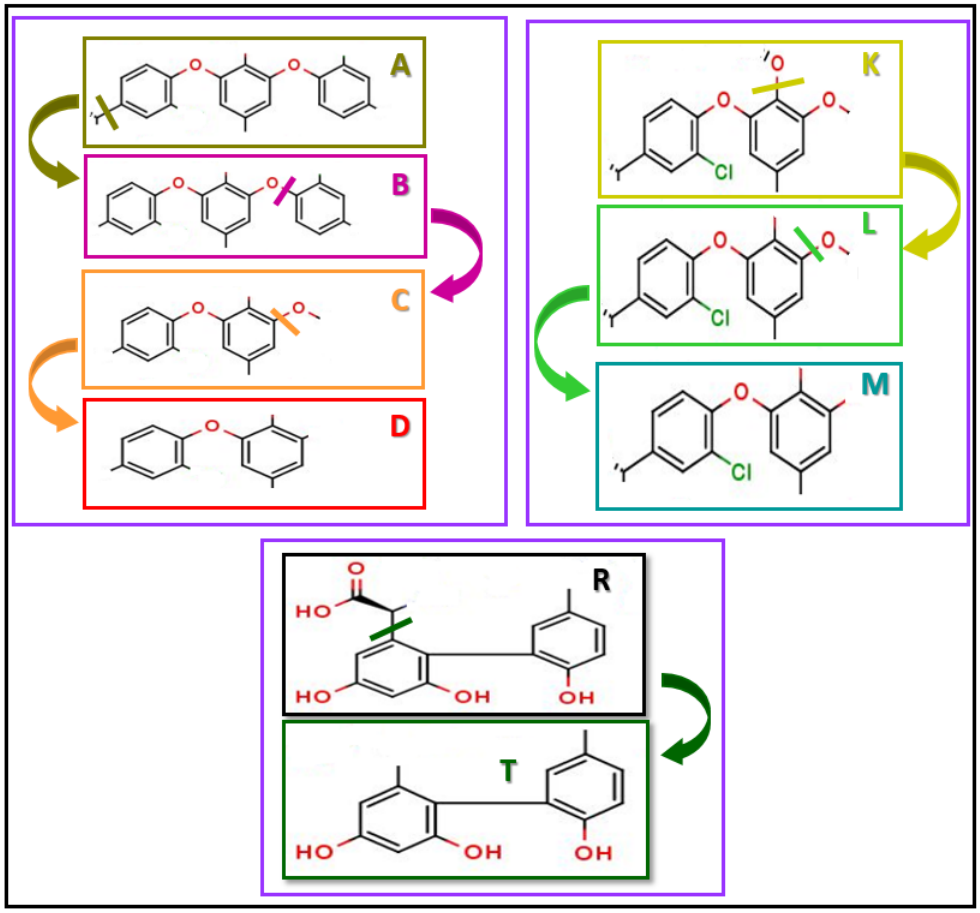


FIGURE 4.26 – Structures chimiques proposées correspondant aux fragments internes de la vancomycine doublement protonée $[V + 2H]^{2+}$, ainsi que les ruptures de liaison responsables de leur formation.

Afin d'avoir une compréhension plus approfondie des processus menant à la formation de ces

fragments internes, nous allons nous intéresser à l'évolution des voies de fragmentation de $[V + 2H]^{2+}$ en fonction de l'énergie du photon. La figure 4.27 présente à gauche l'évolution des fragments détectés dans le spectre de la vancomycine doublement protonée après absorption d'un photon X. A droite, apparaissent la somme des fragments internes et la somme des autres fragments issus de la fragmentation de la vancomycine. Les fragments majoritaires après absorption d'un photon VUV voient leurs abondances relatives diminuer globalement quand l'énergie du photon X augmente, alors que la somme des abondances des fragments internes augmente jusqu'à 300 eV et reste constante ensuite. Cet aspect a déjà été observé lors de nombreux travaux qui ont porté sur l'étude de peptides ou de protéines. En effet, ceux-ci montrent dans cette gamme d'énergie une augmentation de la quantité d'énergie vibrationnelle transférée au système moléculaire après la photo-absorption [137] [121] [101].

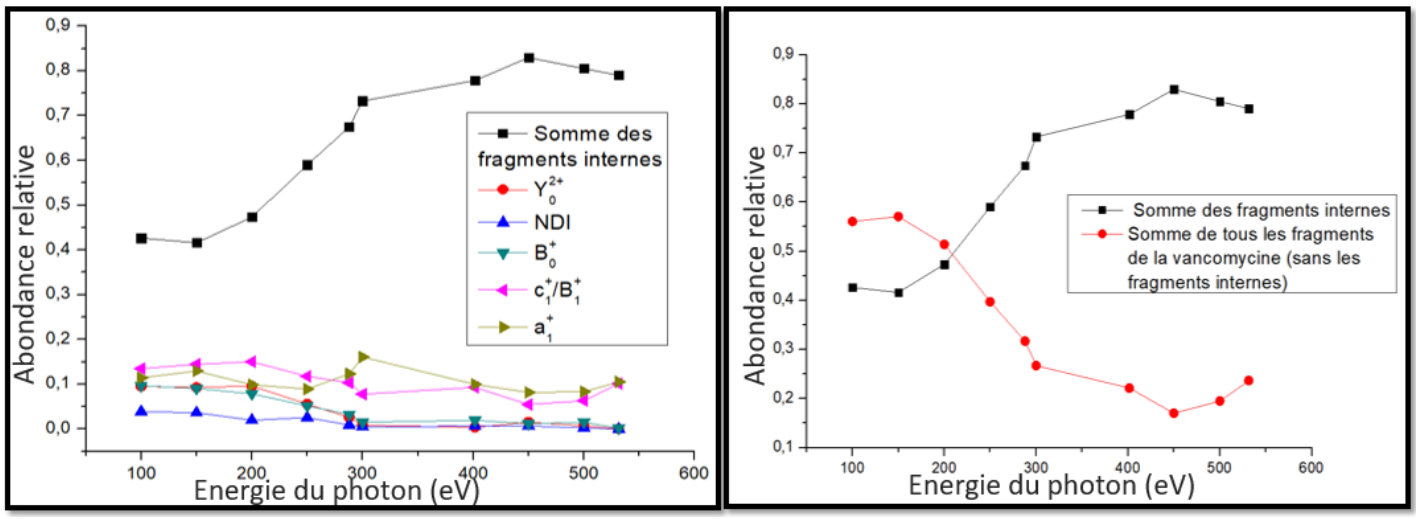


FIGURE 4.27 – A gauche, abondance relative des principaux produits de l'irradiation de la vancomycine doublement protonée pour une énergie photonique comprise entre 100 et 531,5 eV. NDI correspond à l'ionisation non dissociative observée après photo-absorption. A droite, la somme des abondances des fragments internes et la somme de celles des autres fragments après absorption d'un photon dans la gamme d'énergie entre 100 et 531,5 eV.

La fragmentation interne est le processus dominant dans la gamme d'énergie de photons X, ces derniers étant créés par rupture de plusieurs liaisons lorsque le photon dépose une grande quantité d'énergie dans le système. Sur la figure 4.27 à gauche, nous pouvons directement remarquer les tendances opposées entre la somme des fragments internes qui subit une forte augmentation, et à l'inverse, la somme de tous les autres fragments qui diminue. Ce phénomène semblerait être une transition entre l'absorption en couche de valence et celle d'électrons des orbitales 2s et 1s, qui conduit à un dépôt d'énergie important dans le système moléculaire après redistribution de l'énergie dans les modes de vibration, ce qui explique l'augmentation de l'abondance des fragments internes.

A partir du moment où les électrons 1s peuvent absorber le photon, la quantité d'énergie transférée aux modes de vibration de la molécule n'augmente plus.

Se pose également la question de savoir si la signature spectrale du réseau de modifications post-traductionnelles de la vancomycine est affectée par l'environnement moléculaire. Par conséquent, il est intéressant d'étudier l'effet de la complexation entre la vancomycine et le modèle de récepteur $Ac_2{}^{L}K^{D}A^{D}A$. Les résultats obtenus pour le complexe doublement protoné après absorption d'un photon X dans la gamme d'énergie [100-531.5] eV sont donnés dans la figure 4.28. Nous pouvons déduire des spectres que les processus de dissociation inter et intra-moléculaire de la vancomycine et du récepteur sont dominants, puisqu'on observe les mêmes fragments produits après photo-absorption VUV. De plus, on retrouve les mêmes fragments internes que dans le cas de la vancomycine isolée, mais leur abondance est plus faible.

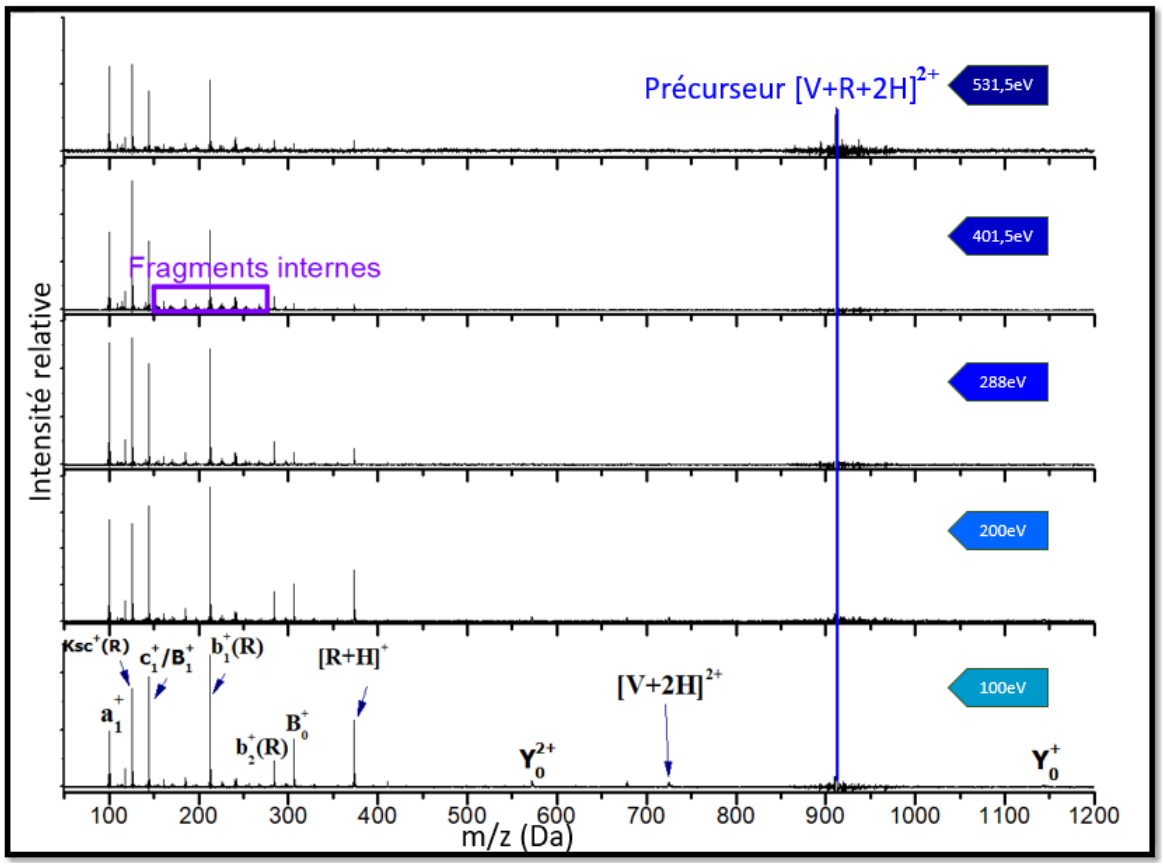


FIGURE 4.28 – Spectres de masse du complexe doublement protoné (m/z = 911,5) entre la vancomycine et le peptide $Ac_2K^{D}A^{D}A$ après absorption d'un seul photon de 100, 200, 288, 401,5 et 531,5 eV. La notation habituelle pour la fragmentation des oligosaccharides et des squelettes peptidiques est utilisée. Les lettres 'V'et 'R' désignent respectivement la vancomycine et le récepteur. Les fragments internes sont encadrés en violet.

Pour obtenir des informations supplémentaires sur les processus de relaxation du complexe après absorption d'un photon X, nous montrons sur la figure 4.29 l'évolution de l'abondance relative des

fragments produits en fonction de l'énergie du photon. L'abondance relative des fragments internes augmente progressivement jusqu'à 300 eV, comme observé dans le cas de la vancomycine isolée, tandis que l'abondance de la vancomycine $[V + 2H]^{2+}$ et celle du récepteur $[R + H]^{+}$ diminuent, ce qui indique que la fragmentation de la vancomycine est compensée par la diminution de l'abondance relative du récepteur $[R + H]^{+}$ et inversement. En effet, comme vu précédemment pour les énergies VUV, la formation du $[R + H]^{+}$ est attribuée au transfert d'un proton entre la vancomycine ionisée et le récepteur neutre. Par conséquent, cet effet des tendances opposées entre la diminution de l'abondance relative du récepteur protoné $[R + H]^{+}$ et l'augmentation de la fragmentation de la vancomycine indique que le transfert de proton devient moins probable en augmentant l'énergie du photon. Cela pourrait être dû à une excitation vibrationnelle plus élevée lorsque l'énergie des photons des rayons X s'élève de 100 à 300 eV, conduisant à une dissociation du complexe non covalent sur une échelle de temps plus rapide et empêchant le transfert du proton. Nos observations sont cohérentes avec des études sur des peptides ionisés radicalaires réalisés par l'équipe Spectrobio à Lyon [138] qui montrent que le transfert d'un proton peut prendre jusqu'à des centaines de microsecondes.

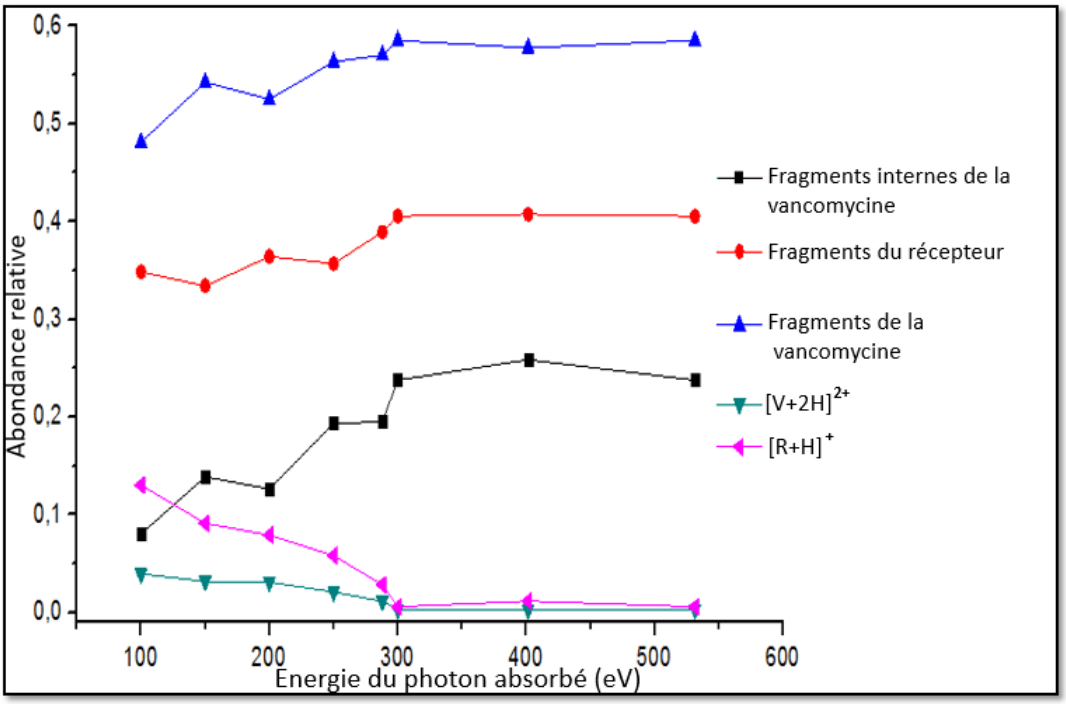


FIGURE 4.29 – Abondances relatives des différentes espèces cationiques formées après photo-absorption du complexe doublement protoné $[V + R + 2H]^{2+}$ en fonction de l'énergie du photons X entre 100 et 531,5 eV. Les abondances relative présentent, en bleu : la somme de la totalité des fragments de la vancomycine, en rouge : la somme des fragments du récepteur, et en noir : la somme des fragments internes de la vancomycine.

Nous avons également étudié d'autres environnements moléculaires autour de la vancomycine : son dimère $[V_2+3H]^{3+}$ et le complexe non-covalent avec deux récepteurs $[V+2R+2H]^{2+}$. Les spectres

de masse de la figure 4.30 présentent les spectres obtenus pour ces deux derniers systèmes et pour les deux systèmes précédents après absorption d'un photon d'énergie 401,5 eV, entre m/z = 158 et m/z = 278, là où des fragments internes sont observés dans le cas de la vancomycine isolée après photo-absorption dans la gamme d'énergie [100-531,5 eV]. Nous pouvons directement remarquer que tous les pics ont une allure similaire pour les quatre systèmes. Par conséquent, cette signature spectrale des PTM de vancomycine est robuste vis-à-vis de son environnement moléculaire. Pour en savoir plus sur ces groupes de pics, on déduit de ces spectres l'évolution de l'abondance relative de la somme de tous ces groupes de pics en fonction de l'énergie du photon pour les quatre systèmes différents étudiés précédemment (voir la figure 4.31).

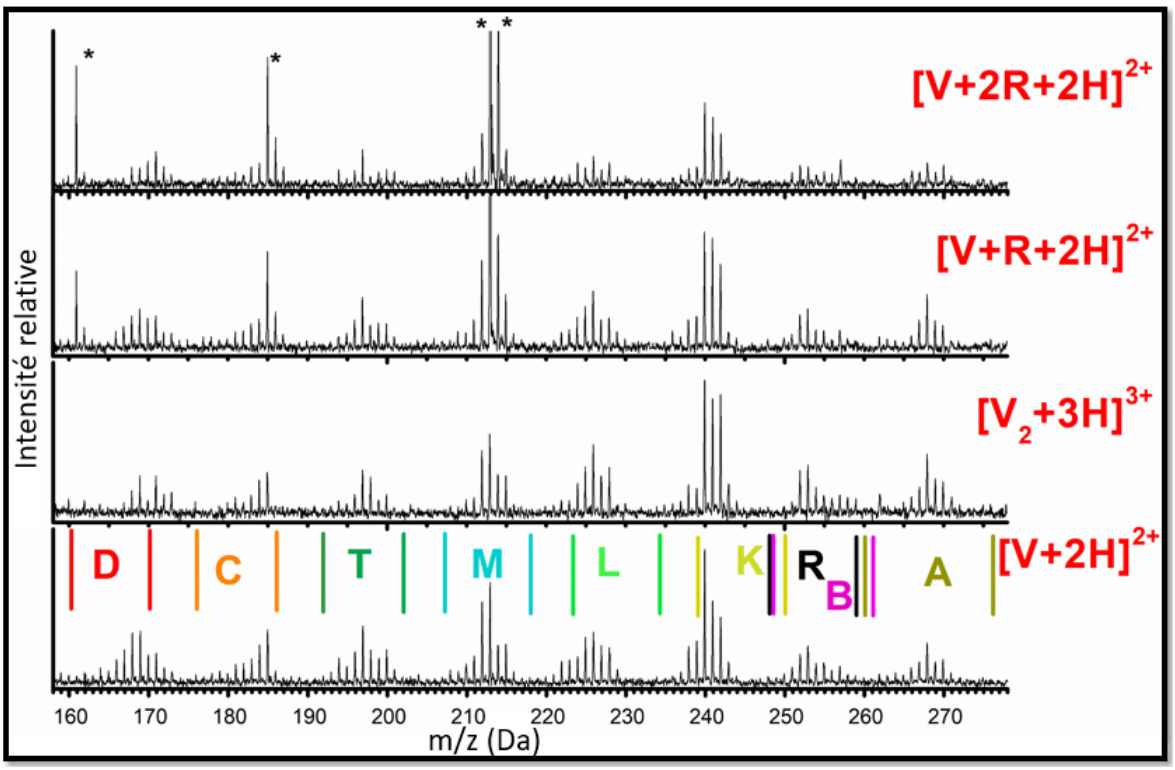


FIGURE 4.30 – Spectres de masse de $[V+2H]^{2+}$, $[V_2+3H]^{3+}$, $[V+R+2H]^{2+}$ et $[V+2R+2H]^{2+}$après photo-absorption d'un photon X d'énergie 401,5 eV où les fragments internes apparaissent entre m/z = 158 et m/z = 278 et sont nommés par des lettres indiqués au dessus de chaque groupe de pics. Les astérisques indiquent des pics venant du récepteur.

Nous remarquons une augmentation régulière de leurs abondances relative. De plus, quel que soit le système, l'abondance des fragments internes est moins élevée comparé au cas de la vancomycine isolée. Plus précisément, elle diminue globalement avec la taille du système : plus le système est grand, plus il possède un grand nombre de degrés de liberté vibrationnelle. Cela confirme le fait que le mécanisme de formation des fragments internes est dû à l'augmentation de l'énergie interne vibrationnelle déposée par le photon dans le système moléculaire à l'état fondamental. Les résultats de ces études par photo-absorption X montrent que cette signature spectrale de masse est robuste et peut

être utilisée pour identifier les groupes responsables de ces groupes de pics, et donc les modifications post-traductionnelles correspondantes dans les protéines.

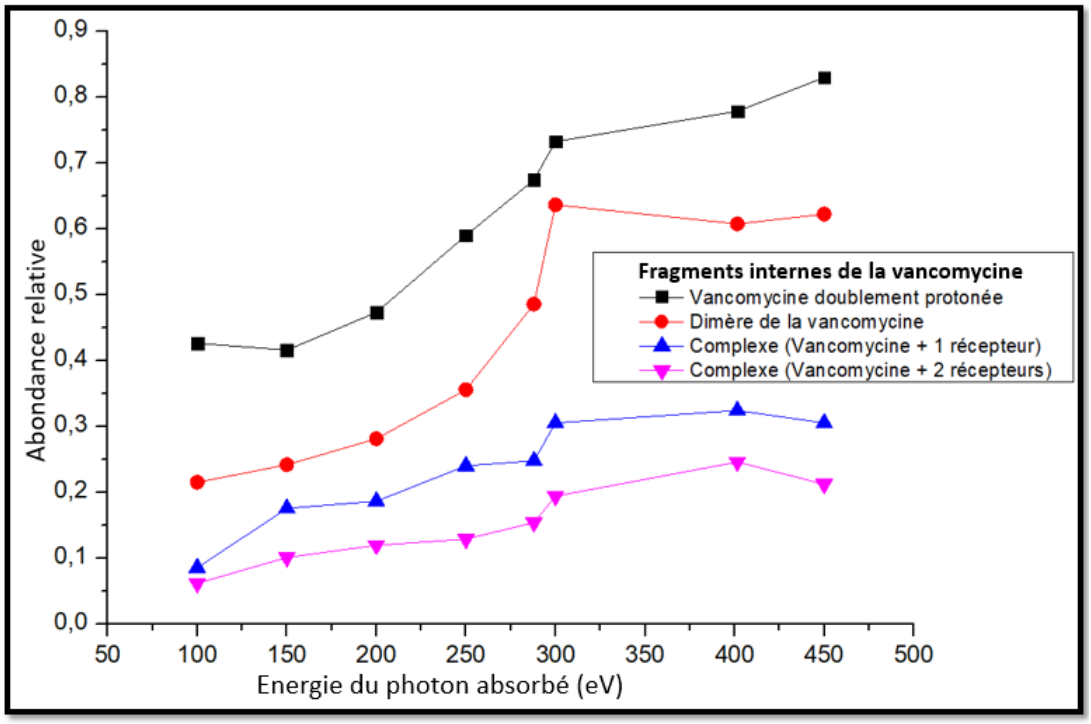


FIGURE 4.31 – Abondances relatives de la somme de tous les fragments internes de : $[V+2H]^{2+}$, $[V_2+3H]^{3+}$, $[V+R+2H]^{2+}$ et $[V+2R+2H]^{2+}$

## 4.3 Conclusion

Dans ce chapitre, on a étudié le cas d'un antibiotique ayant une forte affinité et une complémentarité structurale avec son récepteur. La première et la deuxième partie de ce chapitre portent sur l'étude de l'effet des rayonnements VUV entre 14 et 32 eV sur les espèces protonées et déprotonées de la vacomycine isolée, de son dimère, des complexes de la vacomycine et son récepteur. Les spectres obtenus, associés à une étude en dynamique moléculaire mettent en évidence différentes voies de relaxation en fonction de la nature de la charge de l'ion correspondant au complexe (protoné ou déprotoné) et permettent de montrer une influence certaine de la structure des complexes non covalents sur la fragmentation induite par photo-ionisation, en particulier la formation de fragments issus de la rupture de liaisons covalentes tout en ayant conservé les liaisons non-covalentes. Dans la troisième partie, l'effet des rayons X mous est étudié sur les espèces protonées entre la vancomycine et son récepteur. Les résultats obtenus montrent plus spécifiquement l'intérêt des rayons X-mous pour étudier les modifications post-traductionnelles de la vancomycine qui sont nombreuses et complexes.

L'absorption d'un photon X par la vancomycine mène à des fragments qui peuvent être considérés comme une signature spectrale de ces PTM. Cette signature spectrale des PTM de la vancomycine semble robuste vis-à-vis de l'énergie du photon et de son environnement moléculaire.
Dans le chapitre suivant, nous montrerons un cas où la reconnaissance moléculaire est moins spécifique.

# Chapitre 5

# Effets de la nano-solvatation sur les processus induits par capture ou transfert d'électron dans des tri-peptides protonés

## Sommaire


**5.1 Description des dispositifs expérimentaux . . . . . 96**

**5.2 Simulation de la structure géométrique et de la section efficace de collision de complexes KYK-CE . . . . . 98**

**5.3 Résultats et discussions . . . . . 99**

5.3.1 Tri-peptide isolé . . . . . 99

5.3.2 Effet de la nano-solvatation . . . . . 100

**5.4 Conclusion . . . . . 109**

La reconnaissance moléculaire peut être hautement spécifique, comme dans le cas où un ligand donné se fixe à un seul récepteur grâce à ses structures complémentaires. Nous en avons vu un exemple avec la vancomycine et son modèle du récepteur dans le chapitre précédent. Cependant, la reconnaissance moléculaire peut aussi être moins spécifique, par exemple dans le cas des éthers couronnes que nous allons aborder dans ce chapitre. L'intérêt de ces molécules réside dans leur capacité à fortement solvater les cations. En effet, les éthers couronnes sont des composés monocycliques qui contiennent des atomes d'oxygène considérés comme des agents de complexation pour les ions et pour les molécules d'eau. Les éthers couronnes ont été découverts par Pedersen en 1967, celui-ci ayant montré la possibilité de former des complexes avec plusieurs substrats [139]. Ces travaux associant deux entités pour former un complexe ligand-récepteur ont été récompensés d'un prix Nobel en 1987.

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à la molécule d'éther-18-couronne-6, notée CE dans la suite. Elle a 18 atomes dans son cycle, sa formule brute est $H_{24}C_{12}O_6$ et sa masse mono-isotopique est 264.3 u.m.a. La figure 5.1 présente la structure de la molécule d'éther 18-couronne-6 utilisée dans nos expériences. Celle-ci se lie d'une manière non-covalente à des groupements amine et guanidinium protonés (voir la figure 5.2), mais peut se lier aussi à des atomes tels que le sodium et le potassium [140]. Des études ont montré que le CE peut être utilisé pour stabiliser les cations radicalaires peptidiques intacts après transfert d'électron et évaporation du CE, afin d'étudier leur structure et leur réactivité [141]. Les expériences exposées dans ce chapitre consistent à explorer les effets d'un environnement constitué par une ou plusieurs molécules de CE sur les voies de fragmentation des molécules d'intérêt biologique, en collaboration avec l'équipe de G.Van der Rest (Institut de Chimie Physique, Orsay) et l'équipe de G.Frison (Institut de Chimie Moléculaire, Palaiseau). Nous nous intéressons particulièrement aux processus se déroulant dans des tri-peptides protonés après collision avec un gaz (CID), capture d'électron (ECD) et transfert d'électron (ETD). Nous avons déjà décrit en détails ces trois techniques dans la partie 3.4 associée au chapitre 2. Notre choix s'est porté sur des tri-peptides qui sont des molécules assez petites pour faciliter et simplifier l'interprétation des résultats et avoir une meilleure compréhension des processus mis en place. De plus, la présence d'un groupement $NH_2$ sur la chaîne latérale de la lysine permet de protoner le système afin d'avoir un tri-peptide doublement ou triplement protoné, ce qui entraîne par capture ou transfert d'un électron une espèce doublement ou simplement chargée facilement détectable. Nous présenterons dans un premier temps les dispositifs expérimentaux utilisés pour cette étude, qui incluent un spectromètre de mobilité ionique et un spectromètre de masse à résonance cyclotronique. Nous allons voir que l'éther couronne peut jouer un rôle actif lorsqu'il est lié aux peptides protonés, ce qui contraste

avec les conclusions des études précédentes dans lesquelles l'éther couronne a un rôle spectateur, notamment dans le cas de la dissociation des complexes non covalents entre un éther couronne et des peptides ou des protéines en utilisant des techniques d'activation par spectrométrie de masse, particulièrement ECD et ETD.

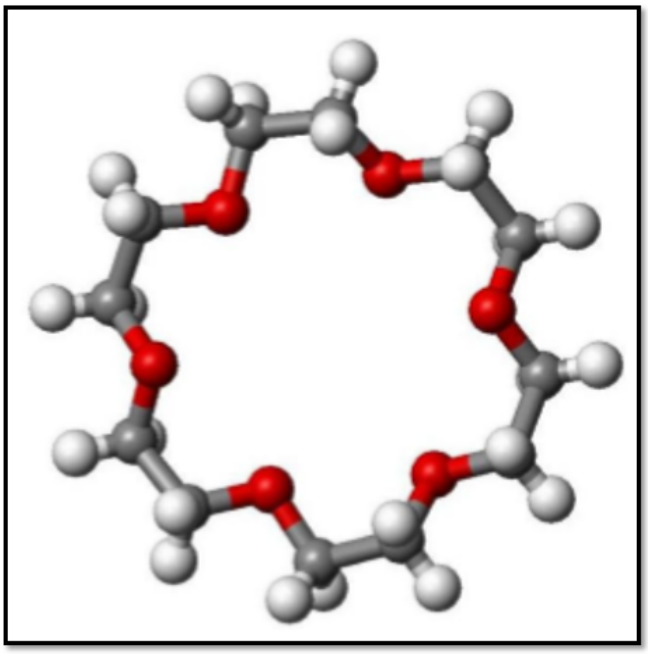

FIGURE 5.1 – Schéma de la structure de la molécule de l'éther 18-couronne-6. Les atomes H, C et O sont représentés respectivement en blanc, gris et rouge.

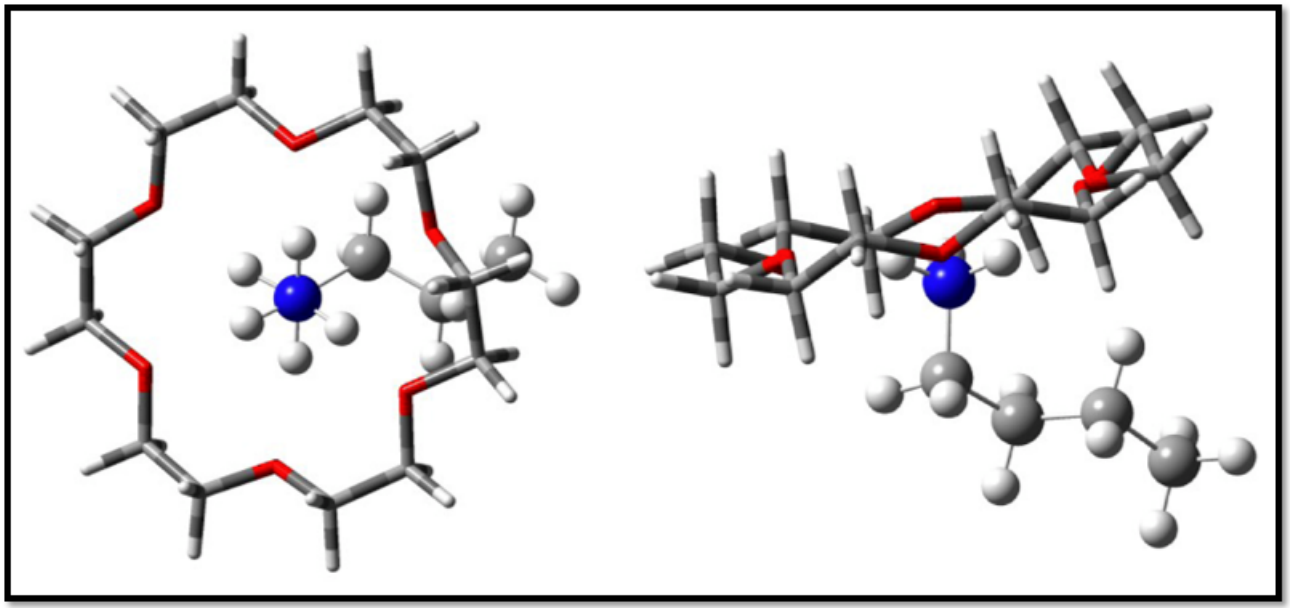

FIGURE 5.2 – structure d'un modèle de la chaîne latérale de la lysine lié à un éther 18-couronne-6 optimisée au niveau B3LYP/6-311++g(2d,p)

## 5.1 Description des dispositifs expérimentaux

Les peptides KYK (où K est la lysine et Y est la tyrosine) utilisés lors de ces expériences ont été achetés sous forme de poudre d'une pureté supérieure à 90% auprès de Proteogenix, et l'éther 18-couronne-6 (CE) d'une pureté supérieure à 99% auprès de Sigma-Aldrich. Une solution contenant un mélange d'eau et de méthanol avec des proportions égales en volume a été préparée en ajoutant 1% d'acide acétique pour assurer la protonation des molécules. Afin de produire le complexe non-covalent entre le tri-peptide protoné et le CE, il est nécessaire de mettre la poudre des molécules d'éther couronne dans la solution composée d'eau et de méthanol. La concentration est d'environ 10 $\mu$M pour KYK et 30 $\mu$M pour CE. Les expériences de dissociation induite par collision (CID), par capture d'électron (ECD) ou par transfert d'électron (ETD) ont été réalisées au sein du laboratoire de chimie moléculaire à l'école Polytechnique à Palaiseau au moyen d'un spectromètre de masse FT-ICR commercial, en utilisant un instrument Bruker Solarix XR (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne) équipé d'un aimant supra-conducteur produisant un champ magnétique de 9.4 Tesla et d'une cellule ICR (voir la figure 5.3).

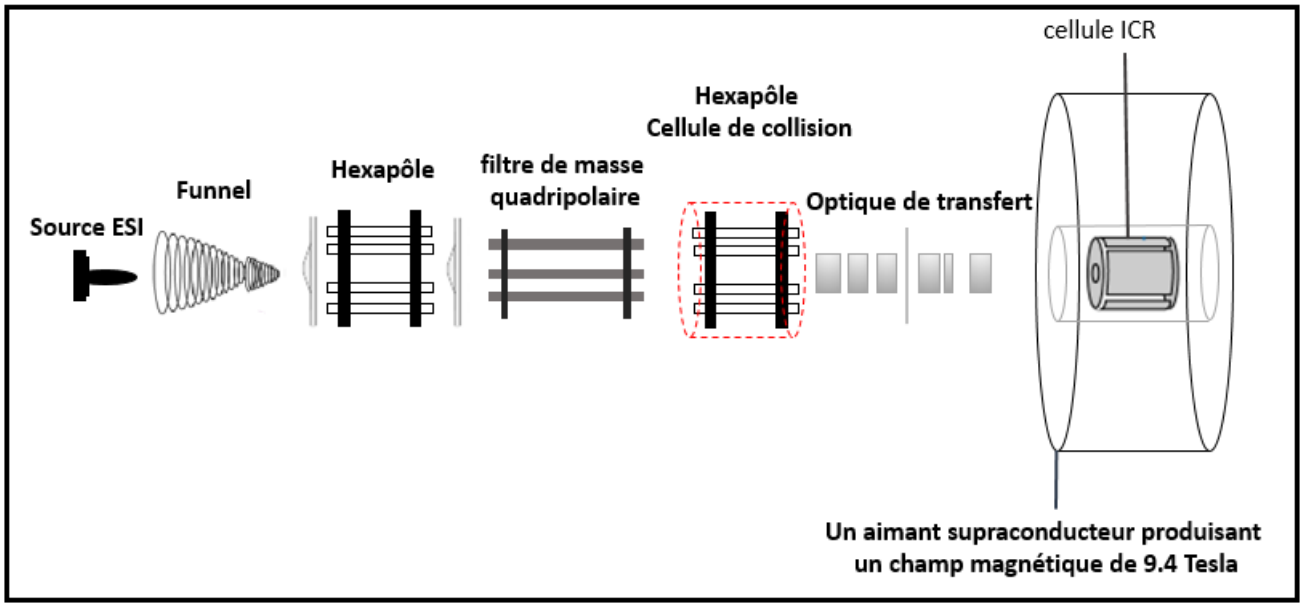


FIGURE 5.3 – schéma du spectromètre de masse FT-ICR

Les ions formés par une source ESI sont guidés au travers d'un funnel afin de favoriser la transmission des ions, et d'un hexapôle pour les acheminer vers un filtre de masse quadripolaire (QMF) afin de sélectionner l'ion moléculaire d'intérêt selon son rapport m/z. Ensuite, les ions sont accumulés dans un hexapôle dans lequel des anions fluoranthène sont injectés afin d'effectuer les expériences de dissociation par transfert d'électron. La période d'injection est de 60 ms pour les complexes doublement protonés et de 20 ms dans le cas des complexes triplement protonés afin de limiter le transfert

de deux électrons. L'injection d'argon est effectuée pour les expériences de CID dont la tension de collision est égale à 5V. Une optique de transfert permet de guider les ions produits vers une cellule ICR de type $Paracell^{TM}$, où les ions sont stockés et l'analyse du rapport m/z est effectuée avec une résolution d'environ $3.10^5$. Pour les expériences d'ECD, une injection d'électrons de faible énergie (0-2 eV) est appliquée dans la cellule pendant 100 ms.

Les expériences de spectrométrie de mobilité ionique se sont déroulées au sein de l'Institut de Chimie Physique d'Orsay en utilisant un montage commercial (Synapt G2-Si, Waters Company, Manchester, Royaume-Uni) équipé d'une cellule de type TWIMS (travelling wave ion mobility spectrometry) [142] (voir la figure 5.4). Les ions sont produits par une source électrospray de type Z-Spray, leur trajectoire ayant la forme d'un Z grâce à la géométrie des électrodes apparaissant sur la figure 5.4 permettant d'éliminer les molécules neutres. Ils sont ensuite transférés vers un système de guidage d'ions grâce à un système d'onde progressive (StepWave sur la figure 5.4). Ce système est basé sur une technique selon laquelle les ions sont soumis à un champ électrique, grâce à la différence de potentiel appliquée entre les électrodes. C'est donc ce champ électrique qui pousse les ions le long de la cellule de mobilité. Les ions acquièrent une vitesse stationnaire différente en fonction de leur masse, de leur charge, mais aussi en fonction de leur section efficace de collision. Les ions sont ensuite sélectionnés selon leur rapport m/z par un filtre quadripolaire avant d'être dirigés vers une cellule de mobilité (Triwave sur la figure 5.4) dans laquelle les conformères de différentes sections efficaces de collision vont être séparés dans l'espace et dans le temps. Cette cellule est composée de quatre cellules successives à ondes progressives remplies de différents gaz. De l'argon au niveau de la première cellule (notée "piège" sur la figure 5.4) permet de stocker les ions de manière à synchroniser leur injection en paquets dans la cellule de mobilité. Dans la deuxième cellule, de l'hélium est présent dans le but d'éviter la fragmentation des ions lors de leur injection dans la cellule de mobilité. Puis de l'azote dans la troisième cellule (notée "séparation" sur la figure 5.4) dans laquelle s'effectue la séparation des ions par mobilité, et à nouveau de l'argon dans la quatrième cellule permettant le transfert des ions par paquet afin de garantir une injection synchronisée de tous les ions vers un spectromètre de masse à temps de vol qui permet d'analyser les ions selon leur rapport m/z. L'étalonnage des rapports m/z a été réalisé en utilisant du trifluoroacétate de sodium, l'erreur de mesure étant inférieure à 5 ppm. Des expériences d'ETD ont été réalisées en injectant dans le piège des anions de dicyanobenzène (m/z = 128) produits par une source à décharge. Un étalonnage des sections efficaces de collision (CCS) a été fait pour chaque état de charge ($1^+$, $2^+$, $3^+$) à l'aide de mesures IMS de polyalanines protonés avec une large distribution en taille.

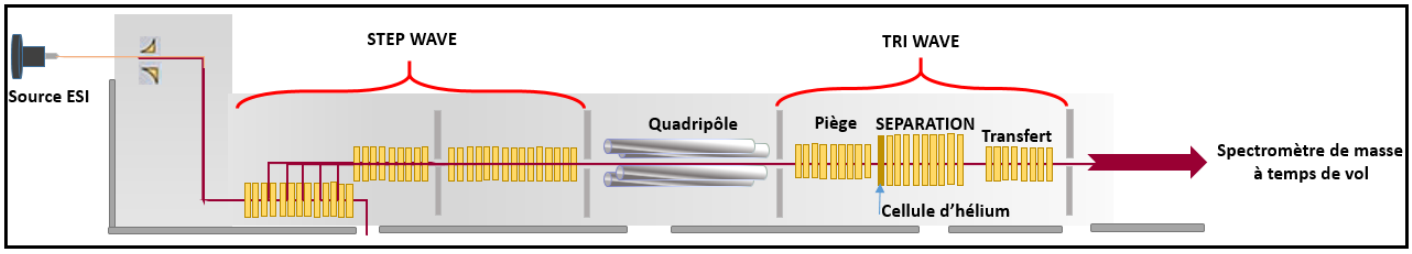


FIGURE 5.4 – Représentation schématique du montage de mobilité ionique

## 5.2 Simulation de la structure géométrique et de la section efficace de collision de complexes KYK-CE

La comparaison des valeurs de sections efficaces de collision expérimentales et théoriques offre la possibilité d'obtenir des informations sur la structure des différents systèmes moléculaires étudiés. Tout d'abord, avant de calculer les sections efficaces de collision, nous devons générer une structure géométrique pour chaque espèce étudiée. C'est pour cela qu'une recherche de conformation a été effectuée en réalisant des simulations de dynamique moléculaire avec échange de répliques (REMD) [123]. Ce type de simulation permet de réaliser un échantillonage rapide et efficace de la surface d'énergie potentielle d'un système moléculaire, de manière à obtenir la structure de la conformation de plus basse énergie. Nous avons employé le champ de force AMBER99 [124] et 30 répliques qui ont été simulées à des températures suivant une progression géométrique de 10 à 600 K. Chaque réplique a été propagée pendant 20 ps afin d'atteindre l'équilibre thermique, puis pendant 2 ns supplémentaires par pas de 1 fs. L'algorithme thermostatique de Berendsen [125] a été utilisé pour contrôler l'équilibre thermique avec une constante de couplage de 0,1 $ps^{-1}$. La structure de chaque réplique a été prise toutes les 40 ps et l'échange de répliques adjacentes a été tenté toutes les 100 fs. Toutes les géométries obtenues ont été minimisées en énergie avec le champ de force AMBER99. La structure de la conformation de plus basse énergie d'un système a été choisie pour déterminer la section efficace de collision. De plus, des calculs avec la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) ont été effectués à 0 K pour obtenir les énergies relatives des différents conformères obtenus grâce aux calculs réalisés par REMD. La fonctionnelle M06 ainsi que les bases 6-31+G (d, p) et 6-311++G(2d, 2p) ont été choisies et des calculs énergétiques effectués dans l'état fondamental des espèces étudiées.

La méthode de simulation des sections efficaces de collision que avons utilisée consiste en un calcul de la mobilité de l'ion à travers le gaz d'azote en approximant le transfert de quantité de mouvement subi par les molécules de gaz lorsque leur trajectoire est déviée par l'ion moléculaire. En effet, lorsque

l'équilibre entre la force électrostatique due au champ électrique et la force de friction avec le gaz est atteint, les ions ont une vitesse stationnaire qui permet de les séparer, à charge égale en se basant sur leur section efficace de collision. La méthode des trajectoires a été utilisée pour la simulation de $3.10^5$ molécules de $N_2$. Une distribution de Maxwell-Boltzmann est appliquée pour la vitesse et les angles d'incidence des molécules de gaz ( Pression = 100 Pa, polarisabilité = 1.7 Å$^3$, rayon de van der Waals = 1.5 Å et température = 298 K) entrant en collision avec un ion moléculaire à travers un potentiel d'interaction de Lennard-Jones. Après collision, les molécules de gaz sont ré-émises avec une vitesse calculée comme la moyenne des vitesses incidentes. Trois directions perpendiculaires sont choisies et la mobilité est calculée pour chacune des directions. La moyenne des trois valeurs de mobilité obtenues est alors convertie en section efficace de collision suivant l'équation suivante [143] :

$$\Omega = \frac{3ze}{4\rho Z_p}\sqrt{\frac{\pi m_{red}}{8kT}} \tag{5.1}$$

où $\Omega$ est la section efficace de collision (exprimé en Å$^2$), $z$ est la charge de l'ion moléculaire, $m_{red}$ est la masse réduite du gaz d'azote et de l'ion, $\rho$ est la densité du gaz de mobilité, $Z_p$ est la mobilité ionique, $T$ est la température du gaz exprimé en Kelvin et $k$ est la constante de Boltzmann. La précision de la simulation a été vérifiée avec un ion moléculaire rigide de structure connue : le fullerène $C_{60}^+$. La valeur de CCS calculée est 214,3 Å$^2$, alors qu'elle a été mesurée à 213,1 Å$^2$ [144], nous pouvons conclure que cette méthode de calcul de CCS a une précision d'environ 1%. Par conséquent, les incertitudes de nos calculs figurant sur le tableau 5.11 sont déterminées de la même manière.

## 5.3 Résultats et discussions

### 5.3.1 Tri-peptide isolé

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps au tri-peptide doublement protoné non solvaté $[KYK+2H]^{2+}$ situé à un rapport m/z = 219,638 (voir la figure 5.5). Nous pouvons remarquer que les spectres de masse après capture d'électron (ECD) et transfert d'électron (ETD) sont dominés par des pics associés à des fragments typiques des peptides protonés. En effet, si la capture d'électron se fait sur un des sites chargés positivement (ici un des groupements $NH_3^+$) elle peut être suivie par un transfert d'hydrogène, ce qui conduit à la rupture de la liaison $N - C_\alpha$ entraînant ensuite la formation de fragments de type c/z [145] [50]. Nous pouvons aussi mentionner qu'une perte de $NH_3$ est présente pour l'espèce réduite en ETD, mais aussi pour les fragments $a_1^+$, $a_2^+$ et $b_2^+$ en ECD. Cette perte est due à une très faible barrière de l'ordre de 0,4 eV [146]. Cependant, d'autres fragments

apparaissent, notamment des fragments de type a, b, y et w. De précédentes études ont montré que les ions de type b et y proviennent d'une fragmentation supplémentaire de l'espèce réduite après la perte d'un atome d'hydrogène [147]. L'observation des fragments de type w a notamment été décrite dans la littérature indiquant que ces derniers proviennent des ions z [147] [148]. En ce qui concerne les résultats obtenus après ETD, nous pouvons constater que certaines voies de fragmentation induites par ETD sont les mêmes que celles obtenues après ECD, notamment la présence des fragments de type c et z après la rupture de la liaison $N - C_\alpha$ du squelette peptidique mais avec une probabilité bien plus grande. En revanche, des différences sont observées : la perte de H est très abondante, et les ions a, b et y sont bien moins abondants. Cela est sans doute dû à l'énergie de recombinaison de l'électron, plus faible en ETD (3 eV [149]) qu'en ECD (4,3 eV [150]). Cette différence entre les deux valeurs obtenues pour l'ETD et l'ECD correspond à une différence d'énergie transférée au peptide $[KYK + 2H]^{2+}$. L'énergie interne déposée par $[KYK + 2H]^{2+}$ après ECD de $[KYK + 2H]^{2+}(H_2O)_n$ a une valeur de 69 kcal/mol, soit 2.99 eV, mesurée par nanocalorimétrie. Cela correspond, en effet, à l'intersection des courbes d'apparition en tailles des ions précurseurs de $[KYK + H]^+$ et le fragment $c_2^+$ [150].

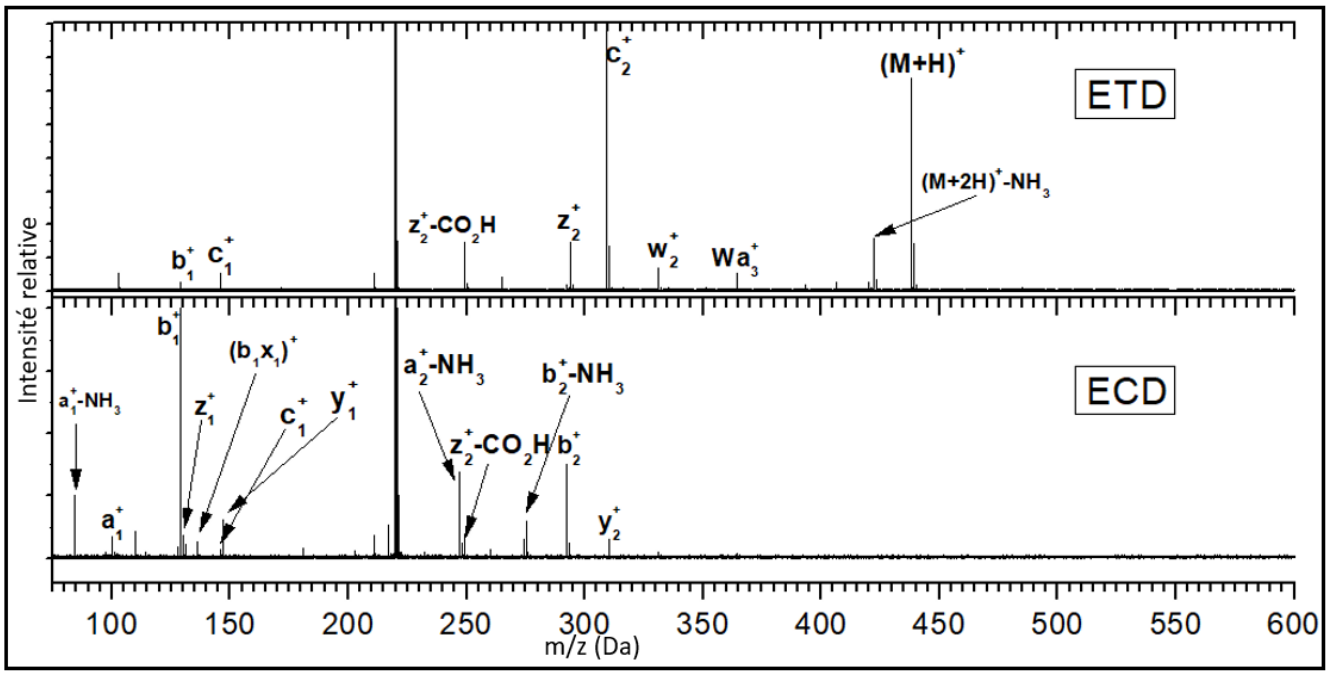


FIGURE 5.5 – Spectres de masse du après capture (ECD) et transfert d'électron (ETD) tri-peptide isolé $[KYK + 2H]^{2+}$ situé à un rapport m/z = 219,638

### 5.3.2 Effet de la nano-solvatation

La figure 5.6 compare les résultats obtenus après CID, ECD et ETD du tri-peptide doublement protoné auquel une seule molécule d'éther 18-couronne-6 est attachée $[KYK + 2H]^{2+}(CE)_1$.

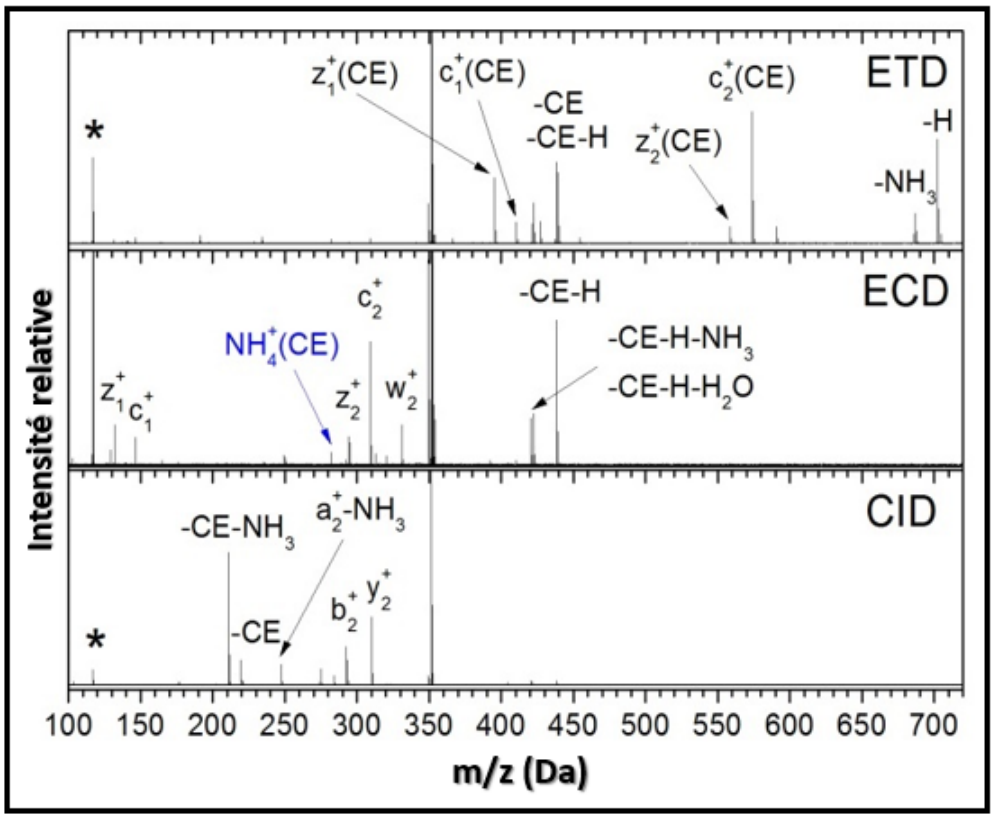


FIGURE 5.6 – Spectres de masse des espèces cationiques produites après CID à 15 V, ECD et ETD de $[KYK + 2H]^{2+}(CE)_1$, (m/z = 351.7). Le fragment $NH_4^+(CE)$ indiqué en bleu. Les astérisques indiquent la seconde harmonique de l'ion précurseur.

Nous pouvons remarquer que la majorité des pics peuvent être attribués à des fragments déjà observés pour $[KYK + 2H]^{2+}$, à l'exception du fragment $NH_4^+(CE)$ qui est formé après ECD et ETD. Ce fragment peut s'expliquer par l'attachement de l'électron sur une orbitale $\sigma^*$ au niveau de la liaison C-N du groupe $R-NH_3^+(CE)_1$ de la lysine (voir la figure 5.7), suivi par la rupture de cette liaison, de la formation de $NH_3(CE)$ et d'un transfert de proton. Les protons se fixent sur les sites ayant une grande affinité protonique : dans notre cas, la présence du CE entraîne une augmentation d'affinité protonique par rapport à la molécule $NH_3$. Bien qu'il s'agisse d'une intensité faible, le pic $NH_4^+(CE)$ apparaît sur le spectre issus du transfert d'un électron d'un anion fluoranthène vers le complexe $[KYK + 2H]^{2+}(CE)_1$. Les autres pics observés sont dus aux mêmes fragments que ceux produits par ECD, mais sans évaporation du CE. Ceci est en adéquation avec des études antérieures montrant que la quantité d'énergie vibrationnelle transférée au système moléculaire est plus faible après le transfert d'un électron que par capture d'électron [151]. D'autre part, des études antérieures ont calculé l'énergie de recombinaison électronique des peptides doublement protonés : pour la capture sur $[KYK + 2H]^{2+}$, l'énergie de recombinaison est égale à 4.3 eV [150], tandis que pour le transfert, elle est de l'ordre de 3 eV [149]. Ces valeurs sont supérieures à celles des faibles barrières énergétiques

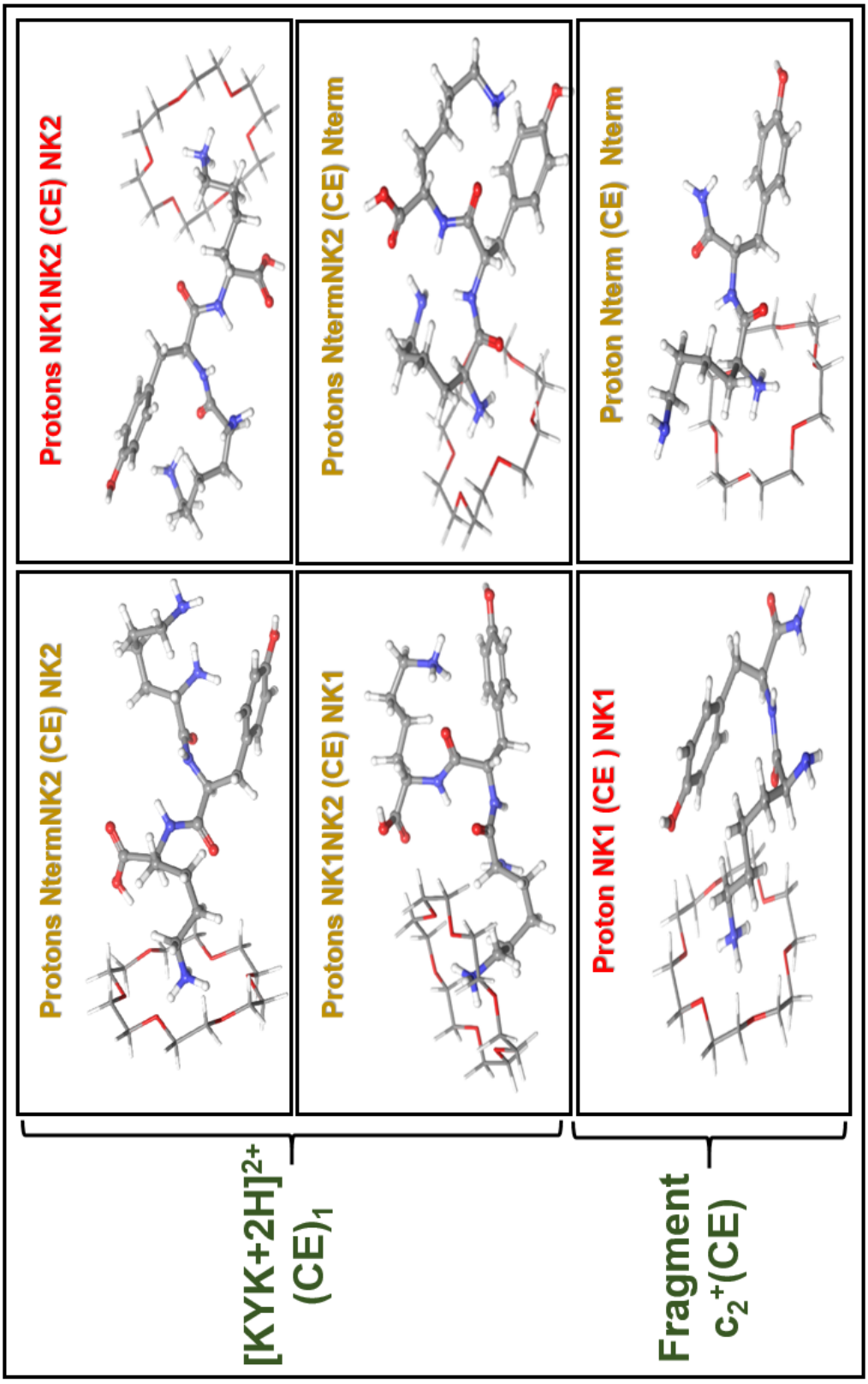


FIGURE 5.7 – Structures des conformères de la plus basse énergie de $[KYK + 2H]^{2+}(CE)_1$ et du fragment $c_2^+(CE)$, trouvés par dynamique moléculaire avec échange de répliques (REMD), montrant les combinaisons possibles des différents sites de protonation et de liaison du CE. La molécule d'éther couronne CE est représentée en modèle moléculaire "tubes". Les structures indiquées en rouge représentent les conformères de plus basse énergie. Les atomes H, C, N et O sont représentés respectivement en blanc, gris, bleu et rouge,

qui sont de l'ordre de 0.4 eV pour la rupture de la liaison $C - NH_3$ après la capture d'un électron [146] [152], et autour de 0.6 - 0.8 eV pour un transfert de proton dans le tri-peptide doublement protoné TIK [153]. Il existe donc un mécanisme menant à la baisse de l'état de charge d'un peptide protoné contenant au moins un groupement $NH_3^+$ solvaté par CE : la perte de $NH_4^+(CE)$.

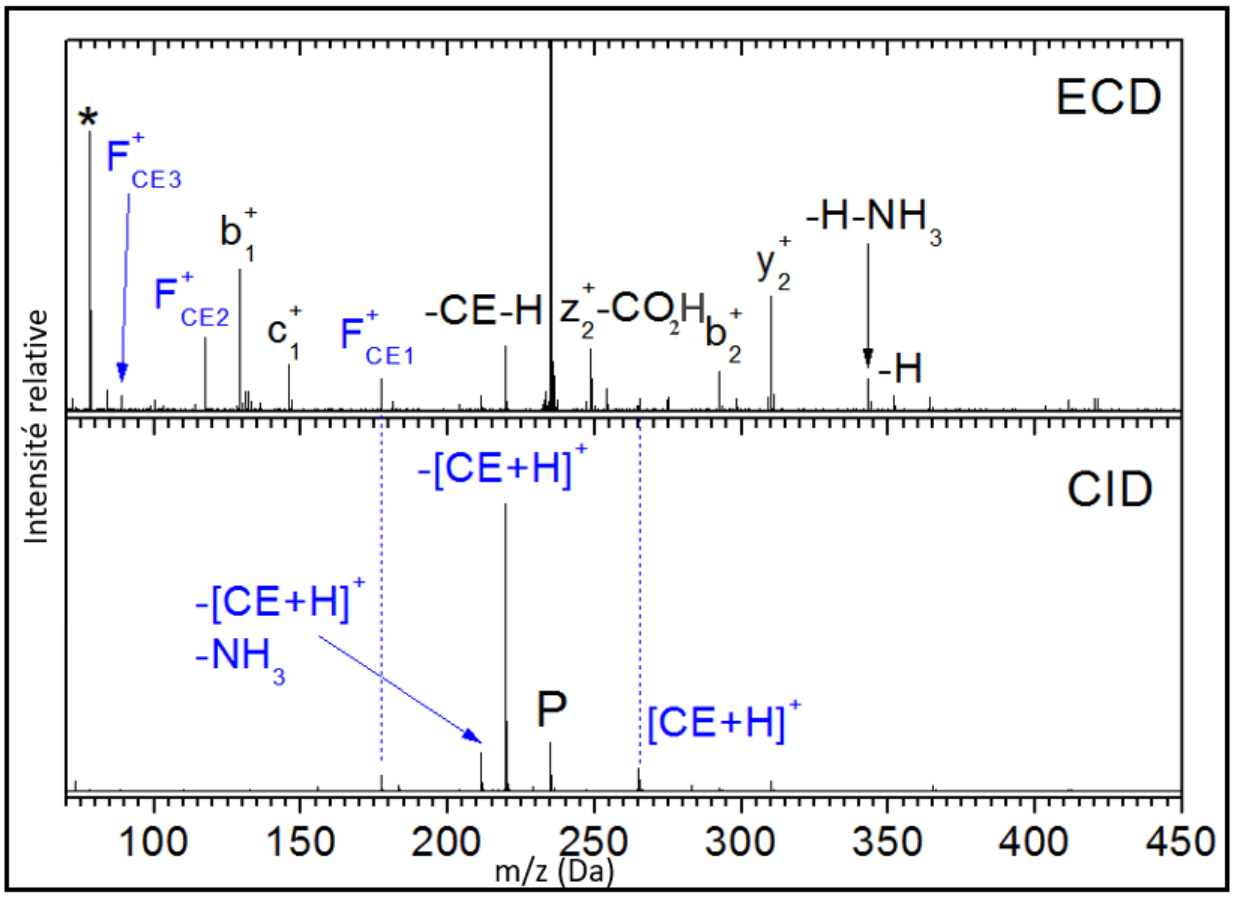


FIGURE 5.8 – Spectres de masse des espèces cationiques formées après ECD et CID à 5V du complexe triplement protoné $[KYK + 3H]^{3+}$ $(CE)_1$ (m/z = 234,814). Les fragments de l'éther 18-couronne-6 protoné noté $[CE + H]^+$ sont indiqués par $F^+_{CE1}$, $F^+_{CE1}$ et $F^+_{CE1}$ correspondent respectivement à $[C_8H_{16}O_4 + H]^+$, $[C_6H_{12}O_3 + H]^+$ et $[C_4H_8O_2 + H]^+$. L'astérisque indique la seconde harmonique de l'ion précurseur.

La figure 5.8 montre le spectre de masse obtenu après ECD de $[KYK+3H]^{3+}(CE)_1$. On constate que le nombre de fragments est beaucoup plus important qu'en CID et que le spectre est très différent : les contributions majeures observées sont les fragments complémentaires $b_1^+$ / $y_2^+$ mais aussi les fragments $b_2^+$ et $c_1^+$ produits par rupture des liaisons du squelette peptidique, la perte d'hydrogène et du CE ou d'un groupement $NH_3$ et du CE. Toutes ces observations sont cohérentes avec les études précédentes de capture d'un électron par des petits peptides protonés [154]. La présence du fragment $c_1^+$ est également observée, ce qui concorde avec la fragmentation par ECD qui mène généralement à des fragments de type c et z [53] [155] ; mais le fragment $z_2^+$ est détecté avec une perte d'une molécule de $COOH$, ce qui a déjà été observé précédemment [150]. Il est intéressant de noter que nous observons

l'éther couronne protoné $[CE + H]^+$ ainsi que ses fragments, notamment le même qu'en CID (m/z = 177.11, $[C_8H_{16}O_4 + H]^+$), mais aussi deux autres à m/z = 133,08 et m/z = 89,05 correspondant respectivement à $[C_6H_{12}O_3 + H]^+$ et à $[C_4H_8O_2 + H]^+$. Ces fragments ont déjà été mentionnés lors d'une étude antérieure portant sur la CID d'un complexe entre un éther 18-couronne-6 et un ion ammonium $NH_4^+$ [156]. Ils sont dus à des pertes successives du groupe éthylènoxy, $(CH_2CH_2O)$ qui est l'unité de répétition de la molécule d'éther 18-couronne-6. Ces interprétations ont été confirmées par le spectre obtenu par CID de $[CE + H]^+$ et illustré sur la figure 5.9.

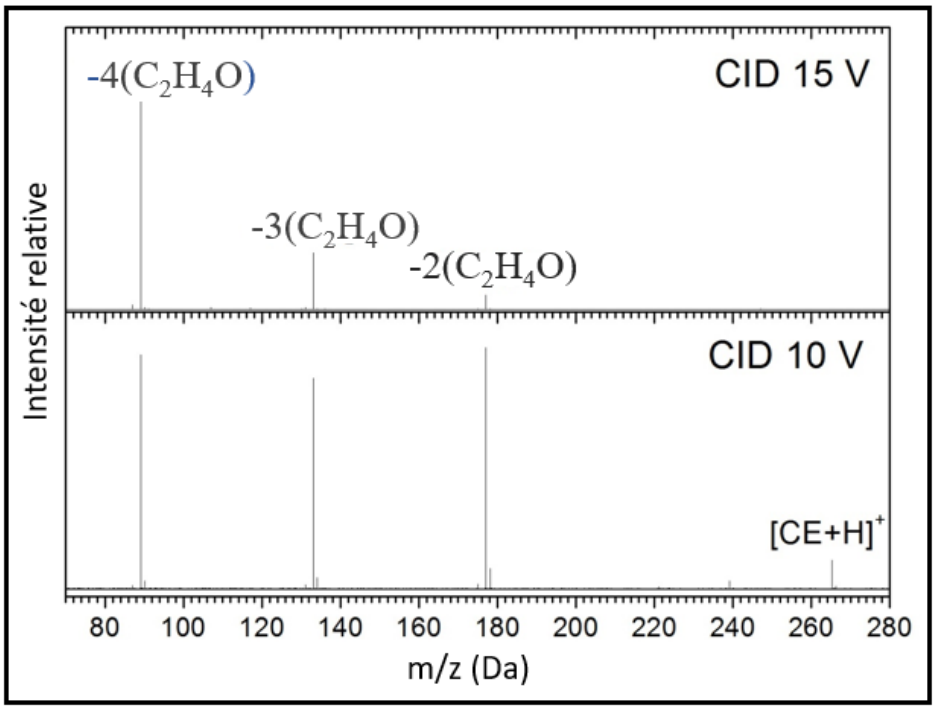


FIGURE 5.9 – Spectres de masse d'un éther couronne simplement protoné $[CE + H]^+$ (m/z = 265.1643) après CID à 10V et 15V indiquant les fragments situé à m/z = 177,11 ; 133,08 ; 89,05 provenant de 2,3 et 4 pertes successives de $C_2H_4O$

Nous avons conclu dans la partie précédente que les principaux mécanismes conduisant à la fragmentation de $[KYK + 3H]^{3+}(CE)_1$ après ECD sont la perte d'un CE, la rupture de liaisons du squelette peptidique, la perte d'hydrogène et ainsi que d'un groupement $NH_3$. Passons maintenant au spectre de masse obtenu après CID à 5V du même système. Généralement, la CID à basse énergie des molécules chargées nano-solvatées entraîne l'évaporation des molécules neutres. Cependant, nous pouvons directement remarquer sur les spectres obtenus après CID du peptide $[KYK + 3H]^{3+}$ $(CE)_1$ la présence d'un pic très intense qui correspond au peptide doublement protoné $[KYK + 2H]^{2+}$ pouvant provenir de la perte d'un éther couronne CE protoné $[CE + H]^+$. Ceci explique aussi l'observation du pic situé à m/z = 265.16 attribué à l'éther couronne protoné $[CE + H]^+$. Un autre pic est observé à

m/z = 177.11 correspond à $[C_8H_{16}O_4 + H]^+$ : nous l'avons attribué à un fragment d'éther couronne protoné. Il est également intéressant d'observer une perte de $NH_3$ du peptide doublement protoné. Cette observation est cohérente avec les études précédentes sur les peptides protonés possédant au moins une lysine [42] [150] [157]. Il convient de remarquer sur les spectres de $[KYK + 3H]^{3+}(CE)_1$ que l'intensité de $[CE + H]^+$ est plus faible en ECD qu'en CID : ceci pourrait être dû au fait que $[CE + H]^+$ est beaucoup plus excité vibrationnellement après capture d'un électron que dans le cas des collisions douces sur du gaz d'azote. Cette hypothèse est justifiée par le fait que les fragments de $[CE + H]^+$ sont moins intenses en CID qu'en ECD.

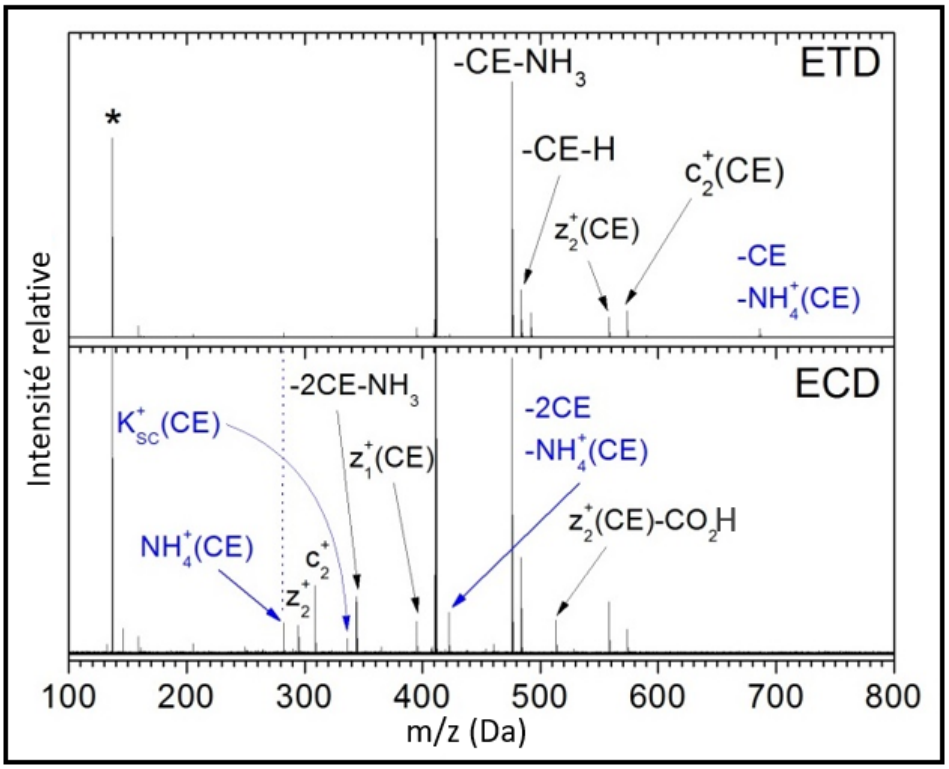


FIGURE 5.10 – Spectres de masse des espèces cationiques produites après ECD et ETD du système $[KYK + 3H]^{3+}(CE)_3$ (m/z = 410.9), les fragments attribués à la chaîne latérale de la lysine protonée liée à la molécule d'éther couronne $K^+_{sc}(CE)$ et à l'ion $NH_4^+(CE)$ sont indiqués en bleu, ainsi que les pertes de ces groupes. L'astérisque indique la seconde harmonique de l'ion précurseur.

La figure 5.10 montre les résultats obtenus après ECD et ETD du tri-peptide triplement protoné auquel trois molécules d'éther couronne sont attachées $[KYK + 3H]^{3+}(CE)_3$. La formation du fragment $NH_4^+(CE)$ est observée après ECD et ETD, mais le fragment complémentaire est également détecté, avec une perte d'une et deux molécules de CE après ETD et ECD, respectivement, ce qui est cohérent avec le fait que le système est doublement chargé après la capture ou le transfert d'un seul électron. D'une manière intéressante, un pic à m/z = 336,237 apparaît sur le spectre obtenu après ECD : ce dernier noté $K^+_{SC}(CE)$ peut être attribué à la chaîne latérale de la lysine protonée

liée à la molécule d'éther 18-couronne-6. De plus, il est possible d'avoir une estimation de l'énergie d'apparition de ce processus par la mesure de l'énergie de recombinaison d'un électron par un ion nano-solvaté triplement chargé, qui a été estimée à environ 9 eV par la méthode de "nanocalorimétrie" [158]. A notre connaissance, la perte de chaîne latérale de lysine protonée n'a jamais été observée pour les peptides protonés comme la perte de $NH_4^+$. Ceci indique que le CE joue un rôle actif.
Tous les résultats vus préalablement nous permettent de montrer que la molécule d'éther couronne peut arracher un proton ou $NH_4^+$ à des peptides protonés suite à une capture ou transfert d'électron ou bien à une activation collisionelle.

| Système moléculaire | (a) Sites de protonation | Sites de Liaison du CE | Énergie potentielle à 0 K | | Valeurs théoriques (b) CCS (Å²) | Valeurs expérimentales (c) CCS (Å²) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | MO6-311++ G(2d,2p) | MO6-31+G(d,p) | | |
| $[KYK+2H]^{2+}(CE)_1$ | NK1 NK2 | NK1 | 35,85 | 37,82 | 291± 3 | 316± 1 |
| | | K2 | 0,00 | 0,00 | 310± 3 | |
| | Nterm NK2 | Nterm | 1,20 | 2,10 | 301± 3 | |
| | | NK2 | 58,67 | 61,98 | 314± 3 | |
| Le fragment $c_2^+(CE)$ | NK1 | NK1 | 0,00 | 0,00 | 240± 3 | 236± 1 |
| | Nterm | Nterm | 98,13 | 104,14 | 246± 3 | |

FIGURE 5.11 – Sections efficaces théoriques et expérimentales (CCS) des différents conformères de $[KYK+2H]^{2+}(CE)_1$ et du fragment $c_2^+(CE)$ en collision avec l'azote, et leur énergie potentielle relative à l'état fondamental calculée à 0 K au niveau M06 / 6-311 ++ G (2d, 2p) et M06/6-31 + G(d,p). (a) : Nterm, NK1, NK2 correspondent aux groupements $NH_2$ du N-terminal, et des chaînes latérales des lysines situées respectivement du côté du N-terminal et du C-terminal. (b) : Les valeurs théoriques de CCS ont été calculées avec le logiciel IMOS, (c) : Les valeurs expérimentales sont les moyennes de celles des trois isotopes des figures 5.12 et 5.13

Le tableau 5.11 montre les valeurs des sections efficaces de collision (CCS) expérimentales et théoriques dans le cas de $[KYK+2H]^{2+}(CE)_1$. Nous avons considéré différents sites de protonation et de liaison du CE, mais nous avons exclu les conformères dont les protons sont situés sur le N-terminal et la chaîne latérale de la lysine du côté du N-terminal, à cause de la forte répulsion coulombienne. Les CCS obtenues sont mesurées dans le gaz d'azote, par l'intermédiaire des distributions des temps d'arrivée (ATD) visibles dans sur la figure 5.12, et grâce à une procédure d'étalonnage détaillée dans la partie 5.1. Nous pouvons constater que dans le cas où la molécule CE est liée à la chaîne latérale de la lysine du côté C-terminal, les résultats des calculs de CCS sont compatibles avec les valeurs obtenues expérimentalement, mais ce n'est plus le cas lorsque cette molécule se lie à un autre site de protonation. De plus, la structure du conformère de plus basse énergie potentielle, d'après les

calculs utilisant la DFT, est celle où la molécule CE est liée à la chaîne latérale de la lysine du côté C-terminal et où les deux protons sont situés sur les chaînes latérales des lysines (voir la figure 5.7). Par conséquent, en ce qui concerne la formation du fragment $NH_4^+(CE)$ observé précédemment après ETD et ECD, l'électron est probablement transféré vers la chaîne latérale de la lysine du côté C-terminal. Après formation de $NH_3(CE)$, le proton pourrait provenir soit de la chaîne latérale de l'autre lysine, soit du groupe carboxyle, mais ce dernier est moins probable puisque l'affinité protonique du groupement amine en phase gazeuse est plus faible que celle du groupement carboxylate. De plus, des études précédentes ont montré que les zwitterions en phase gazeuse n'existent que s'ils sont stabilisés par des liaisons du type "pont salin" [159] [160]. Nous avons vu que la présence d'une molécule CE dans un complexe avec un peptide protoné entraîne l'arrachement d'une charge positive via la perte de $[CE + H]^+$, $NH_4^+(CE)$ et $K_{sc}^+(CE)$.

Nous allons maintenant discuter du cas du transfert d'une molécule CE dans le complexe $[KYK + 2H]^{2+}(CE)_1$ après le transfert d'un électron. Initialement, la molécule CE se fixe préférentiellement sur la chaîne latérale de la lysine protonée du côté C-terminal (voir le paragraphe précédent), et le transfert d'un électron entraîne la formation des ions fragments $c_2^+(CE)$ et $z_1^+(CE)$ ainsi que $c_1^+(CE)$ et $z_2^+(CE)$ (voir la figure 5.8). La présence des deux fragments $z_1^+(CE)$ et $z_2^+(CE)$ peut être expliquée par la rupture des liaisons $N - C_\alpha$ sans la perte de CE de la chaîne latérale de la lysine protonée du côté C-terminal, alors que les fragments $c_1^+(CE)$ et $c_2^+(CE)$ sont inattendus, puisque la rupture des liaisons $N - C_\alpha$ devrait donner les deux fragments $c_1^+$ et $c_2^+$ ( voir la figure 5.7). Ainsi, la présence de la molécule CE sur ces fragments implique un transfert de CE du côté C-terminal vers le côté N-terminal. Des études sur des complexes entre le CE et des peptides d'oligolysine [161] ainsi que sur des dendrimères de polypropylène amine [162] ont montré que le CE peut se déplacer avec un proton d'un site $R - NH_3^+$ vers un site $R - NH_2$ voisin.

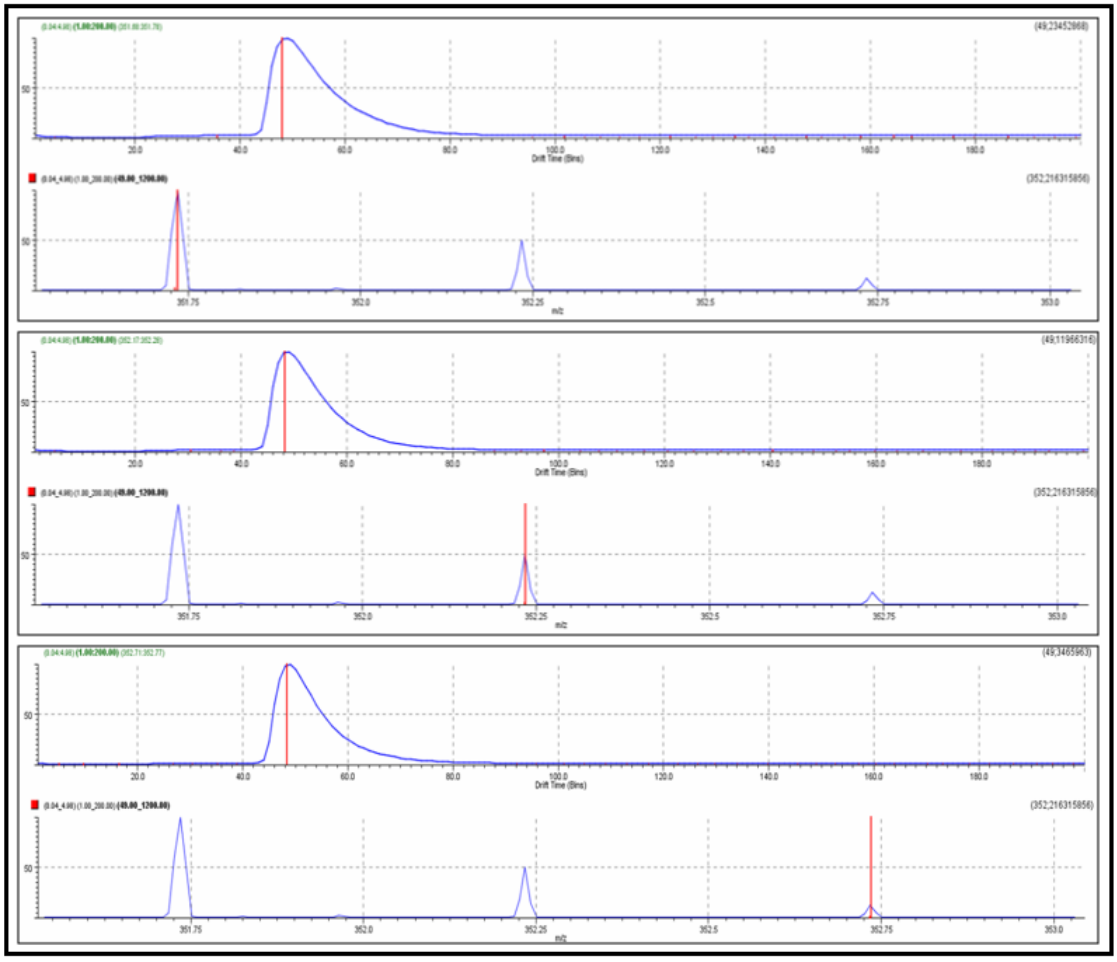

FIGURE 5.12 – Distribution des temps d'arrivée (ATD) et spectres de masse de $[KYK+2H]^{2+}(CE)_1$, en haut : sans $^{13}C$ (m/z = 351.7), au milieu avec un seul $^{13}C$ (m/z = 352,2) et avec deux $^{13}C$ (m/z = 352.7). Les traits rouges représentés sur les ATD sont situés aux temps d'arrivée 2,5238, 2,5343 et 2,5443 ms et correspondent aux valeurs expérimentales de CCS 315,38, 316,23 et 317,03 Å$^2$, respectivement. La valeur indiquée dans le tableau 5.11 est la moyenne de ces trois valeurs avec une incertitude qui permet de les inclure toutes.

Dans ces études [161] [162], la mobilité du CE a été déduite d'après des résultats expérimentaux de spectrométrie de masse en utilisant la technique d'échange H/D, mais aucune mesure structurale directe n'a été publiée jusqu'à présent. C'est aussi la première fois qu'il est montré que ce processus se produit après le transfert d'un électron. On en déduit que la capture d'un électron peut se produire au niveau de la chaîne latérale de la lysine du côté N-terminal du complexe $[KYK+2H]^{2+}(CE)_1$ avant le transfert d'un H sur le squelette peptidique, la rupture de la liaison $N-C_\alpha$, puis le transfert d'un CE et d'un proton. La chaîne latérale de la lysine protonée côté N-terminal devrait être le principal site de transfert d'un électron car son énergie de recombinaison est plus élevée que celle liée au CE [163]. De plus, nous pouvons déduire le site de la liaison de CE après le transfert et la formation de $c_2^+(CE)$, à partir des mesures et des calculs de mobilité ionique (voir le tableau 5.11). Le conformère $c_2^+(CE)$ de plus basse énergie, lorsque le CE est lié à la chaîne latérale de la lysine (voir la figure 5.7),

a la section efficace de collision la plus proche de la valeur expérimentale et l'énergie potentielle de l'autre conformère dans le cas où le CE est lié au N-terminal (voir figure 5.7) est très élevée (environ 1 eV). Ainsi, après le transfert d'électron vers la chaîne latérale de la lysine du côté N-terminal, le CE est très probablement transféré avec un proton vers cette même chaîne latérale.

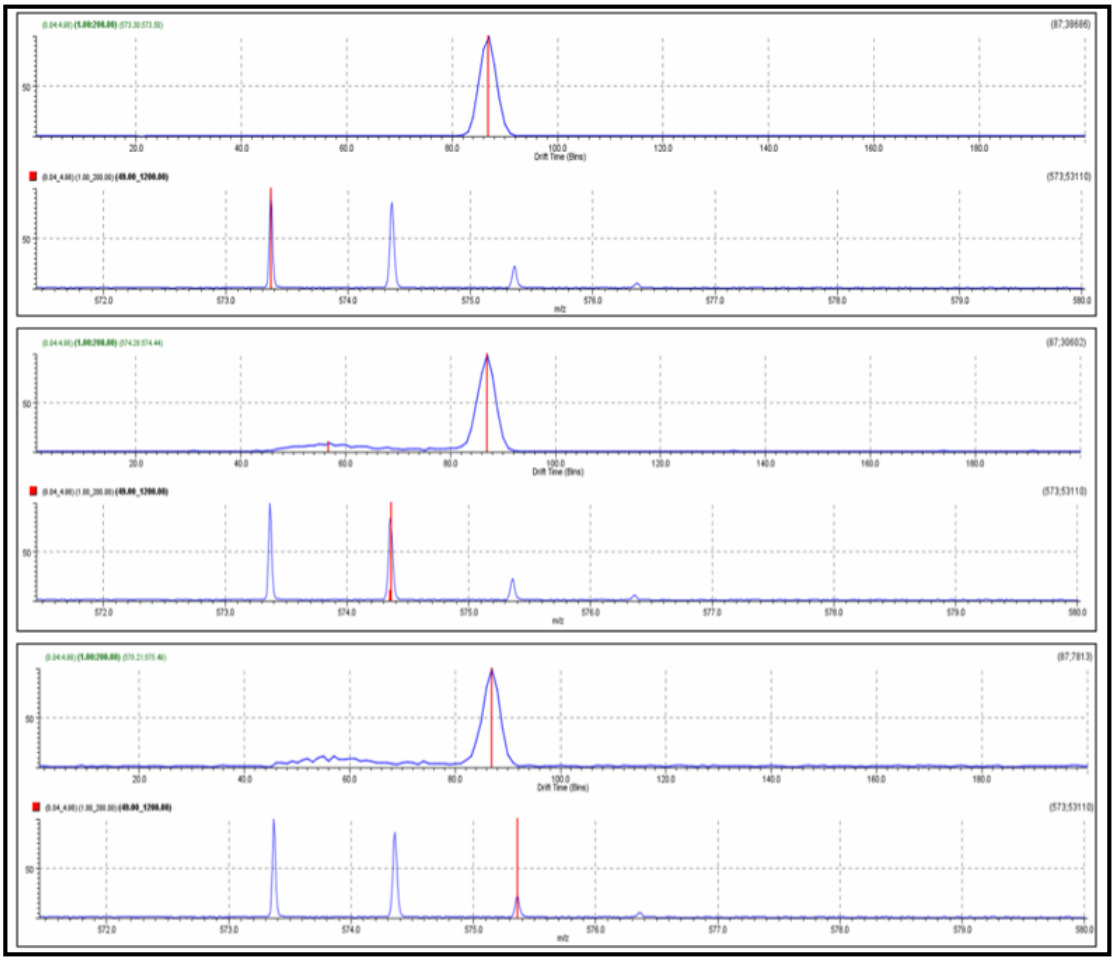

FIGURE 5.13 – Distribution des temps d'arrivée (ATD) et spectres de masse de $c_2^+(CE)$, en haut : sans $13^C$ (m/z = 573,4), au milieu avec un seul $^{13}C$ (m/z = 574,4) et en bas avec deux $^{13}C$ (m/z = 575,4). Les traits rouges représentés sur les ATD sont situés aux temps d'arrivée 4,6245, 4,6349 et à 4.6316 ms et correspondent aux valeurs expérimentales de CCS 236,29, 236,60 et 236.49 Å$^2$, respectivement. La valeur indiquée dans le tableau 5.11 est la moyenne de ces trois valeurs avec une incertitude qui permet de les inclure toutes.

## 5.4 Conclusion

L'étude des différentes techniques par spectrométrie de FT-ICR est une démarche intéressante qui vise à caractériser les effets de la nano-solvatation permettant d'obtenir un éclairage sur l'influence d'un environnement sur les processus qui mènent à la dissociation. En particulier, nous montrons que la formation d'un complexe par l'attachement de la molécule d'éther couronne modifie fortement

sa fonction puisque le CE peut jouer un rôle actif lorsqu'il est lié aux peptides protonés : la molécule d'éther couronne peut arracher un proton des peptides protonés suite à une capture d'électron ou bien à une activation collisionelle par la perte d'un CE protoné et même changer de site de liaison après ETD.

# Chapitre 6

# Conclusions et Perspectives

Comprendre le comportement de la matière irradiée par des rayonnements ionisants est un des buts de la recherche fondamentale. De plus, certains traitements médicaux utilisent les rayonnements ionisants pour induire la mort des cellules cancéreuses. La radiothérapie est l'un de ces traitements et utilise des photons. Les processus moléculaires à la base de l'efficacité de la radiothérapie ne sont que peu connus, à cause du manque d'études concernant l'irradiation de molécules biologiques.

Dans la première partie des résultats de ce manuscrit, nous avons présenté les processus radio-induits dans des complexes non-covalents jouant un rôle dans la reconnaissance moléculaire entre un médicament et son récepteur, dans le but de comprendre comment les interactions non-covalentes sont affectées par les rayonnements ionisants. En collaboration avec le groupe de Thomas Schlathölter, nous avons étudié la photo-absorption des complexes non-covalents protonés et déprotonés de la vancomycine et son récepteur en phase gazeuse sur une large gamme d'énergie de photon allant de 14 à 531,5 eV, au moyen d'un spectromètre de masse couplé à des lignes de faisceau synchrotron. Lors des irradiations par photon VUV, nous avons montré que la photo-absorption des complexes non-covalents ioniques isolés conduit à des processus très différents pour les anions et les cations, la structure géométrique jouant aussi un rôle. Pour les espèces protonées, l'ionisation non dissociative est observée pour la vancomycine isolée, contrairement au cas des complexes non-covalents, ce qui est sans doute dû à leur faible énergie de liaison. La fragmentation est ainsi le processus majeur observé. En particulier, celle du squelette peptidique de la vancomycine, ainsi que la rupture facile de la liaison glycosidique le liant au groupement sucre, causées par le transfert d'une partie de l'énergie du photon en énergie interne vibrationnelle. Pour les espèces déprotonées : nous observons beaucoup moins de voies de fragmentation après le détachement d'électron. Les espèces déprotonées contenant des groupes carboxylates subissent le détachement d'électron après la photo-absorption,

et les processus majeurs sont alors la perte de $CO_2$ et la dissociation intermoléculaire des complexes. Nous avons constaté que pour ces derniers, les liaisons non-covalentes ne sont pas systématiquement rompues après la photo-absorption, ce qui est cohérent avec la grande énergie de liaison du complexe avec sa structure native, où le groupe $CO_2$ du récepteur est fortement lié à la poche de liaison de la vancomycine. Nous avons donc montré que la fragmentation des systèmes moléculaires après absorption d'un photon VUV est en partie corrélée à leur structure : notamment, le complexe protoné est moins stable que le déprotoné, probablement parce que l'énergie de liaison du complexe déprotoné est plus élevée que celle du complexe protoné, ce qui est cohérent avec le fait que la structure native n'est conservée que pour les espèces déprotonées.

Nous avons étudié la photo-ionisation des mêmes systèmes moléculaires protonés à plus haute énergie de photon. Lors des irradiations par photons X, nous avons montré qu'une partie du spectre de masse contient des pics qui proviennent de fragments des groupes créés par les modifications post-traductionnelles (PTM) particulièrement complexes et denses de la vancomycine. De plus, ces pics ne changent quasiment pas d'aspect, non seulement vis-à-vis de l'énergie des photons X sur une large gamme d'énergie [100-531,5] eV, mais également vis-à-vis de l'environnement moléculaire de la vancomycine. Par conséquent, ces pics peuvent être considérés comme une signature spectrale du réseau de PTM de la vancomycine. Cette preuve de principe élargit le potentiel des techniques de spectrométrie de masse en protéomique. Des travaux supplémentaires seraient nécessaires pour tester l'applicabilité de cette méthode à d'autres peptides et protéines et à une gamme plus large de PTM.

Dans la deuxième partie des résultats de ce manuscrit, nous avons mis en évidence que la présence d'une ou plusieurs molécules d'éther couronne, liées de manière non-covalente à un peptide protoné, modifie sa réponse après activation, avec notamment l'apparition de nouveaux canaux de dissociation. Contrairement à ce que l'on supposait précédemment, cette molécule n'est donc pas toujours spectatrice, puisqu'elle peut baisser l'état de charge d'un peptide protoné en lui arrachant un proton ou une molécule protonée et peut même changer de site de liaison suite à un transfert d'électron.

Pour la suite, des études supplémentaires nous permettraient d'aller plus loin dans la compréhension des processus radio-induits, en particulier, en utilisant des faisceaux d'ions. Ces derniers permettraient, lors d'un traitement du cancer, de concentrer très précisément la quantité d'énergie déposée dans la tumeur dans le but de préserver les tissus sains avoisinants. La découverte de l'hadronthérapie dans les années 1950, ouvre de nouvelles voies d'innovation pour la radiothérapie. Cette méthode

permet de traiter des cancers radio-résistants ou des tumeurs inopérables car situées près d'organes sensibles, utilisant des faisceaux de hadrons tels que des protons et des ions carbone qui présentent de nombreux avantages par rapport aux photons.

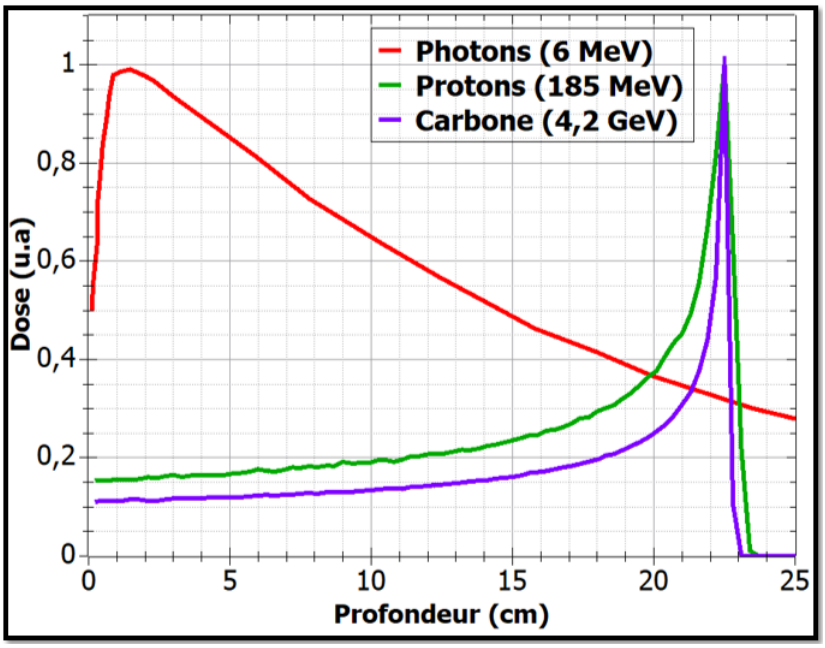


FIGURE 6.1 – schéma présentant la dose déposée par différents faisceaux (photons, protons et carbone) en fonction de la profondeur dans l'eau [164].

En effet, les ions d'une énergie cinétique de l'ordre de 100 MeV/u pénètrent dans les tissus en ayant une diffusion latérale réduite et jusqu'à une profondeur définie par l'énergie du faisceau incident. De plus, les ions déposent dans la matière un maximum d'énergie à la fin de leur parcours : ceci est présenté sous forme d'un pic appelé "pic de Bragg" (voir la figure 6.1). Le but est de choisir l'énergie cinétique des ions de façon à ce que la position du pic de Bragg se localise au niveau de la tumeur pour limiter les dommages collatéraux impliqués par la radiothérapie. Donc, il pourrait être intéressant d'étudier les processus radio-induits dans les complexes non-covalents étudiés dans cette thèse par des faisceaux d'ions et de comparer les résultats avec les rayons X.

A la suite de ces expériences, des études portant sur une complexification de l'environnement pourront être effectuées, comme dans le cas des biomolécules hydratées, c'est-à-dire des biomolécules sur lesquelles sont attachées une ou plusieurs molécules d'eau. En tout état de cause, on pourrait s'attendre à un effet de l'hydratation pouvant modifier des voies de fragmentation de la molécule.

# Bibliographie


[1] Institut Nationnal Du Cancer. L'activité hospitalière en cancérologie. *https ://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Activite-hospitaliere*.

[2] Clark J. Edexcell IGCSE CHEMISTRY Syllabus. s.l. *Pearson*, 2009.

[3] Lias S.G., Bartmess J.E., Liebman J.F., Holmes J.L., Levin R.D., and Mallard W.G. Gas-phase ion and neutral thermochemistry. *J. Phys. and Chem.*, 17(1) :433–438, 1988.

[4] National Human Genome Research Institute. DNA double helix. *https://www.genome.gov/genetics-glossary/Double-Helix*.

[5] P. Roepstorff and J. Fohlman. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry*, 11(11) :601, 1984.

[6] Emil Fischer and Ferd. Tiemann. Ueber das glucosamin. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 27(1) :138–147, 1894.

[7] A. J. Dempster. Positive ray analysis of lithium and magnesium. *Physical Review*, 6(18) :415–422, 1921.

[8] M. S. B. Munson and F. H. Field. Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction. *Journal of the American Chemical Society*, 88(12) :2621–2630, 1966.

[9] Koichi Tanaka, Hiroaki Waki, Yutaka Ido, Satoshi Akita, Yoshikazu Yoshida, Tamio Yoshida, and T. Matsuo. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time of flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2(8) :151–153, 1988.

[10] Marc R. Chevrier, Robert J. Cotter, and P. Roepstorff. A matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometer based on a 600ps, 1.2 mj nitrogen laser. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 5(12) :611–617, 1991.

[11] Michael Karas and Franz Hillenkamp. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons. *Analytical Chemistry*, 60(20) :2299–2301, 1988.

[12] Masamichi Yamashita and John B. Fenn. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *Journal of Physical Chemistry*, 88(20) :4451–4459, 1984.

[13] S. F. Wong, C. K. Meng, and J. B. Fenn. Multiple charging in electrospray ionization of poly(ethylene glycols). *The Journal of Physical Chemistry*, 92(2) :546–550, 1988.

[14] K. W.M. Siu, R. Guevremont, J. C.Y. Le Blanc, R. T. O'Brien, and S. S. Berman. Is droplet evaporation crucial in the mechanism of electrospray mass spectrometry ? *Organic Mass Spectrometry*, 28(5) :579–584, 1993.

[15] Tatiana C. Rohner, Niels Lion, and Hubert H. Girault. Electrochemical and theoretical aspects of electrospray ionisation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 6(12) :3056–3068, 2004.

[16] Malcolm Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, and M. B. Alice. Molecular beams of macroions. *The Journal of Chemical Physics*, 49(5) :2240–2249, 1968.

[17] J. V. Iribarne and B. A. Thomson. On the evaporation of small ions from charged droplets. *The Journal of Chemical Physics*, 64(6) :2287–2294, 1976.

[18] Taeman Kim, Aleksey V. Tolmachev, Richard Harkewicz, David C. Prior, Gordon Anderson, Harold R. Udseth, Richard D. Smith, Thomas H. Bailey, Sergey Rakov, and Jean H. Futrell. Design and implementation of a new electrodynamic ion funnel. *Analytical Chemistry*, 72(10) :2247–2255, 2000.

[19] T. Kelly Ryan, V. Tolmachev Aleksey, S. Page Jason, Tang Keqi, and D. Smith Richard. The ion funnel : theory, implementations, and applications. *Mass Spectrom Rev.*, 29(2) :294–312, 2010.

[20] F.M. Ma and S. Taylor. Simulation of ion trajectories through the mass filter of a quadrupole mass spectrometer. *IEE Proceedings - Science, Measurement and Technology*, 143(1) :71–76, 1996.

[21] Wolfgang Paul and Helmut Steinwedel. Apparatus for separating charged particles of different specific charges. 1960.

[22] F. Ramsey Norman, G. Dehmelt Hans, and Paul Wolfgang. The Nobel Prize in Physics 1989 . *The Royal Swedish Academy of Sciences*, page https ://www.nobelprize.org/prizes/physics/1989/summary/, 1989.

[23] W Paul and H Steinwedel. A new mass spectrometer without a magnetic field. *Z. Nautrforsch*, pages 448–450, 1953.

[24] J. D. Prestage, G. J. Dick, and L. Maleki. New ion trap for frequency standard applications. *Journal of Applied Physics*, 66(3) :1013–1017, 1989.

[25] Donald J Douglas, Aaron J. Frank, and Dunmin Mao. Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews*, 24 1 :1–29, 2005.

[26] John R. Yates, Daniel Cociorva, Lujian Liao, and Vlad Zabrouskov. Performance of a linear ion trap-orbitrap hybrid for peptide analysis. *Analytical Chemistry*, 78(2) :493–500, 2006.

[27] Yishu Song, Guangxiang Wu, Qingyu Song, R. Graham Cooks, Zheng Ouyang, and Wolfgang R. Plass. Novel linear ion trap mass analyzer composed of four planar electrodes. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 17(4) :631–639, 2006.

[28] Jae C. Schwartz, Michael W. Senko, and John E. P. Syka. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 13(6) :659–669, 2002.

[29] Alexander Makarov. Electrostatic axially harmonic orbital trapping : A high-performance technique of mass analysis. *Analytical Chemistry*, 72(6) :1156–1162, 2000.

[30] Dr. Rüdiger Paschotta. Microchannel Plates. *RP Photonics Encyclopedia*, pages https ://www.rp–photonics.com/microchannel plates.html.

[31] B.Comisarow Melvin and G.Marshall Alan. Fourier transform ion cyclotron resonance. *Chemical physics letters*, 25(2) :282–283, 1974.

[32] Ernest O. Lawrence. THE PRODUCTION OF HIGH SPEED LIGHT IONS WITHOUT THE USE OF HIGH VOLTAGES. *Physical Review*, 40 :19–37, 1932.

[33] FT-ICR Fourier Transform Mass Spectromer . pages http ://mass–spectro.com/ft–icr–2, 2016.

[34] Frederic A. Hopf, Robert F. Shea, and Marlan O. Scully. Theory of optical free-induction decay and two-photon superradiance. *Phys. Rev. A*, 7 :2105–2110, 1973.

[35] H. E. Revercomb and E. A. Mason. Theory of plasma chromatography/gaseous electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 47(7) :970–983, 1975.

[36] E. W. McDaniel, D. W. Martin, and W. S. Barnes. Drift tube-mass spectrometer for studies of low-energy ion-molecule reactions. *Review of Scientific Instruments*, 33(1) :2–7, 1962.

[37] W. S. Barnes, D. W. Martin, and E. W. McDaniel. Mass spectrographic identification of the ion observed in hydrogen mobility experiments. *Phys. Rev. Lett.*, 6 :110–111, 1961.

[38] J. Martin, F. Cohen, and W. Karasek. Plasma Chromatography—A New Dimension for Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, 8 :330–337, 1970.

[39] Scott A. McLuckey and Marija Mentinova. Ion/neutral, ion/electron, ion/photon, and ion/ion interactions in tandem mass spectrometry : Do we need them all ? Are they enough ? *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 22(1) :3–12, 2011.

[40] T. Vaisar and J. Urban. Probing proline effect in cid of protonated peptides. *J Mass Spectrom.*, 31 :1185–1187, 1996.

[41] Ioannis A. Papayannopoulos. The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides. *Mass Spectrometry Reviews*, 14(1) :49–73, 1995.

[42] Béla Paizs and Sándor Suhai. Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrometry Reviews*, 24(4) :508–548, 2005.

[43] J.Mitchell Wells and Scott A. McLuckey. Collision-Induced Dissociation (CID) of Peptides and Proteins. *Methods in Enzymology*, 402 :148 – 185, 2005.

[44] Jürg M. Daniel, Sebastian D. Friess, Sudha Rajagopalan, Silke Wendt, and Renato Zenobi. Quantitative determination of noncovalent binding interactions using soft ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 216(2) :1–27, 2002.

[45] Thomas J.D. Jorgensen, Dominique Delforge, José Remacle, Gustav Bojesen, and Peter Roepstorff. Collision-induced dissociation of noncovalent complexes between vancomycin antibiotics and peptide ligand stereoisomers : Evidence for molecular recognition in the gas phase. *International Journal of Mass Spectrometry*, 188(1-2) :63–85, 1999.

[46] J.W. Gauthier, T.R. Trautman, and D.B. Jacobson. Sustained off-resonance irradiation for collision-activated dissociation involving Fourier transform mass spectrometry . Collision-activated dissociation technique that emulates infrared multiphoton dissociation. *Analytica Chimica Acta*, 246(1) :211–225, 1991.

[47] Julia Laskin and Jean Futrell. Internal Energy Distributions Resulting from Sustained Off-Resonance Excitation in Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. II. Fragmentation of the 1-Bromonaphthalene Radical Cation. *The Journal of Physical Chemistry A*, 104(23) :5484–5494, 2000.

[48] M. V GORSHKOV, L PASA-TOLIC, and R. D SMITH. Pressure limited sustained off-resonance irradiation for collision-activated dissociation in Fourier transform mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, pages 15–18, 1999.

[49] Kristin A. Herrmann, Arrpad Somogyi, Vicki H. Wysocki, Laszlo Drahos, and Karoly Vekey. Combination of Sustained Off-Resonance Irradiation and On-Resonance Excitation in FT-ICR. *Analytical Chemistry*, 77(23) :7626–7638, 2005.

[50] Roman A. Zubarev, Neil L. Kelleher, and Fred W. McLafferty. Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations . A Nonergodic Process. *Journal of the American Chemical Society*, 120(13) :3265–3266, 1998.

[51] W McLafferty Fred, M Horn David, Breuker Kathrin, Ge Ying, Lewis Mark, A, Cerda Blas, A Zubarev Roman, and K Carpenter Barry. Electron capture dissociation of gaseous multiply charged ions by fourier-transform ion cyclotron resonance. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12(3) :245 – 249, 2001.

[52] Haichuan Liu and Kristina HAYkansson. Electron Capture Dissociation of Tyrosine O-Sulfated Peptides Complexed with Divalent Metal Cations. *Analytical Chemistry*, 78(21) :7570–7576, 2006.

[53] K. Zhurov, L. Fornelli, M. Wodrich, U. Laskay, and Y. Tsybin. Principles of electron capture and transfer dissociation mass spectrometry applied to peptide and protein structure analysis. *Royal Society of Chemistry*, 42(21) :7570–7576, 2013.

[54] Gene Hart-Smith. A review of electron-capture and electron-transfer dissociation tandem mass spectrometry in polymer chemistry. *Analytica Chimica Acta*, 808 :44–55, 2014.

[55] Andrew J. Creese and Helen J. Cooper. Liquid Chromatography Electron Capture Dissociation Tandem Mass Spectrometry (LC-ECD-MS/MS) versus Liquid Chromatography Collision-induced Dissociation Tandem Mass Spectrometry (LC-CID-MS/MS) for the Identification of Proteins. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18 :891–897, 2007.

[56] P Roepstorff and J. Fohlman. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical mass spectrometry*, 11 11 :601, 1984.

[57] F Lermyte, D Valkenborg, JA Loo, and F. Sobott. Radical solutions : Principles and application of electron-based dissociation in mass spectrometry-based analysis of protein structure. *Mass Spectrom Rev.*, 37(6) :750–771, 2018.

[58] David M. Horn, Kathrin Breuker, Aaron J. Frank, and Fred W. McLafferty. Kinetic intermediates in the folding of gaseous protein ions characterized by electron capture dissociation mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*, 123(40) :9792–9799, 2001.

[59] J. Cooper Helen, Alan Kristina, Hakansson, and Marshall G. The role of electron capture dissociation in biomolecular analysis. *Mass Spectrometry Reviews*, 24 :201–222, 2005.

[60] E. Mirgorodskaya, P. Roepstorff, and R. A. Zubarev. Localization of O-Glycosylation Sites in Peptides by Electron Capture Dissociation in a Fourier Transform Mass Spectrometer. *Analytical Chemistry*, 71(20) :4431–4436, 1999.

[61] Andrew J CREESE and Helen J COOPER. The Effect of Phosphorylation on the Electron Capture Dissociation of Peptide Ions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19(9) :1263–1274, 2008.

[62] A Stensballe, ON Jensen, JV Olsen, KF Haselmann, and RA. Zubarev. Electron capture dissociation of singly and multiply phosphorylated peptides. *RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY*, 14 :1793–1800, 2000.

[63] Y Xie, J Zhang, S Yin, and JA Loo. Top-down esi-ecd-ft-icr mass spectrometry localizes noncovalent protein-ligand binding sites. *Journal of the American Chemical Society*, 128 :14432–14433, 2006.

[64] John E. P. Syka, Joshua J. Coon, Melanie J. Schroeder, Jeffrey Shabanowitz, and Donald F. Hunt. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(26) :9528–9533, 2004.

[65] Graeme C Mcalister, Doug Phanstiel, David M Good, W Travis Berggren, and Joshua J Coon. Implementation of Electron-Transfer Dissociation on a Hybrid Linear Ion Trap - Orbitrap Mass Spectrometer. *Anal Chem.*, 79(10) :3525–3534, 2007.

[66] Sharon J. Pitteri, Paul A. Chrisman, and Scott A. McLuckey. Electron-transfer ion/ion reactions of doubly protonated peptides : Effect of elevated bath gas temperature. *Analytical Chemistry*, 77(17) :5662–5669, 2005.

[67] An Chi, Dina L Bai, Lewis Y Geer, Jeffrey Shabanowitz, and Donald F Hunt. Analysis of intact proteins on a chromatographic time scale by electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 259(1) :197–203, 2007.

[68] Min-sik Kim and Akhilesh Pandey. Electron transfer dissociation mass spectrometry in proteomics. *Proteomics*, 13(4-5) :530–542, 2012.

[69] Y Qi and DA. Volmer. Electron-based fragmentation methods in mass spectrometry : An overview. *Mass Spec Rev*, 36(1) :4–15, 2017.

[70] David M Good, Matthew Wirtala, Graeme C Mcalister, and Joshua J Coon. Performance Characteristics of Electron Transfer Dissociation Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 6(11) :1942–1951, 2007.

[71] Frank Kjeldsen, Oleg A. Silivra, Igor A. Ivonin, Kim F. Haselmann, Mikhail Gorshkov, and Roman A. Zubarev. $C_\alpha$-C backbone fragmentation dominates in electron detachment dissociation of gas-phase polypeptide polyanions. *Chemistry : A European Journal*, 11(6) :1803–1812, 2005.

[72] Aleksandar R. Milosavljević, Francis Canon, Christophe Nicolas, Catalin Miron, Laurent Nahon, and Alexandre Giuliani. Gas-phase protein inner-shell spectroscopy by coupling an ion

trap with a soft x-ray beamline. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 3(9) :1191–1196, 2012.

[73] Crespo-Hernández C.E., Cohen B., Hare P.M., , and Kohler. B. Ultrafast excited-state dynamics in nucleic acids. *Chem. Rev.*, 104(4) :1977–2019, 2004.

[74] Helmut Satzger, Dave Townsend, Marek Z. Zgierski, Serguei Patchkovskii, Susanne Ullrich, and Albert Stolow. Primary processes underlying the photostability of isolated dna bases : Adenine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(27) :10196–10201, 2006.

[75] JC Marcum, A Halevi, and JM Weber. Photodamage to isolated mononucleotides–photodissociation spectra and fragment channels. *Phys Chem Chem Phys*, 11(11) :1740–1751, 2009.

[76] David Creed. The photophysics and photochemistry of the near-uv absorbing amino acids–i. tryptophan and its simple derivatives. *Photochemistry and Photobiology*, 39(4) :537–562, 1984.

[77] Joo Yeon Oh, Jeong Hee Moon, and Myung Soo Kim. Chromophore effect in photodissociation at 266 nm of protonated peptides generated by matrix-assisted laser desorption ionization (maldi). *Journal of Mass Spectrometry*, 40(7) :899–907, 2005.

[78] Reilly JP. Ultraviolet photofragmentation of biomolecular ions. *Mass Spectrom Rev*, 28(3) :425–447, 2009.

[79] R. Milosavljevic Aleksandar, Z. Cerovski Viktor, Lj. Rankovic Milos, Canon Francis, Nahon Laurent, and Giuliani Alexandre. Vuv photofragmentation of protonated leucine-enkephalin peptide dimer below ionization energy. *The European Physical Journal D*, 68(3) :1–6, 2014.

[80] Thomas Schlatholter and Ronnie Hoekstra. Action spectroscopy of gas-phase peptide ions with energetic photons. pages 209–226, 2013.

[81] Sadia Bari. The influence of peptide structure on fragmentation pathways. Thèse de doctorat de l'Université de Groningue,2010.

[82] M. Lj Ranković, F. Canon, L. Nahon, A. Giuliani, and A. R. Milosavljević. Photoinduced fragmentation of gas-phase protonated leucine- enkephalin peptide in the VUV range. *Journal of Physics : Conference Series*, 635(1) :012034, 2015.

[83] O. Gonzalez-Magana, M. Tiemens, G. Reitsma, L. Boschman, M. Door, S. Bari, P. O. Lahaie, J. R. Wagner, M. A. Huels, R. Hoekstra, and T. Schlatholter. Fragmentation of protonated oligonucleotides by energetic photons and $c_q^+$ ions. *Phys. Rev. A*, 87 :1–13, 2013.

[84] Aleksandar R. Milosavljević, Christophe Nicolas, Joel Lemaire, Christophe Dehon, Roland Thissen, Jean-Marc Bizau, Matthieu Réfrégiers, Laurent Nahon, and Alexandre Giuliani. Photoionization of a protein isolated in vacuo. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13 :15432–15436, 2011.

[85] Milosavljevic A. R., Giuliani A., Nicolas C., Gil J-F, M. Réfrégiers J. Lemaire, and Nahon L. Gas-phase spectroscopy of a protein. *Journal of Physics*, 257 :1–6, 2010.

[86] D Egorov, R Hoekstra, and T. Schlatholter. A comparative vuv absorption mass-spectroscopy study on protonated peptides of different size. *Phys Chem Chem Phys*, 19(31) :20608–20618, 2017.

[87] Alexandre Giuliani, Aleksandar R. Milosavljević, Konrad Hinsen, Francis Canon, Christophe Nicolas, Matthieu Réfrégiers, and Laurent Nahon. Structure and charge-state dependence of the gas-phase ionization energy of proteins. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(38) :9552–9556, 2012.

[88] Claire Brunet, Rodolphe Antoine, Abdul-Rahman Allouche, Philippe Dugourd, Francis Canon, Alexandre Giuliani, and Laurent Nahon. Gas phase photo-formation and vacuum uv photofragmentation spectroscopy of tryptophan and tyrosine radical-containing peptides. *The journal of physical chemistry. A*, 115 :8933—8939, 2011.

[89] Claire Brunet, Rodolphe Antoine, Philippe Dugourd, Francis Canon, Alexandre Giuliani, and Laurent Nahon. Formation and fragmentation of radical peptide anions : Insights from vacuum ultra violet spectroscopy. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 23 :274–281, 2011.

[90] N. Berrah, John Bozek, AA Wills, G Turri, Hsiao-Ling Zhou, Steven Manson, G Akerman, Bruce Rude, Nevin Gibson, C Walter, L VoKy, Alan Hibbert, and S Ferguson. K -shell photodetachment of li(-) : Experiment and theory. *Physical review letters*, 87 :253002, 2002.

[91] Rodolphe Antoine and Philippe Dugourd. Visible and ultraviolet spectroscopy of gas phase protein ions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13(37) :16494–16509, 2011.

[92] Frank Kjeldsen, Oleg A. Silivra, and Roman A. Zubarev. Zwitterionic states in gas-phase polypeptide ions revealed by 157-nm ultra-violet photodissociation. *Chemistry - A European Journal*, 12(30) :7920–7928, 2006.

[93] Claire Brunet, Rodolphe Antoine, Philippe Dugourd, Francis Canon, Alexandre Giuliani, and Laurent Nahon. Photo-induced electron detachment of protein polyanions in the VUV range. *Journal of Chemical Physics*, 138(6) :2011–2015, 2013.

[94] Antoine R., Joly L., Allouche A. R., Broyer M., Lemoine J., and Dugourd Ph. Electron photodetachment of trapped doubly deprotonated angiotensin peptides. uv spectroscopy and radical recombination. *The European Physical Journal*, 51 :117–124, 2009.

[95] Jacob Stewart-Ornstein, Adam P. Hitchcock, Daniel Hernández Cruz, Peter Henklein, Joerg Overhage, Kai Hilpert, John D. Hale, and Robert E.W. Hancock. Using intrinsic X-ray absorption spectral differences to identify and map peptides and proteins. *Journal of Physical Chemistry B*, 111(26) :7691–7699, 2007.

[96] Genbai Chu, Feng Lu, Jianting Xin, Tao Xi, Min Shui, Weihua He, Yuqiu Gu, Ying Xiong, Kemei Cheng, and Tao Xu. Excited-state dynamics and electron transfer process of 1,3,5-triamino-2,4,6-trinitrobenzene. *RSC Advances*, 6(60) :55560–55567, 2016.

[97] Yan Zubavichus, Andrey Shaporenko, Vladimir Korolkov, Michael Grunze, and Michael Zharnikov. X-ray absorption spectroscopy of the nucleotide bases at the carbon, nitrogen, and oxygen K-edges. *Journal of Physical Chemistry B*, 112 :13711–13716, 2008.

[98] R.R.T. Marinho, A.F. Lago, M.G.P. Homem, L.H. outinho, G.G.B. de Souza, and A. Naves de Brito. Gas phase photoabsorption and mass spectra of l-alanine and l-proline in the soft x-ray region. *Chemical Physics*, 324(2-3) :420–424, 2006.

[99] D. Egorov, L. Schwob, M. Lalande, R. Hoekstra, and T. Schlathalter. Near edge x-ray absorption mass spectrometry of gas phase proteins : the influence of protein size. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18 :26213–26223, 2016.

[100] Aleksandar R. Milosavljevic, Christophe Nicolas, Milos Lj. Rankovic, Francis Canon, Catalin Miron, and Alexandre Giuliani. K-shell excitation and ionization of a gas-phase protein : Interplay between electronic structure and protein folding. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 6(16) :3132–3138, 2015.

[101] M. Lalande, M. Abdelmouleh, M. Ryszka, V. Vizcaino, J. Rangama, A. Méry, F. Durantel, T. Schlathölter, and J. C. Poully. Irradiation of isolated collagen mimetic peptides by x rays and carbon ions at the Bragg-peak energy. *Physical Review A*, 98(6) :1–6, 2018.

[102] Mathieu Lalande. Radio-induced processes within peptidic models of the collagen triple helix in the gas phase. Thèse de doctorat, Normandie Université, 2018.

[103] J. M McGuire, W. M Stark, M. H McCormick, G. E Pittenger, and R.C Pittenger. Vancomycin, a new antibiotic : I. chemical and biologic properties. *Antibiot. Annu.*, 1955–1956 :606—611, 1956.

[104] Eliane M. Billaud and Jean Luc Mainardi. Faut-il encore doser les glycopeptides plasmatiques ? *Revue Française des Laboratoires*, 2004(365) :35–38, 2004.

[105] Dudley H. Williams. The glycopeptide story – how to kill the deadly 'superbugs'. *Natural Product Reports*, 13 :496–477, 1996.

[106] Clive M. Pearce, Ute Gerhard, and Dudley H. Williams. Ligands which bind weakly to vancomycin : studies by 13c nmr spectroscopy. *Journal of the Chemical Society-Perkins Transactions 2*, pages 159–162, 1995.

[107] J.S. Rajagopalan, C.M Harris, and T.M. Harris. The role of phenolic groups in vancomycin-type glycopeptide antibiotics. *Bioorganic Chemistry*, 23(1) :54 – 71, 1995.

[108] DH Williams and JP Waltho. Molecular basis of the activity of antibiotics of the vancomycin group. *Biochem Pharmacol*, 37(1) :133–141, 1988.

[109] H R Perkins and Mill Hill. Modifications of the Acyl-D-alanyl-D-alanine Terminus Affecting Complex-Formation with Vancomycin. *Biochem J.*, 143 :789–803, 1971.

[110] Dan Kahne, Catherine Leimkuhler, Wei Lu, and Christopher Walsh. Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chemical Reviews*, 105(2) :425–448, 2005.

[111] Albert J.R. Heck and Thomas J.D. Jorgensen. Vancomycin in vacuo. *International Journal of Mass Spectrometry*, 236(1-3) :11–23, 2004.

[112] Jean Christophe Poully, Frédéric Lecomte, Nicolas Nieuwjaer, Bruno Manil, Jean Pierre Schermann, Charles Desfrançois, and Gilles Grègoire. Probing the specific interactions and structures of gas-phase vancomycin antibiotics with cell-wall precursor through IRMPD spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(14) :3334–3335, 2010.

[113] Jean Christophe Poully, Frédéric Lecomte, Nicolas Nieuwjaer, Bruno Manil, Jean Pierre Schermann, Charles Desfrançois, Gilles Grégoire, Renaud Ballivian, Fabien Chirot, Jérome Lemoine, Florent Calvo, Rodolphe Antoine, and Philippe Dugourd. Combining ion mobility mass spectrometry and infrared multiphoton dissociation spectroscopy to probe the structure of gas-phase vancomycin-Ac2LKDADA non-covalent complex. *International Journal of Mass Spectrometry*, 297(1-3) :28–35, 2010.

[114] Gonzalez Olmo Magana. Ionization-induced fragmentation dynamics of isolated complex biomolecules Olmo Gonzalez Magana. Thèse de doctorat de l'Université de Groningue,2013.

[115] Stefan Bartzsch and Uwe Oelfke. Line focus x-ray tubes a new concept to produce high brilliance x-rays. *Physics in Medicine & Biology*, 62(22) :8600–8615, 2017.

[116] Oksana Plekan, Vitaliy Feyer, Robert Richter, Marcello Coreno, Monica De Simone, Kevin C. Prince, and Vincenzo Carravetta. Investigation of the amino acids glycine, proline, and methionine by photoemission spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry A*, 111(43) :10998–11005, 2007.

[117] Bogdan A. Budnik, Youri O. Tsybin, Per Hakansson, and Roman A. Zubarev. Ionization energies of multiply protonated polypeptides obtained by tandem ionization in Fourier transform mass spectrometers. *Journal of Mass Spectrometry*, 37(11) :1141–1144, 2002.

[118] M. Helena Florencio, Dominique Despeyroux, and Keith R. Jennings. Collision gas effects in the collision induced decomposition of protonated and cationized molecules of carbohydrate antibiotics. *Organic Mass Spectrometry*, 29(9) :483–490, 1994.

[119] Francis Canon, Aleksandar R. Milosavljević, Laurent Nahon, and Alexandre Giuliani. Action spectroscopy of a protonated peptide in the ultraviolet range. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17 :25725–25733, 2015.

[120] Kim F. Haselmann, Thomas J.D. Jorgensen, Bogdan A. Budnik, Frank Jensen, and Roman A. Zubarev. Electron capture dissociation of weakly bound polypeptide polycationic complexes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16(24) :2260–2265, 2002.

[121] Lucas Schwob, Mathieu Lalande, Dmitrii Egorov, Jimmy Rangama, Ronnie Hoekstra, Violaine Vizcaino, Thomas Schlathölter, and Jean Christophe Poully. Radical-driven processes within a peptidic sequence of type i collagen upon single-photon ionisation in the gas phase. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(34) :22865–22904, 2017.

[122] Zhibo Yang, Erich R. Vorpagel, and Julia Laskin. Experimental and theoretical studies of the structures and interactions of vancomycin antibiotics with cell wall analogues. *Journal of the American Chemical Society*, 130(39) :13013–13022, 2008.

[123] Yuji Sugita and Yuko Okamoto. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. *Chemical Physics Letters*, 314(1) :141 – 151, 1999.

[124] Paul K. Weiner and Kollman. Peter A. Amber : Assisted model building with energy refinement. a general program for modeling molecules and their interactions. *Journal of Computational Chemistry*, 2(3) :287-303, 1981.

[125] H. J. C. Berendsen, van der Spoel D., and van Drunen. R. Gromacs : A messagepassing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications*, 91(1) :43–56, 1995.

[126] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich,

J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox. Gaussian~16 Revision C. *Gaussian Inc. Wallingford CT*, 2016.

[127] Claire Brunet, Rodolphe Antoine, Philippe Dugourd, Francis Canon, Alexandre Giuliani, and Laurent Nahon. Formation and fragmentation of radical peptide anions : Insights from vacuum ultra violet spectroscopy. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 23(2) :274–281, 2012.

[128] Rodolphe Antoine, Jérome Lemoine, and Philippe Dugourd. Electron photodetachment dissociation for structural characterization of synthetic and bio-polymer anions. *Mass Spectrometry Reviews*, 33(6) :501–522, 2014.

[129] Claire Brunet, Rodolphe Antoine, Philippe Dugourd, Denis Duflot, Francis Canon, Alexandre Giuliani, and Laurent Nahon. Valence shell direct double photodetachment in polyanions. *New Journal of Physics*, 15, 2013.

[130] Matthew Shoulders and Ronald T. D.Raines. Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*, 78 :929–958, 2009.

[131] Clare L. Hawkins and Michael J. Davies. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *J Biol Chem.*, 294 :19683–19708, 2019.

[132] P.J. Linstrom and W.G. Mallard. Nist chemistry webbook, nist standard reference data-base. *National Institute of Standards and Technology.*, (69).

[133] J. Bockova, A. Rebelo, M. Ryszka, R. Pandey, T. da Fonseca Cunha, P. Limão-Vieira, N. J. Mason, J. C. Poully, and S. Eden. Mapping the complex metastable fragmentation pathways of excited 3-aminophenol +. *International Journal of Mass Spectrometry*, 442 :95–101, 2019.

[134] R Hoekstra, R Morgenstern, and T Schlatholter. Multiple ionization and fragmentation of the dna base thymine by interaction with cq+ ions. *The European Physical Journal D*, 24(1) :161–164, 2003.

[135] A. N. Agnihotri, S. Kasthurirangan, S. Nandi, A. Kumar, M. E. Galassi, R. D. Rivarola, O. Fojón, C. Champion, J. Hanssen, H. Lekadir, P. F. Weck, and L. C. Tribedi. Ionization of uracil in collisions with highly charged carbon and oxygen ions of energy 100 kev to 78 mev. *Phys. Rev. A*, 85 :032711, 2012.

[136] Eero Itälä, Dang Trinh Ha, Kuno Kooser, Elisabeth Rachlew, M Huels, and Edwin Kukk. Fragmentation patterns of core-ionized thymine and 5-bromouracil. *The Journal of chemical physics*, 133 :154316, 2010.

[137] Lucas Schwob, Mathieu Lalande, Jimmy Rangama, Dmitrii Egorov, Ronnie Hoekstra, Rahul Pandey, Samuel Eden, Thomas Schlathölter, Violaine Vizcaino, and Jean Christophe Poully. Single-photon absorption of isolated collagen mimetic peptides and triple-helix models in the VUV-X energy range. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(28) :18321–18329, 2017.

[138] Luke MacAleese, Sylvain Hermelin, Krystel El Hage, Pierre Chouzenoux, Alexander Kulesza, Rodolphe Antoine, Luigi Bonacina, Markus Meuwly, Jean-Pierre Wolf, and Philippe Dugourd. Sequential proton coupled electron transfer (pcet) : Dynamics observed over 8 orders of magnitude in time. *Journal of the American Chemical Society*, 138(13) :4401–4407, 2016.

[139] Charles J. Pedersen. Cyclic polyethers and their complexes with metal salts. *Journal of the American Chemical Society*, 89(26) :7017–7036, 1967.

[140] JL PCasas-Hinestroza, M Bueno, E Ibanez, and A. Cifuentes. Recent advances in mass spectrometry studies of non-covalent complexes of macrocycles. *Analytica Chimica Acta*, 1081 :32–50, 2019.

[141] Emilie Viglino, Cheuk Kuen Lai, Xiaoyan Mu, Ivan K. Chu, and František Tureček. Ground and Excited-Electronic-State Dissociations of Hydrogen-Rich and Hydrogen-Deficient Tyrosine Peptide Cation Radicals. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 27(9) :1454–1467, 2016.

[142] Van der Rest Guillaume and Frédéric Halgand. Size Exclusion Chromatography-Ion Mobility-Mass Spectrometry Coupling : a Step Toward Structural Biology. *American Society for Mass Spectrometry*, 28 :2519–2522, 2017.

[143] Campuzano Iain, F Bush Matthew, V Robinson Carol, Beaumont Claire, Richardson Keith, Kim Hyungjun, and I Kim Hugh. Structural characterization of drug-like compounds by ion mobility mass spectrometry : comparison of theoretical and experimentally derived nitrogen collision cross sections. *Anal Chem*, 84(2) :1026–1033, 2012.

[144] Iain Campuzano, Matthew F. Bush, Carol V. Robinson, Claire Beaumont, Keith Richardson, Hyungjun Kim, and Hugh I. Kim. Structural characterization of drug-like compounds by ion mobility mass spectrometry : comparison of theoretical and experimentally derived nitrogen collision cross sections. *Analytical Chemistry.*, 84(2) :1026–1033, 2012.

[145] Vebjorn Bakken, Trygve Helgaker, and Einar Uggerud. Models of fragmentations induced by electron attachment to protonated peptides. *European Journal of Mass Spectrometry*, 10(5) :625–638, 2004.

[146] Frantiaek TureAek and Erik A. Syrstad. Mechanism and energetics of intramolecular hydrogen transfer in amide and peptide radicals and cation-radicals. *Journal of the American Chemical Society*, 125(11) :3353–3369, 2003.

[147] Cooper HJ. Investigation of the presence of b ions in electron capture dissociation mass spectra. *J Am Soc Mass Spectrom*, 16(12) :1932–1940, 2005.

[148] Lisanne J. M. Kempkes, Jonathan Martens, Giel Berden, and Jos Oomens. w-type ions formed by electron transfer dissociation of cys-containing peptides investigated by infrared ion spectroscopy. *Journal of Mass Spectrometry*, 53(12) :1207–1213, 2018.

[149] Robert Pepin and FrantiÅek TureÄek. Kinetic ion thermometers for electron transfer dissociation. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(7) :2818–2826, 2015.

[150] James S. Prell, Jeremy T. O'Brien, Anne I. S. Holm, Ryan D. Leib, William A. Donald, and Evan R. Williams. Electron capture by a hydrated gaseous peptide : effects of water on fragmentation and molecular survival : effects of water on fragmentation and molecular survival. *Journal of American Chemical Society*, 130(38) :12680-12689, 2008.

[151] F Lermyte, D Valkenborg, JA Loo, and F. Sobott. Radical solutions : Principles and application of electron-based dissociation in mass spectrometry-based analysis of protein structure. *Mass Spectrom Rev.*, 37(6) :750–771, 2018.

[152] Chunxiang Yao and FrantiAek TureAek. Hypervalent ammonium radicals. competitive n-c and n-h bond dissociations in methyl ammonium and ethyl ammonium. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 7 :912–920, 2005.

[153] Zahra Homayoon, Subha Pratihar, Edward Dratz, Ross Snider, Riccardo Spezia, George L. Barnes, Veronica Macaluso, Ana Martin Somer, and William L. Hase. Model simulations of the thermal dissociation of the $tik(h+)^2$ tripeptide : Mechanisms and kinetic parameters. *The Journal of Physical Chemistry A*, 120(42) :8211–8227, 2016.

[154] Roman A Zubarev. Reactions of polypeptide ions with electrons in the gas phase. *Mass Spectrom Rev*, 22(1) :57–77, 2002.

[155] Helen J Cooper, Robert R Hudgins, Kristina Hakansson, and Alan G Marshall. Characterization of amino acid side chain losses in electron capture dissociation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 13(3) :241-249, 2002.

[156] Simin Maleknia and Jennifer Brodbelt. Cavity-size-dependent dissociation of crown ether/ammonium ion complexes in the gas phase. *Journal of the American Chemical Society*, 115(7) :2837–2843, 1993.

[157] A. Emin Atik, Oscar Hernandez, Philippe Maître, and Talat Yalcin. Specific rearrangement reactions of acetylated lysine containing peptide $b_n$ (n=4–7) ion series. *Journal of Mass Spectrometry*, 49(12) :1290–1297, 2014.

[158] William A. Donald, Ryan D. Leib, Jeremy T. O'Brien, Anne Ivalu Sander Holm, and Evan R Williams. Nanocalorimetry in mass spectrometry : A route to understanding ion and electron solvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 :18102 – 18107, 2008.

[159] James S. Prell, Jeremy T. O'Brien, Jeffrey D. Steill, Jos Oomens, and Evan R. Williams. Structures of protonated dipeptides : the role of arginine in stabilizing salt bridges. *Journal of the American Chemical Society*, 131(32) :11442–11449, 2009.

[160] Ronghu Wu and Terry B. McMahon. Stabilization of the zwitterionic structure of proline by an alkylammonium ion in the gas phase. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(20) :3668–3671, 2007.

[161] D. Weimann, H. Winkler, Koksch Falenski, J. B., and schalley C.A. Highly dynamic motion of crown ethers along oligolysine peptide chains. *Nature Chemistry*, 105 :573–577, 2009.

[162] Henrik D. F. Winkler, Dominik P. Weimann, Andreas Springer, and Christoph A. Schalley. Dynamic motion in crown ether dendrimer complexes : a "spacewalk" on the molecular scale. *Angewandte chemie International Edition*, 48(39) :7246–7250, 2009.

[163] Frantisek Turecek and Ryan R. Julian. Peptide radicals and cation radicals in the gas phase. *Chemical Reviews*, 113 :6691–6733, 2013.

[164] E. Lamanna, A. Gallo, F. Russo, R. Brancaccio, A. Soriani, and L. Strigari. Intra-operative radiotherapy with électron beam. *Modern Practices in Radiation Therapy*, pages 146–168, 1989.

**Processus intrinsèques radio-induits dans des complexes non-covalents d'intérêt biologique et pharmaceutique**

Les liaisons non-covalentes jouent un rôle crucial dans de nombreux phénomènes impliquant les systèmes moléculaires d'intérêt biologique et pharmaceutique, notamment dans la reconnaissance moléculaire entre un ligand et son récepteur. Cependant, les effets des rayonnements ionisants sur ces complexes non-covalents ont été très peu étudiés. Dans la première partie de cette thèse, nous présentons les résultats d'expériences de photo-absorption de complexes contenant un antibiotique, la vancomycine, réalisées au moyen d'un spectromètre de masse couplé à des lignes de faisceau synchrotron produisant des photons dans la gamme d'énergie X et VUV. D'abord, nous montrons que la fragmentation des systèmes moléculaires après absorption d'un photon VUV est en partie corrélée à la structure géométrique du complexe. De plus, les processus induits dépendent fortement de l'état de charge des complexes vancomycine/récepteur (protonés ou déprotonés). Pour le complexe protoné, la rupture des liaisons non-covalentes est beaucoup plus probable que pour le complexe déprotoné, dans lequel les interactions natives sont conservées en phase gazeuse. Par ailleurs, l'absorption d'un photon X par la vancomycine mène à des fragments qui peuvent être considérés comme une signature spectrale de ses modifications post-traductionnelles. Cette signature est robuste non seulement vis-à-vis de l'énergie des photons X mais aussi de l'environnement moléculaire de la vancomycine. La seconde partie traite de l'étude en phase gazeuse par spectrométrie de masse et de mobilité ionique d'un tri-peptide protoné, et plus particulièrement des effets de la nano-solvatation par la présence d'une ou plusieurs molécules d'éther couronne. Nous nous sommes intéressés à la fragmentation induite par collision avec un gaz rare, ainsi que par transfert ou capture électroniques, et nous avons montré que l'éther couronne n'est pas toujours spectateur puisqu'il peut baisser l'état de charge du peptide protoné en lui arrachant un proton ou une molécule protonée, et peut même changer de site de liaison suite à un transfert d'électron.

**Mots-clés** : Spectrométrie de masse, Phase gazeuse, Photons VUV et X, Activation des systèmes moléculaires, Reconnaissance moléculaire, Complexes non-covalents, Vancomycine, Peptides.

---

**Intrinsic radiation-induced processes in non-covalent complexes of biological and pharmaceutical interest**

Non-covalent bonds play a crucial role in many processes involving molecular systems of biological and pharmaceutical interest, in particular in molecular recognition between a ligand and its receptor. However, their response upon ionizing radiation has scarcely been investigated for understanding radio induced processes. In the first part of this thesis, we present results of photo-absorption experiments of non-covalent complexes containing the vancomycin antibiotic, carried out by means of a mass spectrometer coupled to synchrotron beamlines producing photons in the X and VUV energy range. First, we show that the fragmentation of molecular systems after absorption of one VUV photon is partly correlated with the geometrical structure of the complex. In addition, the processes induced strongly depend on the charge state of the vancomycin/receptor complexes (protonated or deprotonated). For the protonated complex, the cleavage of non-covalent bonds is much more probable than for the deprotonated complex, in which the native interactions are conserved in the gas phase. Moreover, the absorption of one X-Ray photon by vancomycin leads to fragments that can be considered as a spectral signature of its post-translational modifications. This signature is robust not only in terms of photon energy but also of the molecular environment of vancomycin. The second part deals with the study of a protonated tri-peptid in the gas phase by mass and ion mobility spectrometry, and more particularly the effects of nano-solvation by the presence of one or more molecules of crown-ether. We are interested in the fragmentation induced by collision with a rare gas, or by electron transfer or capture, and we have shown that crown ether is not always spectator since it can lower the charge state of protonated peptides by abstracting a proton or a protonated molecule from it, and can even change binding site after electron transfer.

**Key Words** : Mass spectrometry, Gas phase, VUV and X-Rays photons, Activation of molecular systems, Molecular recognition, Non-covalent complexes, Vancomycin, Peptides.

---

**Laboratoire**

Centre de recherche sur les Ions, les MAtériaux et la Photonique, CIMAP - GANIL
Boulevard Henri Becquerel, BP 5133, 14070 Caen, Cedex 05, FRANCE