N° d'ordre : 187-2012 Année 2012

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole doctorale de Physique et d'Astrophysique

DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

Présentée et soutenue publiquement le 11 octobre 2012
par

Mlle Claire BRUNET

PHOTODETACHEMENT D'ELECTRON DE POLYANIONS : ASPECTS FONDAMENTAUX ET APPLICATIONS EN SPECTROMETRIE DE MASSE.

Directeur de thèse : Rodolphe ANTOINE

JURY : M. Lamri ADOUI, rapporteur
M. Rodolphe ANTOINE, directeur de thèse
M^{me} Julia CHAMOT-ROOKE, rapporteur
M. Jérôme LEMOINE, co-directeur de thèse
M. Laurent NAHON, examinateur
M. Yury TSYBIN, président du jury

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. François-Noël GILLY**
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe LALLE
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur Germain GILLET
Secrétaire Général	M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Administrateur provisoire : M. le Professeur G. KIRKORIAN
UFR d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA.
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme le Professeur H. PARROT
Département GEP	Directeur : M. N. SIAUVE
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : Mme S. FLECK
Département Sciences de la Terre	Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. C. COLLIGNON
Observatoire de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. P. FOURNIER
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. C. VITON
Institut Universitaire de Formation des Maîtres	Directeur : M. R. BERNARD
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : Mme la Professeure V. MAUME-DESCHAMPS

- REMERCIEMENTS -

Une thèse est une expérience enrichissante, faite d'une alternance de périodes de stress, de doutes et de moments de grandes satisfactions et de joies. En somme, un excellent apprentissage pour celui qui se destine au métier de chercheur.

Je voudrais remercier toutes les personnes qui ont participé, de près ou de loin, à mes travaux de recherche :

***Christian Bordas**, le directeur du LASIM, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.*

***Rodolphe Antoine**, mon directeur de thèse, qui a joué un rôle très important durant mes trois années de thèse. Je le remercie pour m'avoir fait partager le champ de ses vastes connaissances, pour m'avoir accompagnée et guidée dans mon travail et pour ses conseils avisés qui m'ont permis de mener mon projet à terme. J'ai beaucoup appris. Merci !*

***Philippe Dugourd** pour ses précieux conseils également, pour sa présence, ses encouragements et son soutien sans faille que ce soit pour ma thèse, plus tard lors de mes entretiens d'embauche ou au beau milieu des falaises de Croatie. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous.*

*Tout est affaire de rencontres. Et je tiens grandement à remercier **Jérôme Lemoine** qui fait partie de ces précieuses rencontres qui ont guidées le fil de mes projets.*

*Je remercie tous les collaborateurs avec lesquels j'ai travaillé : **Richard O'Hair, Vlasta Bonačić-Koutecký** et toute son équipe, **Abdul-Rahman Allouche, Manfred Kappes, Laurence Charles**. J'ai une pensée particulière pour **Yury Tsybin**, pour ses qualités humaines, sa bienveillance, et pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury ; ainsi qu'à toute l'équipe du synchrotron, **Laurent Nahon, Alexandre Giuliani** et **Francis Canon**, pour leur grande sympathie d'abord, mais également pour m'avoir permis de comprendre si rapidement la signification exacte du terme « SOLEIL PROPOSAL, 72h ». Ce terme est trompeur, ils ne m'ont jamais amenée aux Seychelles. Physiciens, chimistes, biochimistes, massistes... Tous issus d'horizons différents, avec des points communs cependant, du savoir et de la passion, qui rendent bien souvent ces rencontres très captivantes.*

*Je tiens également à remercier **Julia Chamot-Rooke** et **Lamri Adoui** d'avoir accepté de juger mon travail en tant que rapporteur et pour toutes leurs remarques constructives qui en ont découlées.*

*Mes co-bureaux de la salle 206 : **Amandine** et **Renaud** qui m'ont accueilli dans une ambiance chaleureuse. Puis **Arnaud** et **Quentin**. Merci pour votre amitié, conseils, gentillesse, patience et*

tolérance… et pour tous ces bons moments partagés. J'ai été très bien entourée, je ne pouvais pas espérer mieux ;)

*Merci aussi à **Fabien, Florian, Luke et Marion, Xavier**… tous ces membres de l'équipe qui ont partagé au fil du temps, bien plus que ma vie de thésarde. Ce n'est pas évident de retrouver des collègues comme ça ! Egalement un grand merci à tous les autres membres de l'équipe spectro-bio : **Michel Broyer, Bruno, Driss, Franck, Isabelle, Ramzi, Tristan.***

*Tout le personnel du LASIM : **Alain, Alexis, Benjamin, Cécilia, Christian, Cyril, Denis, Delphine, Estelle, Grégory, Jacques, Jean, Jérémy, Marc, Matthias, Myriam, Nadia, Paolo, Patrick, Thomas**… Merci à **Francisco** et **Sad**, nos remarquables psynformaticiens, et merci à **Véronique**, une très belle personne… J'espère que nous resterons tous en contact !*

*Les doctorants ou post-doctorants des laboratoires voisins : **Clément, les Arnaud blond et blond vénitien, David, Dimitri, José, Julien, Lucas, Massimo, Max, Romain, Sam**… Que de bons et nombreux moments passés avec vous ! Je regrette seulement de ne pas vous avoir connu plus tôt !*

*Je voudrais évidemment remercier **mes parents**, mon frère **Joseph**, et mon amie de toujours, **Andréanna.** Vous m'avez toujours soutenue et encouragée. Merci à vous d'être là. Ça fait toujours du bien !*

*Pour finir je tiens à remercier toute ma famille, mes amis et tous ceux qui m'ont accompagnée pendant ces années Lyonnaises : **Julie, Julien, Quentin, Mad Flo, Prek** et **Romain**… et enfin je remercie **Etienne** qui a su rendre mon retour à Grenoble très agréable.*

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION **4**

BIBLIOGRAPHIE 9

CHAPITRE I : CARACTERISATION STRUCTURELLE ET OPTIQUE DE PEPTIDES ET DE PROTEINES **10**

I.1. INTRODUCTION 11
I.2. SYSTEMES 11
I.2.1. Les peptides et protéines 11
I.3. LA SPECTROMETRIE DE MASSE COMME TECHNIQUE D'ANALYSE 15
I.3.1. Les différentes méthodes de fragmentation par spectrométrie de masse 17
I.4. PROPRIETES OPTIQUES DES PEPTIDES ET PROTEINES ET OUTILS DE CARACTERISATION 31
I.4.1. Propriétés optiques des protéines 31
I.4.2. Techniques optiques comme sonde de conformation 34
I.5. Caractérisation optique des peptides et des protéines en phase gazeuse 41
I.5.1. Le FRET (Transfert Résonnant d'Energie de Fluorescence) 42
I.5.2. La spectroscopie d'action 44
I.6. CONCLUSION 52
I.7. BIBLIOGRAPHIE 54

CHAPITRE II : PROCEDES EXPERIMENTAUX **62**

II.1. INTRODUCTION 63
II.2. ESI, UNE SOURCE COMMUNE 64
II.2.1. Principe 64
II.3. LA SPECTROSCOPIE D'ACTION PAR PHOTODETACHEMENT D'ELECTRON 68
II.3.1. Principe général 68
II.3.2. Couplage LTQ-Laser UV-Vis 76
II.3.3. Couplage LTQ-SR (Synchrotron Radiation) 82
II.4. EXPERIENCES DE DISSOCIATION PAR DETACHEMENT D'ELECTRON 87
II.4.1. FTICR : La résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier : Principe et fonctionnement. 87
II.4.2. Couplage avec une cathode chauffante comme source d'électron 89

II.4.3. Types de mesures 90
II.5. SPECTROSCOPIE DE PHOTOELECTRONS RESOLUE EN CONFORMATION 90
II.5.1. La mobilité ionique 91
II.5.2. PES principe 92
II.5.3. Couplage IMS/PES 93
II.5.4. Types de mesures (PES) 95
II.6. CONCLUSION 95
II.7. BIBLIOGRAPHIE 96

CHAPITRE III : SPECTROSCOPIE D'ACTION ET DE PHOTOELECTRON DE PEPTIDES ET DE PROTEINES 98

III.1. INTRODUCTION 99
III.2. MECANISME DU DETACHEMENT D'ELECTRON 99
III.3. SPECTROSCOPIE D'ACTION DANS LE VISIBLE : LA BANDE SORET DU CYTOCHROME C 104
III.3.1. Introduction 104
III.3.2. Détachement de l'électron 107
III.3.3. Spectre optique 108
III.3.4. Conclusion 109
III.4. SPECTROSCOPIE D'ACTION DANS LE VUV : CAS DE L'INSULINE. 112
III.4.1. Introduction 112
III.4.2. Influence de l'état de charge de l'insuline sur l'efficacité du photodétachement d'électron 114
III.4.3. Dépendance du multiple détachement d'électron de l'insuline en fonction de l'énergie des photons dans le VUV : double détachement direct 116
III.4.4. Conclusion 119
III.5. SPECTROSCOPIE DE PHOTOELECTRON 120
III.5.1. Introduction 120
III.5.2. IMS PES du cytochrome c 121
III.5.3. Conclusion 127
III.6. CONCLUSION GENERALE. 128
III.7. BIBLIOGRAPHIE 129

CHAPITRE IV : SPECTROSCOPIE VUV DE PEPTIDES ET DE PROTEINES RADICALAIRES 134

IV.1. INTRODUCTION 135
IV.2. SPECTROSCOPIE DE DEUX PENTAPEPTIDES YVVVV ET WVVVV RADICALAIRES 136
IV.2.1. Introduction 136

IV.2.2. Formation et spectroscopie d'action de deux pentapeptides radicalaires : YVVVV et WVVVV. 136
IV.2.3. Conclusion 146
IV.3. SPECTROSCOPIE DE L'INSULINE RADICALAIRE 147
IV.3.1. Introduction 147
IV.3.2. Spectroscopie de l'insuline radicalaire 147
IV.3.3. Conclusion 149
IV.4. CONCLUSION 150
IV.5. BIBLIOGRAPHIE 151

CHAPITRE V : COMPARAISON DES TECHNIQUES DE FRAGMENTATION D'A-EPD ET D'EDD 154

V.1. INTRODUCTION 155
V.2. A-EPD VS EDD DE DIFFERENTS PEPTIDES MODELES. 155
V.2.1. Substance P : RPKPQQFFGLM-OH 157
V.2.2. Caerulein : pEQDY(SO_3H)TGWMDF-NH_2 163
V.2.3. Les variants du M2TMP 167
V.3. CONCLUSION GENERALE 174
V.4. BIBLIOGRAPHIE 175

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 177

ANNEXE A 180

INTRODUCTION

Les protéines sont les principaux acteurs du vivant. Ces macromolécules sont les plus abondantes et les plus diversifiées des molécules organiques présentes dans les cellules vivantes. Leur importance est liée à la diversité des fonctions qu'elles remplissent, allant de la catalyse de réactions chimiques jusqu'à la structuration de la matière vivante. Elles sont formées d'une série d'acides aminés qui se replient et adoptent différentes conformations dans l'espace, définissant ainsi la structure tridimensionnelle de la protéine. Et cette structure tridimensionnelle est à la base de la fonction assurée par la protéine. Savoir identifier ces protéines et en connaître leurs structures, suivre les changements de conformations et en comprendre les dynamiques associées sont ainsi des éléments essentiels à la compréhension de leur mécanisme de fonctionnement.

Grâce à l'avènement des sources d'ionisation dites « douces » (Electrospray ionization [1-3] ESI et Matrix-assisted laser desorption ionization MALDI [4, 5]), et à sa facilité de couplage avec des outils structurels (mobilité ionique, spectroscopie optique, fragmentation,…), la spectrométrie de masse (MS) est devenue un outil incontournable pour l'identification et la caractérisation structurelle des biomolécules en phase gazeuse. Ce succès a engendré le développement d'équipements commerciaux couplant la spectrométrie de masse à différentes techniques de séparation ou de fragmentation en phase gazeuse permettant la caractérisation structurelle optimale de protéines [6-8].

Cette dualité identification/caractérisation peut également se retrouver avec le couplage à la spectroscopie optique. En effet, les photons fournis par un laser peuvent être utilisés pour activer voire fragmenter les protéines, mais permettent également d'obtenir des informations spectroscopiques en suivant les taux de photodissociation (spectroscopie d'action). C'est dans ce contexte que l'équipe spectrobio a réalisé un couplage innovant en 2005 entre spectroscopie laser et spectrométrie de masse utilisant un piège à ions [9]. Le travail de thèse de Thibault Tabarin [10] a démontré la pertinence de ce couplage en démontrant son applicabilité à la fragmentation et la spectroscopie optique de petits peptides. Un résultat

majeur fut obtenu durant ce travail, à savoir le photodétachement d'électron intense observé sur des polyanions biomoléculaires. Ce résultat au potentiel énorme présentait deux avantages : (i) réaliser de la spectroscopie d'action efficace sur des biomolécules et (ii) suite au détachement d'électron, l'ion biomoléculaire est radicalaire et peut présenter des fragmentations intéressantes. Laure Joly [11] a démontré durant son travail de thèse que le photodétachement d'électron pouvait être utilisé pour enregistrer des spectres optiques UV de protéines entières en phase gazeuse. Hélas, le piège quadrupolaire utilisé présentait des résolutions en masse médiocres et l'aspect analytique n'a été que peu exploré.

C'est dans ce contexte qu'a été développé dans notre laboratoire un couplage entre un piège à ions linéaire (avec une résolution en masse bien meilleure) et un laser UV/Visible. Le laser est accordable en longueur d'onde et il est ainsi possible de faire varier le site et l'énergie d'excitation. L'irradiation de polyanions conduit à la formation d'une espèce radicalaire par photodétachement d'électron. La fragmentation subséquente de l'espèce oxydée permet d'obtenir un bon recouvrement de séquence pour différents types d'espèces. Avec ce nouveau montage, l'efficacité de cette méthode a été démontrée sur des polypeptides et petites protéines [12]. Pour d'élargir le champ d'application de cette méthode à d'autres systèmes (comme cela avait été le cas pour les oligo-saccharides dans la thèse d'Amadine Racaud [13]), une collaboration avec L. Charles (Université d'Aix-Marseille) a également été initiée lors de cette thèse pour étudier l'apport de la fragmentation a-EPD pour la caractérisation de polymères synthétiques [14].

Concernant la caractérisation structurelle des protéines, l'étude de la structure des biomolécules en phase gazeuse permet de se focaliser sur les facteurs intrinsèques qui stabilisent la structure, facilitant ainsi la comparaison avec les calculs théoriques. Une signature optique de l'état d'ionisation des résidus aromatiques dans une protéine entière avait démontré la forte potentialité de la spectroscopie d'action UV sur des protéines intactes en phase gazeuse [15]. Durant ma thèse, je me suis attachée à évaluer l'apport des spectroscopies d'action par photodétachement d'électrons dans le domaine Visible et VUV. La spectroscopie d'action dans la gamme du VUV, inexplorée sur protéine entière, a été initiée lors de ma thèse, durant un projet SOLEIL sur la ligne DESIRS, en collaboration avec Laurent Nahon et Alexandre Giuliani [16, 17]. Certaines protéines présentent des chromophores visibles en leur sein (hème) et je me suis attachée à évaluer l'apport de la spectroscopie visible sur protéine entière. Enfin, la spectroscopie de photoélectron (PES) permet de déterminer l'affinité

électronique d'une molécule et de remonter aux barrières conduisant au détachement de l'électron. La mobilité ionique permet de séparer les différents isomères et d'en déterminer les structures par comparaison avec les études théoriques [18-20]. Le couplage de ces deux techniques permet d'enregistrer des spectres de photoélectron résolus en conformères. J'ai pu effectuer plusieurs séjours à Karlsruhe dans le groupe de M. Kappes (cadre d'un PHC PROCOPE) pour explorer ce type de spectroscopie sur protéines entières et également pour évaluer l'apport de la PES à la spectroscopie d'action réalisée à Lyon [21].

Mon travail de thèse s'inscrit donc dans les aspects fondamentaux et analytiques liés au photodétachement d'électron. Durant ma thèse, je me suis intéressée essentiellement aux protéines entières.

Un récapitulatif des différentes techniques de fragmentation et de spectroscopie optique (d'action en solution) utilisées pour la caractérisation de protéines seront décrites plus en détail dans le premier chapitre de cette thèse.

Le deuxième chapitre exposera en détail les différents montages expérimentaux, développés à Lyon ou par nos différents collaborateurs, qui ont permis de réaliser les divers expériences décrites dans ce manuscrit.

Le troisième chapitre de cette thèse sera consacré à la caractérisation structurelle des protéines sur une large gamme de longueur d'onde, ainsi qu'à l'étude des propriétés de l'électron émis par la mesure de son énergie cinétique grâce à la spectroscopie de photoélectron (collaboration avec M. Kappes). En effet, bien que les études spectroscopiques de protéines entières anioniques dans l'UV aient déjà fait l'objet de plusieurs publications [15, 22], ces études n'ont jamais été élargies aux domaines du visible et du VUV. Le laser OPO dont nous disposons au laboratoire nous permettra d'accéder aux longueurs d'onde du visible et d'explorer les protéines contenant des hèmes (chromophores visibles) [23]. Les expériences VUV ont été réalisées en collaboration avec Laurent Nahon, au synchrotron SOLEIL. Ce dispositif de 3ème génération permet d'obtenir un rayonnement VUV très stable et adaptable à diverses applications. A ces longueurs d'onde, nous verrons que le photodétachement d'électron est également la principale voie de relaxation observée après absorption d'un photon et permet d'accéder aux spectres de photofragmentation de protéines dans le VUV. La

spectroscopie de photoélectrons couplée à la mobilité ionique nous permettra d'étudier l'évolution des énergies de liaison et des barrières coulombiennes avec l'état de charge dans un système fortement chargé et de comprendre ainsi la relation entre l'état de charge de la molécule et sa conformation [21].

Dans le quatrième chapitre, nous verrons que le rayonnement VUV peut également être utilisé pour sonder les propriétés optiques d'anions radicalaires par un montage expérimental à deux couleurs. Les peptides et les protéines radicalaires seront formés par photodétachement d'électron à 266 nm. Le rayonnement synchrotron permettra ensuite de sonder les propriétés optiques et les différentes voies de fragmentation d'espèces radicalaires sur la gamme de 5 à 16 eV.

Enfin, la dernière partie sera consacrée à la technique de dissociation par photodétachement d'électron (a-EPD). La fragmentation CID des peptides radicalaires formés par détachement d'électron permet d'obtenir une large couverture de séquence. Une collaboration avec Y. Tsybin nous a permis de comparer l'a-EPD avec la dissociation par détachement d'électron (EDD) sur une série de peptides de tailles variables négativement chargés [24] et nous pourrons ainsi appréhender les différents mécanismes de fragmentation mis en jeu et étudier la complémentarité de l'a-EPD avec la technique de dissociation par détachement d'électron.

Finalement, durant ce travail de thèse, ce montage expérimental aura également été utilisé pour d'autres applications, comme la caractérisation de nanoparticules avec O. Tillement [25], et de systèmes organométalliques avec R.O'Hair [26-28].

BIBLIOGRAPHIE

1. Dole, M., L.L. Mack, and R.L. Hines, *Molecular Beams of Macroions.* Journal of Chemical Physics, 1968. **49**(5): p. 2240-&.
2. Yamashita, M. and J.B. Fenn, *Electrospray Ion-Source - Another Variation on the Free-Jet Theme.* Journal of Physical Chemistry, 1984. **88**(20): p. 4451-4459.
3. Yamashita, M. and J.B. Fenn, *Negative-Ion Production with the Electrospray Ion-Source.* Journal of Physical Chemistry, 1984. **88**(20): p. 4671-4675.
4. Karas, M., D. Bachmann, and F. Hillenkamp, *Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet-Laser Desorption Mass-Spectrometry of Organic-Molecules.* Analytical Chemistry, 1985. **57**(14): p. 2935-2939.
5. Karas, M. and F. Hillenkamp, *Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 Daltons.* Analytical Chemistry, 1988. **60**(20): p. 2299-2301.
6. Pringle, S.D., et al., *An investigation of the mobility separation of some peptide and protein ions using a new hybrid quadrupole/travelling wave IMS/oa-ToF instrument.* International Journal of Mass Spectrometry, 2007. **261**(1): p. 1-12.
7. Tsybin, Y.O., et al., *Combined infrared multiphoton dissociation and electron capture dissociation with a hollow electron beam in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2003. **17**(15): p. 1759-1768.
8. McAlister, G.C., et al., *Implementation of electron-transfer dissociation on a hybrid linear ion trap-orbitrap mass spectrometer.* Analytical Chemistry, 2007. **79**(10): p. 3525-3534.
9. Talbot, F.O., et al., *Photodissociation spectroscopy of trapped protonated tryptophan.* Journal of Chemical Physics, 2005. **122**(7).
10. Tabarin, T., *Conformation et dynamique de biomolécules en phase gazeuse*, in *physique*. 2007, Université de Lyon 1: Lyon.
11. Joly, L., *Couplage spectroscopique / spectrométrie de masse : Propriétés optiques et photofragmentation de biomolécules*, in *Physique*. 2009, Université Lyon 1: Lyon.
12. Larraillet, V., et al., *Activated-Electron Photodetachment Dissociation for the Structural Characterization of Protein Polyanions.* Analytical Chemistry, 2009. **81**(20): p. 8410-8416.
13. Racaud, A., *Etude structurales d'oligosaccharides sulfatés*, in *Chimie*. 2011, Université Lyon 1: Lyon.
14. Girod, M., et al., *Efficient Structural Characterization of Poly (Methacrylic Acid) by Activated-Electron Photodetachment Dissociation.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2012. **23**(1): p. 7-11.
15. Joly, L., et al., *Ultraviolet spectroscopy of peptide and protein polyanions in vacuo: Signature of the ionization state of tyrosine.* Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(27): p. 8428-+.
16. Brunet, C., et al., *Gas phase Photo-Formation and Vacuum UV Photofragmentation Spectroscopy of Tryptophan and Tyrosine Radical-Containing Peptides.* Journal of Physical Chemistry A, 2011. **115**(32): p. 8933-8939.
17. Brunet, C., et al., *Formation and Fragmentation of Radical Peptide Anions: Insights from Vacuum Ultra Violet Spectroscopy.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2012. **23**(2): p. 274-281.
18. Bohrer, B.C., et al., *Biomolecule Analysis by Ion Mobility Spectrometry*, in *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2008. p. 293-327.

19. Jarrold, M.F., *Helices and sheets in vacuo.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2007. **9**(14): p. 1659-1671.
20. Mesleh, M.F., et al., *Structural information from ion mobility measurements: Effects of the long-range potential.* Journal of Physical Chemistry, 1996. **100**(40): p. 16082-16086.
21. Vonderach, M., et al., *Probing electrostatic interactions and structural changes in highly charged protein polyanions by conformer-selective photoelectron spectroscopy.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2011. **13**(34): p. 15554-15558.
22. Bellina, B., et al., *UV spectroscopy of entire proteins in the gas phase.* International Journal of Mass Spectrometry, 2011. **297**(1-3): p. 36-40.
23. Brunet, C., et al., *Soret Band of the Gas-Phase Ferri-Cytochrome c.* Journal of Physical Chemistry Letters, 2012. **3**(6): p. 698-702.
24. Larraillet, V., et al., *Comparative Dissociation of Peptide Polyanions by Electron Impact and Photo-Induced Electron Detachment.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2010. **21**(4): p. 670-680.
25. Lux, F., et al., *Ultrasmall Rigid Particles as Multimodal Probes for Medical Applications.* Angewandte Chemie-International Edition, 2011. **50**(51): p. 12299-12303.
26. Roehr, M.I.S., et al., *Synthesis and Spectroscopic Characterization of Diphenylargentate, (C6H5)2Ag (-).* Journal of Physical Chemistry Letters, 2012. **3**(9): p. 1197-1201.
27. Feketeova, L., et al., *Fragmentation of the tryptophan cluster Trp(9)-2H (2-) induced by different activation methods.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2010. **24**(22): p. 3255-3260.
28. Brunet, C., et al., *Structural and Photochemical Properties of Organosilver Reactive Intermediates MeAg2+ and PhAg2+.* Journal of Physical Chemistry A, 2011. **115**(33): p. 9120-9127.

CHAPITRE I

CARACTERISATION STRUCTURELLE ET OPTIQUE DES PEPTIDES ET DES PROTEINES

I.1. Introduction 11
I.2. Systèmes 11
I.2.1. Les peptides et protéines 11
I.3. La spectrométrie de masse comme technique d'analyse 15
I.3.1. Les différentes méthodes de fragmentation par spectrométrie de masse 17
I.3.1.1. L'excitation vibrationnelle : CID et IRMPD 20
i. Dissociation induite par collision (CID) 20
ii. Dissociation induite par des photons infrarouge (IRMPD) 23
I.3.1.2. L'excitation électronique : ExD 24
i. Réaction ion-ion (ETD) 25
ii. Réactions ion-électron (ECD, EDD) 26
iii. Réactions ion-photon (UVPD, Activated-EPD) 29
I.4. Propriétés optiques des peptides et protéines et outils de caractérisation 31
I.4.1. Propriétés optiques des protéines 31
I.4.2. Techniques optiques comme sonde de conformation 34
1.4.2.1. Fluorescence des acides aminés aromatiques 34
1.4.2.2. Dichroïsme circulaire pour sonder la structure secondaire des protéines 36
1.4.2.3. Spectroscopie infrarouge et RAMAN pour déterminer la présence de groupements fonctionnels 37
i. Spectroscopie infrarouge 38
ii. Spectroscopie Raman 39
I.5. Caractérisation optique des peptides et des protéines en phase gazeuse 41
I.5.1. Le FRET (Transfert Résonnant d'Energie de Fluorescence) 42
I.5.2. La spectroscopie d'action 44
1.5.2.1. La spectroscopie d'action infrarouge 44
1.5.2.2. Spectroscopie d'action UV 49
I.6. Conclusion 52
I.7. Bibliographie 54

I.1. INTRODUCTION

Ce premier chapitre sera consacré à l'état de l'art des protéines et à leurs techniques de caractérisation structurelle et optique. Une rapide description de la spectrométrie de masse permettra d'introduire les différentes techniques de fragmentation utilisées à ce jour. Aussi seront décrites les méthodes d'activation vibrationnelle telles que la CID ou l'IRMPD ainsi que les techniques d'activation électronique (ExD, UVPD) utilisées pour déterminer la structure primaire des protéines.

Comme la fonction d'une protéine ne dépend pas uniquement de sa séquence en acides aminés, il est important de pouvoir déterminer la structure dans l'espace de la molécule. La seconde partie exposera les différentes techniques spectroscopiques qui permettent de caractériser la structure tridimensionnelle en solution et en phase gazeuse. Nous verrons ainsi l'utilité de la spectroscopie d'action pour étudier les propriétés intrinsèques de ces molécules.

I.2. SYSTEMES

I.2.1. LES PEPTIDES ET PROTEINES

Les peptides et les protéines sont des biopolymères naturels constitués d'un enchainement linéaire d'acides aminés. Les acides aminés de formule chimique H_2N-C(R)-COOH possèdent deux groupements fonctionnels, un groupe carboxyle (COOH) et un groupe amine (NH_2). Les 20 acides aminés naturels listés dans le *Tableau I.1* entrent dans la composition des protéines. C'est par leur chaine latérale R qu'ils se différencient. La nature de cette chaine latérale leur confère différentes propriétés. Selon leur point isoélectrique, on peut distinguer les acides aminés basiques (Lys, Arg, His) des acides aminés acides (Asp et Glu). Les acides aminés basiques ont tendance à capter un proton et sont donc naturellement positivement chargés tandis que les acides aminés acides possèdent un hydrogène labile sur leur groupement COOH et portent les charges négatives par déprotonation.

Les peptides ou protéines sont issus de la polymérisation covalente des acides aminés par des liaisons peptidiques (*Figure I.1*.).

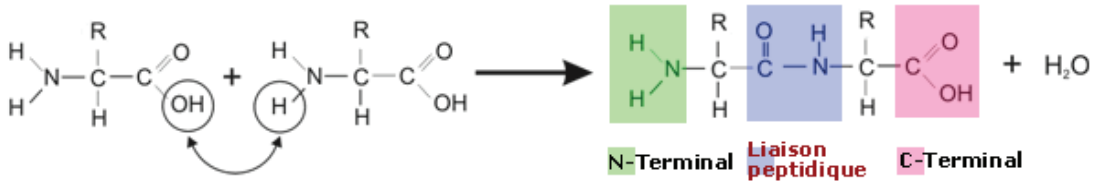


Figure I.1 Liaison peptidique entre deux acides aminés

Ces liaisons peptidiques sont cinétiquement stables, c'est-à-dire qu'elles résistent à l'hydrolyse. La chaine polypeptidique résultante est donc composée d'une séquence d'acides aminés qui s'agencent dans l'espace, donnant ainsi une structure tridimensionnelle à la protéine. L'enchainement des acides aminés (structure primaire) et leurs agencements dans l'espace (structures secondaire, tertiaire, quaternaire) sont considérés comme les « quatre niveaux » qui définissent les protéines et qui leur confèrent leurs différentes fonctions. Ces niveaux sont schématisés ci-dessous dans la *Figure I.2*. La structure primaire est la séquence en acides aminés de la protéine. La structure secondaire est définie par des arrangements de liaisons hydrogène entre les groupements amide et carbonyle du squelette peptidique. Il existe deux grandes familles de structure secondaire, l'hélice α et le feuillet β [1, 2]. La structure tertiaire est le repliement de la chaine peptidique par interactions entre les chaines latérales des acides aminés. Elle comprend en général plusieurs domaines de structures secondaires. La structure quaternaire comprend les interactions non covalentes entre différentes chaines polypeptidiques quand la protéine en comprend plusieurs (l'hémoglobine est par exemple constituée de quatre chaines polypeptidiques).

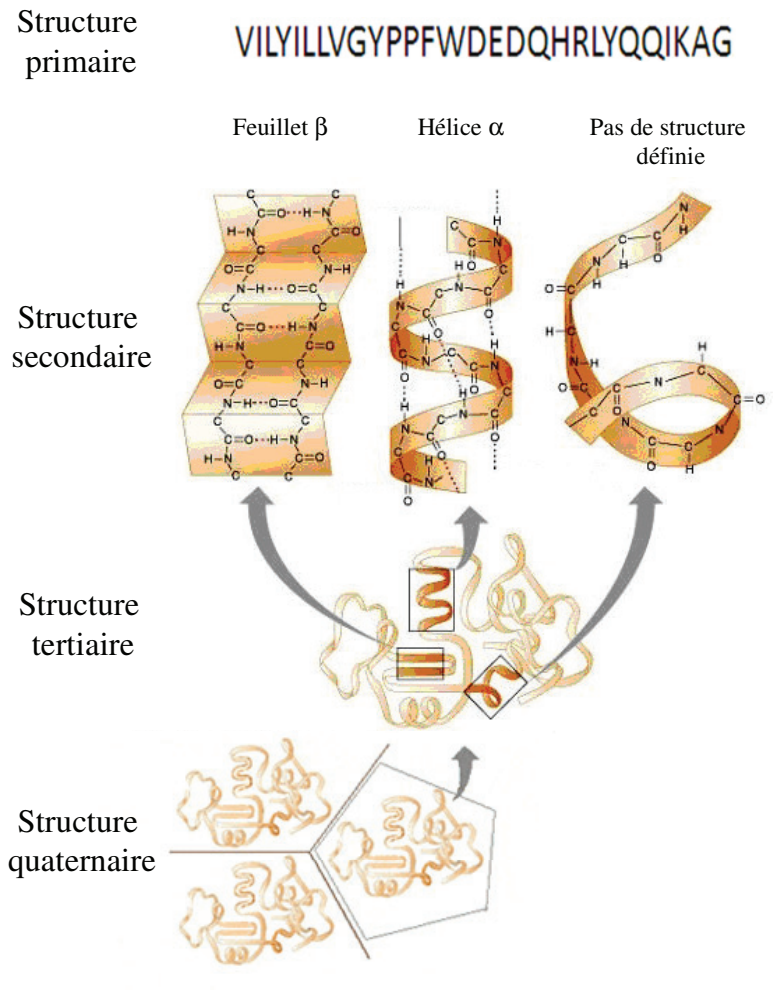


Figure I.2 Les quatre niveaux de structures définissant une protéine

Leur organisation spatiale résulte d'une balance énergétique subtile entre l'énergie contenue dans les liaisons hydrogènes, les ponts disulfures, les répulsions entre charges… La structure des protéines est également très sensible aux traitements physico-chimiques et de nombreux procédés (ajout de certains solvants organiques, ou autres composés…) peuvent provoquer sa dénaturation, autrement dit, la modification de sa structure tridimensionnelle et donc de ses propriétés.

La charge portée par la protéine dépendra du nombre de résidus acides et basiques qu'elle contient dans sa séquence ainsi que du pH de la solution. Au point isoélectrique, la protéine ne possède aucune charge nette (en d'autres termes, la protéine possède autant de charges positives que de charges négatives).

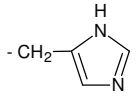
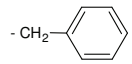
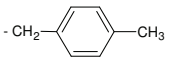
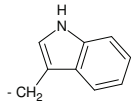
	Nom	*Code 1 lettre*	*Code 3 lettres*	*Masse mono-isotopique (M en Da)*	*pI*	*Acide aminé R =*
	Glycine	G	Gly	75.03	6.06	-H
Chaines aliphatiques	Alanine	A	Ala	89.05	6.11	$-CH_3$
	Leucine	L	Leu	131.09	6.01	$-CH_2-CH(CH_3)_2$
	Isoleucine	I	Ile	131.09	6.05	$-CH(CH_3)-CH_2-CH_3$
	Valine	V	Val	117.08	6.00	$-CH(CH_3)_2$
Chaines carboxyliques	Aspartate	D	Asp	133.04	2.85	$-CH_2-COOH$
	Glutamate	E	Glu	147.05	3.15	$-CH_2-CH_2-COOH$
Chaines aminées	Lysine	K	Lys	146.11	9.60	$-CH_2-(CH_2)_3-NH_2$
	Arginine	R	Arg	174.11	10.76	$-CH_2-(CH_2)_2NHC(NH_2)=NH$
	Histidine	H	His	155.07	7.60	
Chaines hydroxylées	Sérine	S	Ser	105.04	5.68	$-CH_2-OH$
	Thréonine	T	Thr	119.06	5.60	$-CH(OH)-CH_3$
Chaines amidées	Asparagine	N	Asn	132.05	5.41	$-CH_2-CONH_2$
	Glutamine	Q	Gln	146.07	5.65	$-CH_2-CH_2-CONH_2$
Chaines soufrées	Cystéine	C	Cys	121.02	5.05	$-CH_2-SH$
	Méthionine	M	Met	149.05	5.74	$-CH_2-CH_2-S-CH_3$
Chaines aromatiques	Phénylalanine	F	Phe	165.08	5.49	
	Tyrosine	Y	Tyr	181.07	5.64	
	Tryptophane	W	Trp	204.09	5.89	
Hétérocycles	Proline	P	Pro	115.06	6.30	

Tableau I.1 Les 20 acides aminés naturels

Les protéines assurent les différentes fonctions des organismes. Elles peuvent avoir des rôles structurels, catalytiques, de transport ou de reconnaissance. Elles sont synthétisées par les ribosomes à partir du code génétique. Elles subissent également après leur synthèse, des modifications post-traductionnelles (PTMs) de type phosphorylation, glycosylation ou sulfatation. Indispensables au processus biologique, les protéines interagissent avec d'autres molécules (ligands) en fonction de leurs propriétés de surface (relief, charges…). Le plus souvent la protéine ne sera d'ailleurs fonctionnelle qu'après capture d'un ligand. L'interaction

d'une protéine avec un ligand (l'oxygène sur l'hémoglobine par exemple) induit un changement de conformation de la protéine pouvant inhiber ou stimuler son activité.

Toutes ces caractéristiques (la séquence en acides aminés, les PTMs, leur agencement dans l'espace…) font des protéines un ensemble diversifié et complexe de macromolécules impliquées dans une grande variété de mécanismes biologiques. C'est pourquoi leur caractérisation précise est indispensable. La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui permet d'identifier des molécules d'intérêt par la mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique, généralement à l'aide de techniques de fragmentation. Cette technique est utilisée dans l'analyse de protéines pour une caractérisation structurelle de la molécule mais également pour localiser les sites et la nature des différentes modifications post-traductionnelles (PTMs) portées par la protéine.

I.3. LA SPECTROMETRIE DE MASSE COMME TECHNIQUE D'ANALYSE

Généralement, la seule mesure de la masse de la protéine ne suffit pas à sa caractérisation complète. En effet, selon la résolution du spectromètre de masse utilisé, un rapport masse sur charge (*m/z*) donné peut correspondre à de nombreuses protéines. Par exemple, une masse de 17 000 ± 1 Da peut correspondre à 54 protéines différentes dont 9 appartenant au protéome des mammifères [3]. Pour déterminer la structure primaire de ces molécules qui correspond à la séquence en acides aminés, des techniques de fragmentation, dites de spectrométrie de masse en tandem, ont été développées. Notons que des techniques de séquençage par dégradation chimique comme la dégradation d'Edman, existent également mais sont souvent longues et laborieuses et présentent quelques limitations (le N-terminal ne doit pas avoir subi de modifications, la taille du peptide ne doit pas dépasser les 50 acides aminés…) [4, 5].

La *Figure I.1* schématise le principe de la spectrométrie de masse classique (MS) et la spectrométrie de masse en tandem (MS^n).

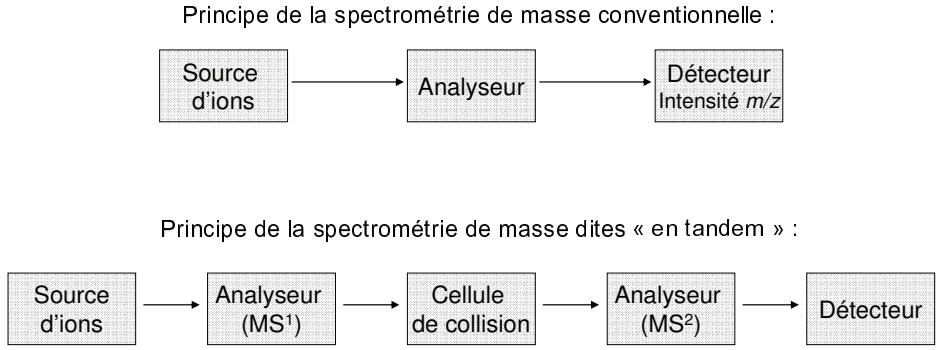


Figure I.3 Principe de la spectrométrie de masse classique (MS) et la spectrométrie de masse en tandem (MSn)

Alors que la spectrométrie de masse classique permet d'analyser les ions formés dans la source, la spectrométrie de masse en tandem offre la possibilité de sélectionner un ion au sein du premier analyseur. Cet ion stable particulier est appelé « ion parent » ou « ion précurseur ». Cet ion pénètre ensuite dans la cellule de collision. Dans cette étape se situe la phase d'activation de l'ion qui conduit à son excitation, c'est-à-dire à l'augmentation de son énergie interne, et éventuellement à sa fragmentation. L'analyse des ions issus de la fragmentation, les « ions-fils » ou « ions produits », se fait dans un second analyseur.

L'analyse par MS^n peut reposer soit sur des régions distinctes du spectromètre en faisant appel à deux analyseurs successifs et dans ces cas-là, il s'agit d'une MS^n dite dans l'espace ; soit sur des séquences MS successives au sein de la même enceinte, il s'agit alors d'une MS^n dans le temps (cas des pièges ioniques par exemple) (*Figure I.3*).

Ces techniques peuvent être utilisées pour l'identification des protéines en spectrométrie de masse par l'approche « top down » ou par l'approche « bottom up ». L'approche « bottom up » consiste en la fragmentation de peptides issus d'une digestion protéique tandis que pour l'approche « top down », une protéine entière est fragmentée. Avec les fragments obtenus, il est alors possible de remonter à la structure primaire de la protéine, par comparaison avec des spectres répertoriés dans des bases de données.

Les différentes techniques de fragmentation MS^n utilisées pour la détermination des structures primaires seront détaillées dans les paragraphes suivants.

I.3.1. LES DIFFERENTES METHODES DE FRAGMENTATION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

De nombreuses techniques de fragmentation sont utilisées à ce jour et se différencient en deux groupes selon leur processus d'excitation : l'excitation vibrationnelle et l'excitation électronique. L'apport d'énergie occasionné lors de l'étape d'activation provoque la fragmentation de la molécule par rupture de liaisons.

La fragmentation des peptides et protéines par spectrométrie de masse peut se produire au niveau du squelette peptidique ou de la chaine latérale des acides aminés. La nomenclature de fragmentation des peptides en mode positif a été proposée par Biemann et Roepstorff dans les années 80 [6, 7] et est illustrée dans la *Figure I.4*.

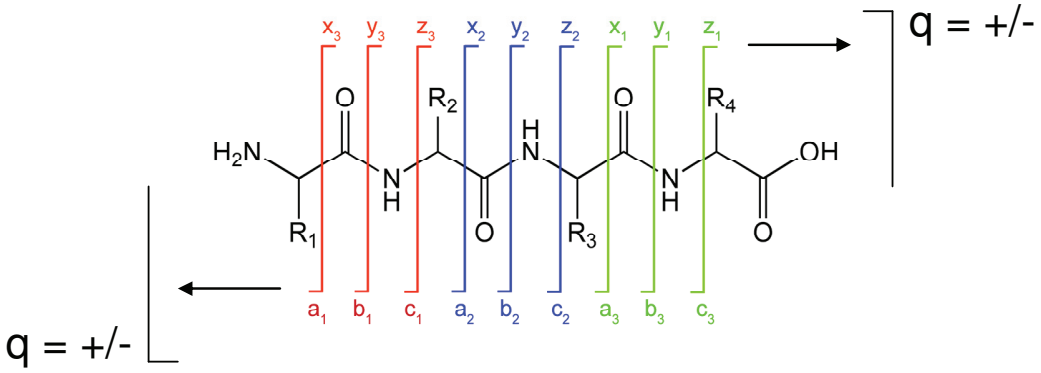


Figure I.4 Nomenclature de la fragmentation peptidique.
Les fragments les plus informatifs d'un point de vue structural sont ceux de la chaine peptidique et sont notés de la façon suivante : a_i, b_i ou c_i si la charge est portée par l'extrémité N terminale et x_i, y_i et z_i, si la charge est portée par l'extrémité C terminale (Tableau I.2). Le chiffre i représente le nombre d'acides aminés contenus dans l'ion fragment.

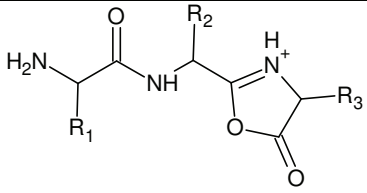
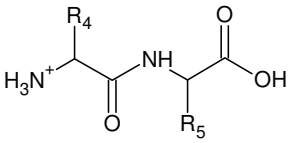
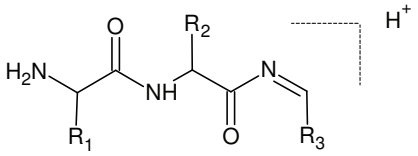
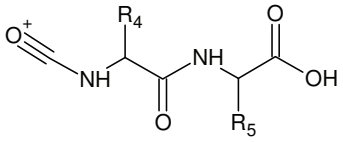
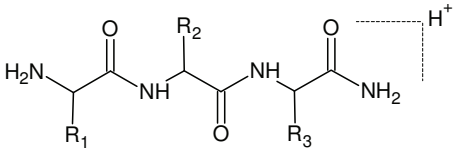
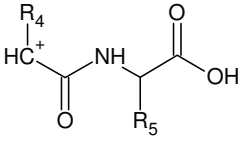
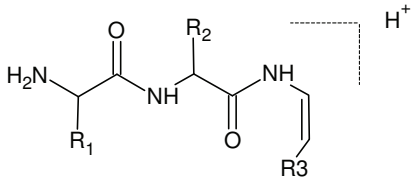
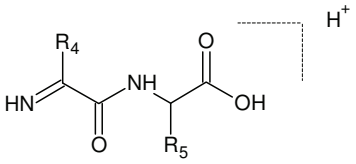
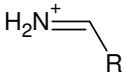
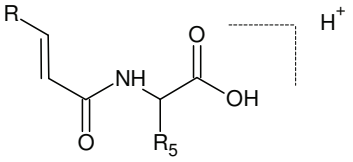
Ions	Structure	Ions	Structure
b		*y*	
a		*x*	
c		*z*	
d		*v*	
Immonium		*w*	

Tableau I.2 Structure et nomenclature des ions fragments généralement observés lors de la fragmentation des peptides en mode positif

La spectrométrie de masse est une technique très largement utilisée pour le séquençage des peptides et des protéines. Jusqu'à présent, la plupart des applications en CID ont été consacrées au mode d'ionisation positif. Cependant, ce mode d'ionisation positif ne permet pas de séquencer toutes sortes de peptides. En effet, l'analyse des peptides acides par exemple, va se révéler plus efficace en mode négatif. Par contre, pour le mode d'ionisation négatif, aucune nomenclature universelle n'a été adaptée. Certains groupes comme celui de Bowie, ont choisi d'utiliser une autre nomenclature pour la fragmentation du squelette peptidique : les fragments α et β [8]. Dans notre équipe et comme le fit Harrison en 2000 et Ewing en 2001,

nous utilisons la nomenclature de fragmentation basée sur celle de Biemann [6, 7] en positif, pour attribuer les ions fragments obtenus en mode négatif.

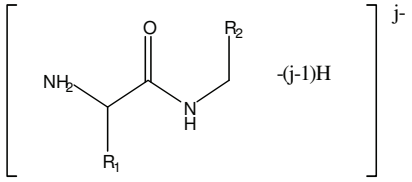
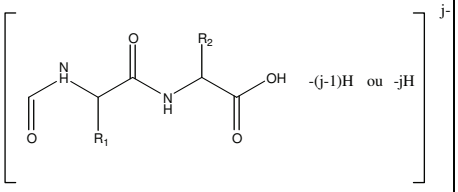
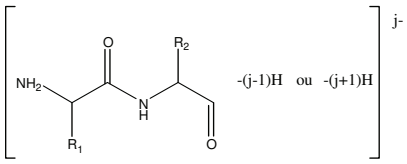
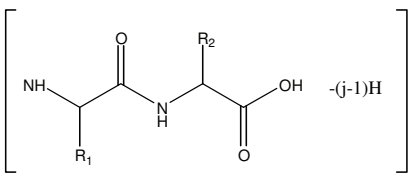
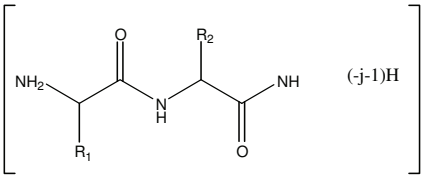
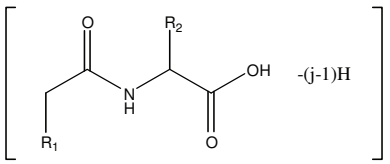
Ions	Structure	Ions	Structure
a		*x*	
b		*y*	
c		*z*	

Tableau I.3 Structure et nomenclature des ions fragments généralement observés lors de la fragmentation des peptides en mode négatif

En mode d'ionisation négatif, une grande variété d'ions fragments est observée. Contrairement à la fragmentation CID en mode positif qui conduit généralement aux ions fragments de type *b* et *y*, la fragmentation CID de peptides multidéprotonés mène principalement aux ions de type *a*, *b*, *c* et *x* accompagnés de perte de neutres, comme par exemple des pertes de -15 Da (CH_3), -17 Da (NH_3), -18 Da (H_20), -35 Da (NH_3+H_2O), -44 Da (CO_2), -61 Da (CO_2+NH_3).

Le type et l'abondance relative des fragments observés sur les spectres MS/MS dépendent notamment de l'état de charge des ions et surtout de la méthode d'excitation des ions (CID, IRMPD, ECD, a-EPD, EDD…). Un récapitulatif des différentes techniques de fragmentation, distinguées par leur processus d'excitation vibrationnelle ou électronique, sera exposé dans ce chapitre.

I.3.1.1. L'EXCITATION VIBRATIONNELLE : CID ET IRMPD

i. DISSOCIATION INDUITE PAR COLLISION (CID)

De loin la plus courante, cette technique d'activation vibrationnelle par chauffage existe en routine sur la plupart des spectromètres de masse. La fragmentation est réalisée dans une cellule de collision remplie d'un gaz inerte à haut potentiel d'ionisation de type argon ou hélium (*Figure I.5*).

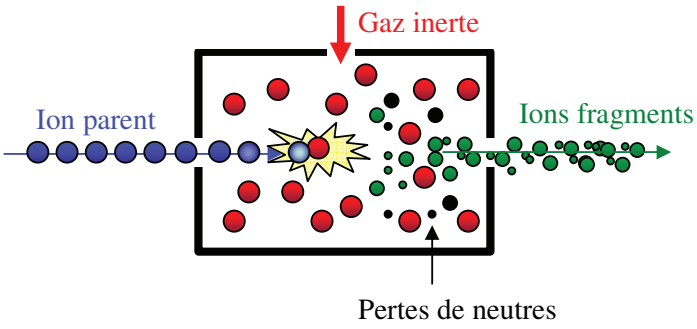


Figure I.5 Principe de la dissociation induite par collision

Dans un spectromètre de masse, l'ion possède initialement une certaine énergie interne (E_{int}) qui provient de l'énergie thermique de la molécule et de la quantité d'énergie déposée dans le processus d'ionisation. La collision entre le gaz cible et l'ion provoque une augmentation de l'énergie interne de l'ion par chauffage vibrationnel, conduisant alors à sa dissociation. Ce processus en deux étapes peut être schématisé par l'équation suivante :

$$A+G \xrightarrow[+\,Q]{activation} A^{*} \xrightarrow[-\,D\,-\,T]{dissociation} F+N \qquad (1)$$

Lors de la première étape d'activation, une partie de l'énergie cinétique mise en jeu est convertie en énergie interne (énergie vibrationnelle ou électronique). L'énergie interne de l'ion (A) est alors augmentée de Q, l'ion est excité (A*). Ensuite vient l'étape de dissociation (avec une énergie D) de l'ion excité en ions fragments (F) et en neutres (N) où l'excès d'énergie interne sera en partie perdu sous forme d'énergie cinétique (T).

Lors de la collision, la quantité de mouvement et l'énergie sont conservées. Le transfert d'énergie au centre des masses *(E_{CM})* lors de la collision entre l'ion et le gaz est donné par la formule suivante :

$$E_{CM} = E_{Lab} \times \frac{m_{Gaz}}{(m_{Gaz} + m_{Ion})} \qquad (2)$$

E_{lab} est l'énergie de cinétique de l'ion dans le référentiel du laboratoire, m_{gaz} est la masse du gaz cible et m_{ion} la masse de l'ion [9, 10].

Selon le régime de collision, qui peut être de basse ou de haute énergie, la conversion de l'énergie cinétique en énergie interne peut être soit de nature vibrationnelle, soit électronique.

Cette différence est expliquée par le temps d'interaction entre l'ion et l'atome de gaz lors de la collision. Massey [11] a montré que les temps d'interaction pour les transitions vibrationnelles sont de l'ordre de 10^{-13} à 10^{-14} s, tandis que pour les transitions électroniques, ces temps sont plus courts, et varient de 10^{-15} à 10^{-17} s. La conversion de l'énergie cinétique en énergie interne dépendra alors du temps d'interaction collisionnelle. Le transfert d'énergie est efficace lorsque ces temps sont comparables.

- REGIME DES HAUTES ENERGIES DE COLLISION [12]

Sur les appareils électromagnétiques ou hybrides (type ToF/ToF), l'énergie cinétique des ions est de l'ordre du kiloélectronvolt (keV), c'est un régime de collision haute énergie. Le temps d'interaction de collision est comparable au temps des transitions électroniques et la conversion de l'énergie cinétique en énergie interne est donc principalement de nature électronique. L'énergie électronique est alors rapidement convertie dans les différents modes de vibrations par IVR (redistribution intramoléculaire d'énergie vibrationnelle) et conduit à de multiples fragmentations. Cette technique permet d'observer des types de fragmentations nécessitant de grandes énergies d'activation telles que la fragmentation des chaines latérales (ions *d*, *w* et *v*) ou la fragmentation à distance, pour laquelle la rupture de la liaison n'est pas adjacente à la localisation de la charge. Nous noterons également la possibilité de fragmentations consécutives.

o REGIME DES BASSES ENERGIES DE COLLISION

Les quadripôles ou les pièges à ion possèdent un régime de collision basse énergie qui permet de fournir aux ions une énergie cinétique d'environ 10 à 100 eV. Le temps d'interaction entre l'ion et le gaz cible est plus long que pour la CID haute énergie et l'excitation des ions est principalement de nature vibrationnelle. L'énergie se partage sur les 3n-6 modes de vibrations, et lorsque la masse de l'ion augmente, le transfert d'énergie diminue et par conséquent, le processus de collision perd en efficacité. Après l'étape de CID, le spectre de masse obtenu dépendra donc de la distribution de l'énergie interne de l'ion. Plus cette énergie est élevée, plus l'ion se fragmentera en proportion importante. La fragmentation CID basse énergie conduira principalement à l'observation du canal de fragmentation le moins énergétique. Le spectre obtenu contient principalement des ions de types *b* et *y*.

En spectrométrie de masse, les systèmes sont considérés comme quasiment isolés du fait de la basse pression régnant dans l'analyseur et les théories sur les vitesses de réaction ne peuvent plus être limitées à des processus thermodynamiques où les molécules sont constamment activées et relaxées par collision avec d'autres molécules (gaz, solvant…). Pour compléter la théorie statistique de Maxwell-Boltzmann applicable pour un gaz à l'équilibre thermique, la théorie de Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus (RRKM) [13, 14] et celle de Rosenstock [15] (Quasi Equilibrium Theory) ont été utilisées. Ces théories reposent sur quatre suppositions :

- le temps nécessaire à la dissociation d'un ion est plus important que le temps nécessaire à son excitation
- la vitesse de dissociation est lente comparée à la vitesse de redistribution d'énergie interne sous tous les degrés de liberté.
- les fragments sont issus d'une série de réactions unimoléculaires consécutives et compétitives
- les ions produits dans un spectromètre de masse sont des systèmes isolés dans un état d'équilibre interne. Ces systèmes sont considérés comme ergodiques [16]. L'énergie absorbée est redistribuée sur toute la molécule et ce sont les liaisons les plus faibles qui tendent à être rompues.

ii. Dissociation induite par des photons infrarouge (IRMPD)

Très proche d'un point de vue mécanistique de la CID basse énergie, la dissociation induite par des photons infrarouge consiste en l'excitation des ions avec un laser IR (IRMPD : infrared multiphoton dissociation) [17-19] ou par un corps noir (BIRD : blackbody infrared dissociation) [20, 21]. Avec un laser à CO_2, l'énergie des photons d'environ 0.1 eV est absorbée par les modes de vibration des ions, ce qui va lentement augmenter leur énergie interne et provoquer leur dissociation. Des lasers à CO_2 compacts et puissants (de 10 à 100 W) sont disponibles. Ainsi la technique IRMPD a pu être couplée en routine dans les spectromètres de masse FTICR (chez Bruker par exemple) [22, 23].

Pour observer de la fragmentation, l'énergie absorbée par les ions doit être supérieure à l'énergie de dissociation de l'édifice moléculaire selon la voie la plus basse, qui typiquement est de 1 à 2 eV. L'énergie des photons IR étant d'environ 0.1 eV, l'ion moléculaire doit donc absorber au moins dix photons pour pouvoir se dissocier. Ce processus est donc multiphotonique.

$$A \xrightarrow{nh\nu} A^{*} \xrightarrow{dissociation} F + N \qquad (3)$$

Avec hν, l'énergie du photon, n, le nombre de photons absorbés.

Comme la CID, ce processus d'excitation vibrationnelle est considéré comme étant un processus ergodique. L'énergie absorbée se partage sur les 3n-6 modes de vibration. Ainsi, les fragments obtenus par IRMPD sont du même type que ceux observés en CID basse énergie et le processus de fragmentation perd en efficacité lorsque la taille de la molécule augmente.

Lors de la dissociation, il peut y avoir compétition entre les phénomènes radiatifs et collisionnels, pouvant diminuer partiellement l'excès d'énergie interne de l'ion et par conséquent atténuer sa fragmentation. C'est la raison pour laquelle les expériences d'IRMPD sont généralement réalisées dans une cellule FTICR sous vide poussé, diminuant ainsi fortement la probabilité de désactivation des ions par collision.

Pour la CID basse énergie et l'IRMPD, l'énergie est répartie de façon statistique sur l'ensemble des modes de vibration du système. Par conséquent, si un canal de fragmentation est beaucoup plus bas en énergie que les autres, la fragmentation par chauffage conduira principalement à l'observation de ce canal de fragmentation et sera donc peu informative d'un point de vue structurel. De plus, pour des systèmes de grande taille qui possèdent un nombre important de modes de vibration, l'énergie d'excitation doit être augmentée pour pouvoir dissocier les ions, dans des temps correspondant aux fenêtres temporelles accessibles aux spectromètres de masse.

Pour pallier ce manque d'information, des méthodes d'activation alternatives ont été développées. Ces méthodes, appelées ExD, mettent en jeu un processus d'excitation électronique.

I.3.1.2. L'EXCITATION ELECTRONIQUE : EXD

Aux alentours des années 2000, de nouvelles méthodes de fragmentation mettant en jeu une activation électronique ont été développées avec l'objectif de combler le manque d'information obtenue avec les méthodes statistiques. Pour l'étude de protéines et peptides positivement chargés, Mc Lafferty mit au point la fragmentation induite par capture d'électron (ECD) [24] en 1998 et Hunt développa la fragmentation induite par transfert d'électron (ETD) [25] en 2004. En 2005, Hunt fit des expériences de « reverse ETD » pour étudier des peptides cette fois-ci négativement chargés [26] et bien plus récemment, en 2011, le groupe de Hakansson réussit à adapter l'ECD à l'analyse de polyanions [27]. En 2001, Zubarev développa également une méthode de fragmentation par dissociation électronique en mode négatif, la dissociation induite par détachement d'électron (EDD) [28, 29]. L'émergence de nouvelles sources de lumière a permis le développement de techniques de photodissociation par excitation optique. L'UVPD (ultraviolet photodissociation), introduite par Bowers en 1984 [30] et développée par de nombreux groupes comme celui de Reilly à 157 nm [31], de Brodbelt à 193 nm [32], de Julian à 168 nm [33], et par notre groupe dans l'UV [34-36], permettent d'exciter électroniquement les peptides et protéines par absorption d'un photon. En mode négatif, la dissociation par photodétachement d'électron (a-EPD) développée par notre équipe est une méthode de fragmentation par activation électronique utilisant des lasers UV.

A la différence de l'IRMPD et de la CID basse énergie impliquant une excitation vibrationnelle, les techniques ExD font appel à une excitation électronique. Lors de la capture ou du transfert d'électron, l'électron supplémentaire se trouve généralement capté sur une orbitale de Rydberg [37]. La nature de cette orbitale ainsi que l'énergie en excès rapportée par l'électron (4 à 6 eV) permettent d'obtenir des relaxations conduisant à des fragmentations différentes de celles observées par CID basse énergie. Par absorption d'un photon Visible, UV ou VUV, la molécule est électroniquement excitée et le retour à l'état fondamental peut également induire une fragmentation spécifique. Notons que les techniques ECD, EDD, ETD et a-EPD font appel à la génération d'un radical énergétique conduisant à une réactivité chimique particulière des biomolécules [31, 38].

i. Reaction ion-ion (ETD)

En ETD, l'électron de faible énergie nécessaire à la fragmentation d'un peptide est apporté par un radical anion (anthracène ou fluoranthène en général) [25].

$$M^{n+} + A^{-\bullet} \longrightarrow M^{(n-1)+\bullet} + A \xrightarrow{dissociation} F_1^{m+} + F_2^{k+\bullet} \qquad (4)$$

La capture exothermique modifie la structure électronique et la fragmentation obtenue est non statistique. La dissociation se produit plus rapidement que la redistribution d'énergie sur tous les degrés de liberté, permettant d'accéder à des types de fragments différents et complémentaires de ceux observés en CID. Les fragments observés sont principalement de type *c* et $z^{\bullet}$. Les chaines latérales des acides aminés et donc les PTMs restent intactes. L'ETD peut être utilisé en « top-down » car il permet la fragmentation de longs peptides et de protéines.

Des expériences de « reverse ETD » ont été réalisées dans le but de caractériser des peptides négativement chargés [25, 26]. Le radical, créé par réaction entre l'anion d'intérêt et un cation radicalaire $C^{n+\bullet}$ (souvent $Xe^{+\bullet}$), se fragmente spontanément.

$$M^{n-} + C^{n+\bullet} \longrightarrow M^{(n-1)-\bullet} + C^{(n-1)+} \xrightarrow{dissociation} F_1^{m-} + F_2^{k-\bullet} \quad (5)$$

Ce type de réaction ion/ion conduit majoritairement aux fragments $a^{\bullet}$ et *x*. Les pertes de neutres bien qu'abondantes, ne sont pas informatives en général. Quelques fragments *c* et *z* peuvent également être observés. L'excès d'énergie laissé par « reverse ETD » est estimé à environ 6 eV [25]. Cette technique devient de plus en plus populaire du fait de son couplage commercial sur des spectromètres de masse performants (Orbitrap Elite ou LTQ Orbitrap XL ETD de Thermo) [39].

ii. Reactions ion-electron (ECD, EDD)

o La dissociation par capture d'electron (ECD)

L'ECD consiste en l'irradiation d'un faisceau d'électrons thermiques de faible énergie (quelques dixièmes d'eV) sur une protéine multiprotonée qui contient un site de protonation ou un site capable de capturer cet électron pour former un cation radicalaire [24].

$$M^{n+} + e^{-} \longrightarrow M^{(n-1)+\bullet} \xrightarrow{dissociation} F_1^{m+} + F_2^{k+\bullet} \quad (6)$$

En ECD, la dissociation se produit également plus rapidement que la redistribution d'énergie sur tous les degrés de liberté. On observe une fragmentation des liaisons N-C_{α}, liaisons plus énergétiques que les liaisons peptidiques conduisant à des fragments de type *c* et $z^{\bullet}$. Ces fragmentations se produisent avant la redistribution de l'énergie sous forme vibrationnelle et ainsi, les chaines latérales des acides aminés et les modifications post-traductionnelles pourtant labiles restent intactes et peuvent être identifiées et localisées.

Pour compléter la fragmentation *c/z* obtenue en ECD, Zubarev a développé la technique de dissociation par capture d'électrons chauds (HECD) [40]. Cette technique consiste en l'irradiation d'un faisceau d'électrons plus énergétique, de l'ordre de 10 eV, sur une protéine

multiprotonée. Une excitation électronique a lieu avant la capture d'électron et la molécule peut alors se fragmenter dans un état excité. La fragmentation subséquente ne se limite pas aux ruptures N-C_α comme en ECD classique, on observe également une fragmentation secondaire due à l'excès d'énergie déposée dans l'ion excité (*Figure I.6*).

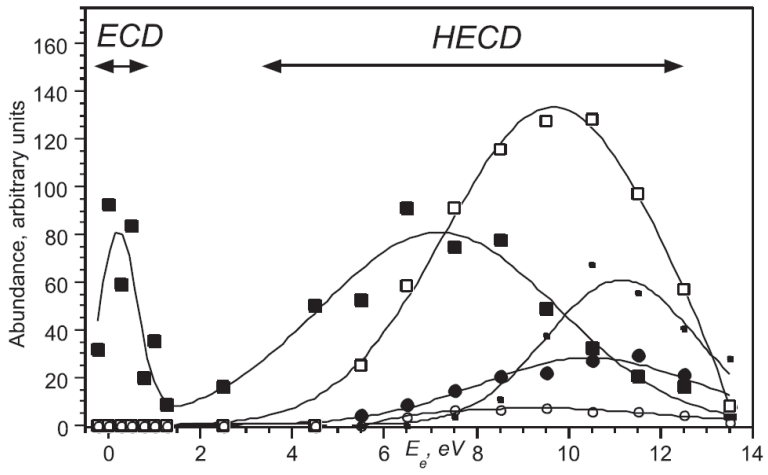


Figure I.6 Abondance des ions fragments de l'ion SPR (signal recognition particle of Sacchraromyces cerevisiae, MW = 1261 Da) après 250 ms d'irradiation en fonction de l'énergie de l'électron. Pour l'ion 2+ : (▪) fragmentations N-Cα, (□) fragmentations C-N, (◦) ions z4+• (●) ions w4+•. Pour l'ion 1+ : (▪) fragmentations C-N [40]

Ces techniques de fragmentation faisant intervenir une réaction de type ion-électron, permettent d'obtenir une grande couverture de séquence en mode positif. Par contre, certains peptides acides ne peuvent être analysés en polarité positive, leur réponse est trop faible et le signal est quasi inexistant. Les méthodes d'activation vibrationnelles sur les polyanions se sont révélées peu efficaces. Il est pourtant clair que l'analyse des polyanions est importante. Certaines PTMs comme la phosphorylation et la sulfatation sont acides et par conséquent plus stables quand elles sont portées par des anions plutôt que des cations. Bien que l'interaction entre les anions et les électrons ne soit pas évidente du fait de la répulsion coulombienne entre charges négatives, Hakansson a montré très récemment qu'un polyanion $[M\text{-}nH]^{n-}$ peut capturer des électrons de 3.5 à 6.5 eV. Cette capture provoque une augmentation de la charge globale du système et la formation d'un intermédiaire radicalaire $[M\text{-}nH]^{(n+1)-\bullet}$ qui subit le même type de fragmentation qu'en ECD et en ETD. Cette technique, appelée « dissociation d'ions négatifs par capture d'électron » (niECD), permet d'obtenir une meilleure couverture

de séquence qu'en CID et également de localiser les PTMs. De plus le niECD est compatible avec des peptides monochargés ce qui rend son application très intéressante en MALDI.

Au lieu de capturer un électron (mécanisme peu probable) l'interaction d'un faisceau d'électrons avec des polyanions peut conduire à l'éjection d'un électron. De cette manière, Zubarev développa la dissociation induite par détachement d'électron (EDD) applicable aux polyanions [28, 29].

o LA DISSOCIATION PAR DETACHEMENT D'ELECTRON (EDD)

L'EDD consiste en l'irradiation d'électrons d'énergie supérieure à 10 eV sur des polyanions. Ces électrons sont suffisamment énergétiques pour ioniser l'anion en créant une charge positive radicalaire (voir schéma ci-dessous). La recombinaison exothermique de cette charge positive radicalaire avec une charge négative portée par le système entraine une excitation électronique et la rupture des liaisons peptidiques [28].

$$^{-}XR{-}.....{-}RX^{-} + e_{fast}^{-} \xrightarrow{>10eV} {}^{-}XR{-}..(+\bullet)...{-}RX^{-} + 2e^{-}$$

$$\xrightarrow{\text{énergie en excès}} {}^{\bullet}XR{-}.....{-}RX^{-} \xrightarrow{\text{dissociation}} F_1^{m+} + F_2^{k+\bullet} \qquad (7)$$

Avec X = COO^-, SO_3^- …

Les principaux fragments résultant de l'EDD sont des ions *a*, $a^{\bullet}$ et *x*. L'énergie laissée sur la molécule est estimée à environ 5 eV ($IP_{peptide} - EA_{COO^-}$ ~ 8 -3.5 ~5 eV)[28]

o VARIATIONS SUR LE THEME

Notons que des variantes sur le thème des réactions « ion-électron » ont été publiées au cours de ces dernières années. Zubarev a introduit la dissociation induite par ionisation électronique (EID) sur des peptides [41]. Cette technique permet la double ionisation de polycation M^{n+}. Zubarev nota que les électrons lents secondaires formés lors de la réaction « ion-électron »

sont réfléchis et peuvent ainsi interagir avec l'espèce $M^{(n+1)+\bullet}$. Après capture électronique, cet ion radicalaire peut se dissocier par fragmentation peptidique et pertes de neutres, comme illustré ci-dessous [42, 43].

$$M^{n+} + e_{fast}^{-} \longrightarrow M^{(n+1)+\bullet} + e_{fast}^{-} + e_{slow}^{-}$$
$$M^{(n+1)+\bullet} + e_{slow}^{-} \longrightarrow M^{n+*} \longrightarrow Fragmentation \quad (8)$$

iii. Reactions ion-photon (UVPD, Activated-EPD)

La dissociation induite par des photons ultraviolet (UVPD ou VUVPD) consiste en l'excitation des ions d'intérêt avec un laser généralement UV pour lequel l'énergie interne des photons est supérieure à 4 eV. L'intérêt d'une telle approche est de pouvoir moduler l'énergétique et la nature de l'excitation avec la longueur d'onde des photons utilisés. Les méthodes de photodissociation UV permettent d'activer électroniquement la molécule.

$$M^{n+} \xrightarrow{h\nu} M^{n+*} \longrightarrow F^{+} + N \quad (9)$$

L'UV lointain (le VUV, 150 - 220 nm) permet d'exciter les liaisons amides du squelette peptidique, et l'UV proche (220 - 400 nm), les résidus des acides aminés aromatiques. Dans l'UV la plupart des expériences sont réalisées avec des YAG triplés (355 nm) ou quadruplés (266 nm). A 266 nm, ce sont les chromophores des acides aminés aromatiques qui sont excités, ce qui peut mener à la fragmentation des liaisons peptidiques [44, 45]. A 355 nm, les peptides doivent être marqués avec différents chromophores absorbant à cette longueur d'onde pour pouvoir ainsi exciter des peptides sans acide aminé aromatique initialement présent dans leur séquence [46].

Dans le cas des cations, suite à l'absorption d'un photon UV, la molécule excitée électroniquement va retourner à son état fondamental de différentes manières. L'état

électroniquement excité souvent lié ($\pi\pi^*$ par exemple) peut croiser un état électronique dissociatif, ce qui entrainera une fragmentation non statistique directement à partir de l'état excité (perte d'atomes d'hydrogène, fragmentation au voisinage des chromophores…) [47, 48]. Si il y a conversion interne de l'énergie cinétique en énergie vibrationnelle, l'excès d'énergie peut être redistribué sur les 3n-6 modes de vibration de l'état fondamental (IVR : redistribution intramoléculaire de l'énergie vibrationnelle) et donner lieu à une fragmentation statistique de type CID basse énergie.

Le rayonnement VUV a essentiellement été utilisé sur des ions positifs, avec des lasers ArF à 193 nm (6.4 eV) [30, 49, 50] et F_2 à 157 nm (7.9 eV) [31, 51, 52]. A ces longueurs d'onde, la plupart des électrons des liaisons π peuvent être excités et de nombreuses fragmentations du squelette peptidique sont observées mais également des ions fragments de type *v* et *w*, non observés en CID basse énergie. Pour les ions négatifs, le photodétachement d'électron est la principale voie de fragmentation observée après irradiation VUV (6 - 20 eV) [53-55].

Dans le cas des anions, le canal majoritaire après irradiation laser (Visible, UV ou VUV) des polyanions est le détachement d'électron qui se traduit par la formation d'une espèce radicalaire. L'énergie laissée dans la molécule après détachement d'électron est généralement faible (< 1 eV) et l'ion radicalaire doit alors être activé par collision pour se dissocier. La fragmentation résultante apporte un bon recouvrement de séquence complémentaire aux autres techniques. Le principe de cette technique, nommée la dissociation par photodétachement d'électron (a-EPD), est donné ci-dessous **:**

$$M^{n-} \xrightarrow{h\nu} M^{(n-1)-\bullet}$$
$$M^{(n-1)-\bullet} \xrightarrow{CID} F_1^{m-} + F_2^{k-\bullet} + N \qquad (10)$$

I.4. PROPRIETES OPTIQUES DES PEPTIDES ET PROTEINES ET OUTILS DE CARACTERISATION

Comme nous venons de le voir, la spectrométrie de masse est un moyen performant pour déterminer la structure primaire des protéines. Cependant, la fonction d'une protéine n'est pas uniquement déterminée par sa séquence en acides aminés mais également par sa structure tridimensionnelle. La RMN en solution et la cristallographie par rayon X permettent d'obtenir de façon très précise la structure tridimensionnelle de la molécule, mais ces techniques présentent cependant quelques limites. Il n'est pas forcément évident de former un cristal avec les protéines, ce qui limite le pouvoir de la cristallographie, ni d'étudier des molécules de tailles supérieures à 25 kDa par RMN. De plus, la quantité de matière requise est importante et le temps d'analyse relativement long. Les techniques de spectroscopie optique en solution permettent d'obtenir une information globale sur la conformation ou sur l'environnement proche d'une protéine. La spectrométrie de masse en couplage (échange H/D, mobilité ionique, spectroscopie optique) peut également être utilisée comme technique complémentaire pour une caractérisation structurelle en phase gazeuse.

I.4.1. PROPRIETES OPTIQUES DES PROTEINES

Le spectre électromagnétique permet d'exciter les molécules à différents niveaux. La spectroscopie microonde informe sur les transitions rotationnelles, la spectroscopie infrarouge sur les transitions vibrationnelles et la spectroscopie visible et ultraviolette sur les transitions électroniques [56] (*Figure I.7*).

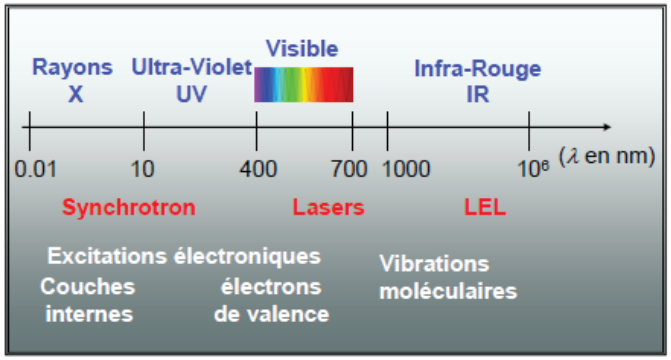


Figure I.7 Décomposition du spectre électromagnétique en fonction de la longueur d'onde

La spectroscopie rotationnelle permet d'explorer les moments d'inertie pour les petites molécules. Dans le domaine du Térahertz (0-100 cm^{-1}), des informations concernant des modes de vibration collectifs (dépendant de la structure secondaire) peuvent être obtenues sur les protéines [57].

La spectroscopie UV permet d'étudier les excitations électroniques des biomolécules entre 220 et 400 nm. Dans le cas des protéines, les principales sources d'absorption sont les chaines latérales des acides aminés aromatiques (transitions ππ* à 257.4 nm pour la phénylalanine, 274.6 nm pour la tyrosine et 279.8 nm pour le tryptophane…) [58] (*Figure I.8*).

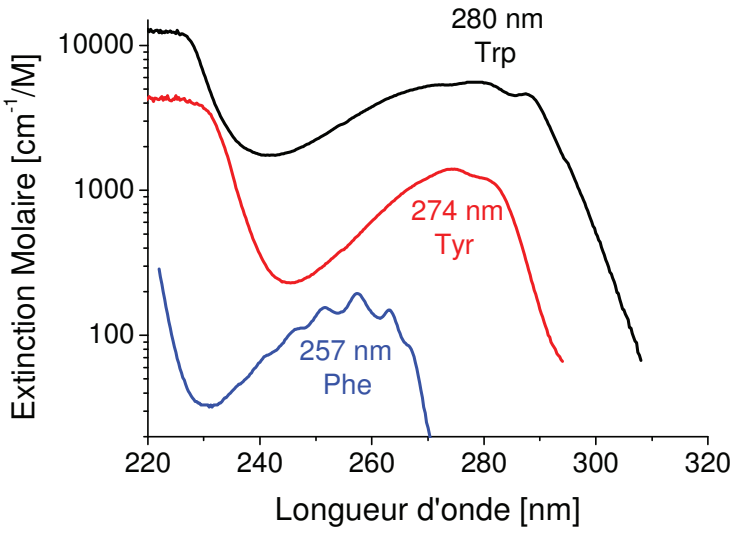


Figure I.8 Spectre d'absorption des acides aminés aromatiques dans l'ultraviolet à pH 7 dans un tampon phosphate [58]

Dans le domaine du VUV, la plupart des électrons des liaisons π peuvent être excités et principalement les groupements amides des liaisons peptidiques aux alentours de 190-220 nm où les électrons π sont délocalisés sur l'ensemble de la liaison (transitions ππ* et nπ*).

Les différentes transitions électroniques observables dans l'UV et le VUV sont résumées sur la figure ci-dessous :

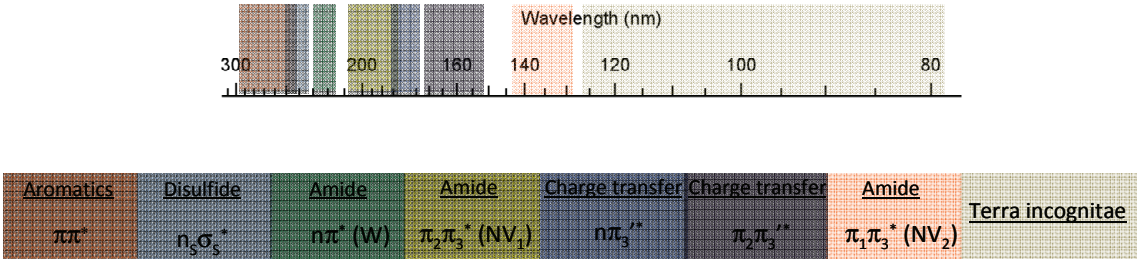


Figure I.9 Les transitions électroniques dans l'UV et dans le VUV (80 - 300 nm)

Certaines protéines comme le cytochrome c et la myoglobine sont des hémoprotéines contenant un atome de fer au centre d'un anneau organique appelé porphyrine. Cet hème, lié de façon covalente ou non à la chaine polypeptidique, augmente le degré de délocalisation des électrons et diminue par conséquent l'énergie nécessaire aux transitions électroniques permettant ainsi à ces protéines d'également absorber dans le visible. Les deux bandes d'absorption de l'hème dans le visible sont la bande de Soret autour de 400 nm et les bandes Q autour de 500 - 600 nm. Elles correspondent aux transitions électroniques π-π*. Ces bandes sont sensibles à l'état d'oxydation et de ligation de l'atome métallique. L'état d'oxydation et de ligation de l'hème peut ainsi être identifié à l'aide de spectres d'absorption dans le domaine UV-Visible au niveau de la bande de Soret ou de la bande Q [59-63]. Notons également que les chromophores des acides aminés aromatiques (Tyr et Trp) lorsqu'ils sont sous forme radicalaire présentent de fortes absorptions dans le visible et dans le proche UV [64].

Les spectroscopies infrarouge et électronique seront détaillées dans la suite de ce chapitre.

I.4.2. TECHNIQUES OPTIQUES COMME SONDE DE CONFORMATION

1.4.2.1. FLUORESCENCE DES ACIDES AMINES AROMATIQUES

Suite à l'absorption d'un photon UV, le processus de fluorescence est un processus radiatif qui correspond au retour vers le niveau fondamental à partir du premier niveau excité de même multiplicité (S_1) par l'émission d'un photon. Les niveaux d'énergie excités sont instables et la durée de vie d'un électron dans de tels niveaux est de l'ordre de quelques nanosecondes. Le processus de fluorescence à partir de niveaux électroniques autres que S_1 sont extrêmement rares et donc de faible intensité. Si la molécule est excitée à un niveau électronique supérieur, elle relaxe généralement par mode vibrationnel pour atteindre S_1, le premier niveau électronique excité, à partir duquel les molécules se désexcitent par fluorescence (*Figure I.10*). L'énergie des photons émis est alors plus faible que l'énergie d'excitation initiale des photons. Le décalage, entre le maximum d'émission et le maximum d'absorbance, s'appelle le déplacement de Stokes. Il est important de noter que toutes les molécules excitées ne retourneront pas à leur état fondamental par fluorescence. D'autres processus tel que l'extinction par collision ou le transfert d'énergie entre deux fluorophores (FRET) peuvent également participer à la dépopulation de l'état excité [65].

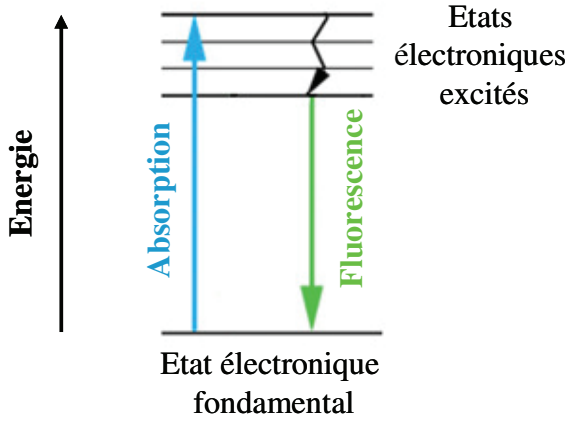


Figure I.10 Diagramme de Jablonski

Dans le cas des protéines, la fluorescence intrinsèque est assimilée à la fluorescence des résidus aromatiques individuels. En effet, dans les protéines, les acides aminés aromatiques (ainsi que les ponts disulfures à moindre échelle) servent de sondes fluorescentes naturelles. Les noyaux aromatiques ont la capacité d'absorber dans l'UV et de réémettre des photons par fluorescence (*Tableau I.4*). Les groupes indoles des résidus tryptophane participent généralement à ~90% de la fluorescence totale des protéines. En effet, les résidus tyrosines bien que généralement plus nombreux sont souvent « éteints » par la proximité des tryptophanes. Les phénylalanines ont un rendement quantique extrêmement faible ce qui rend la mesure de fluorescence difficile. Ces trois résidus ont des longueurs d'onde d'absorption et d'émission bien distinctes (*Figure I.8* et *Figure I.11*).

Fluorophores	***Temps de vie (ns)***	***Absorption***		***Fluorescence***	
		Longueur d'onde (nm)	**Absorption ($M^{-1}cm^{-1}$)**	**Longueur d'onde (nm)**	**Rendement quantique**
Tryptophane	2.6	280	5600	348	0.2
Tyrosine	3.6	274	1400	303	0.14
Phénylalanine	6.4	257	200	282	0.04

Tableau I.4 Caractéristiques de l'absorption et de l'émission du tryptophane, phénylalanine dans un tampon phosphate 0.1 M à pH 7[66]

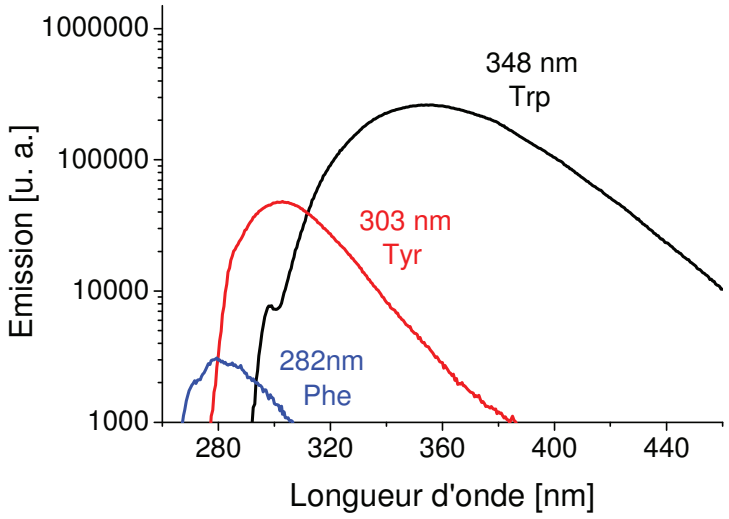


Figure I.11 Spectre d'émission des acides aminés aromatiques dilués dans du tampon phosphate 0.1M à pH 7. La longueur d'onde d'excitation est de 270 nm [67]

L'absorption du tryptophane est maximale à 280 nm, et la longueur d'onde d'émission varie entre 300 et 350 nm selon de l'environnement de la protéine (principalement vis-à-vis de l'effet solvatochromique et du pH). La fluorescence permet une mesure de la structure par l'effet d'extinction de la fluorescence par le solvant. Dans une protéine complètement dénaturée, les résidus tryptophanes sont exposés au solvant et la fluorescence de l'indole est réduite par des collisions avec les molécules du solvant. A l'inverse, dans une protéine repliée, le noyau indole se retrouvera généralement dans un noyau hydrophobe avec les autres résidus aromatiques. Dans ces conditions l'intensité de la fluorescence, alors décalée vers les plus basses longueurs d'onde, augmente considérablement.

Il est ainsi possible d'utiliser la fluorescence de la protéine pour sonder les changements de conformation [68, 69] et les différentes interactions extra et intra moléculaires (notons cependant que des interactions avec d'autres résidus protonés (Asn, Glu) peuvent entrainer une extinction de la fluorescence du tryptophane).

1.4.2.2. DICHROÏSME CIRCULAIRE POUR SONDER LA STRUCTURE SECONDAIRE DES PROTEINES

Le dichroïsme circulaire est la mesure de la différence d'absorption de la lumière polarisée circulairement droite et circulairement gauche (dans la gamme 170-700 nm) d'une protéine possédant des chromophores chiraux. Cette technique permet ainsi d'étudier la structure secondaire des protéines ainsi que leur repliement induit par des variations de milieu (solvant, pH, température…).

La zone d'absorption des protéines provient en grande partie des fonctions amides des liaisons peptidiques. Deux transitions électroniques principales, observables dans l'UV lointain, sont ainsi à l'origine du signal de dichroïsme circulaire. La transition $n \rightarrow \pi^*$ de plus faible énergie à 210-220 nm, et la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ à 190 nm [70]. L'agencement dans l'espace de la chaine polypeptidique caractérise la structure secondaire de la protéine. Les spectres de dichroïsme circulaire sont donc spécifiques et caractéristiques des différentes formes de structures secondaires. Les bandes présentes pour des protéines qui contiennent surtout des hélices α seront distinctes des protéines principalement composées de feuillets β (*Figure I.12*). Par

contre, les spectres de dichroïsme circulaire ne permettent pas de différencier ces deux éléments structuraux quand la protéine les contient tous les deux.

L'UV proche (220 - 400 nm) est la zone d'absorption des acides aminés aromatiques et à moindre échelle, des ponts disulfures. Les spectres de dichroïsme circulaire, bien que plus complexes et donc plus difficiles à analyser que dans l'UV lointain, donnent des informations sur l'environnement de ces résidus [71, 72].

Le dichroïsme circulaire permet donc d'obtenir une image globale de la structure secondaire de la protéine mais pas d'information sur la structure détaillée. Cette technique est généralement utilisée en complément d'autres expériences.

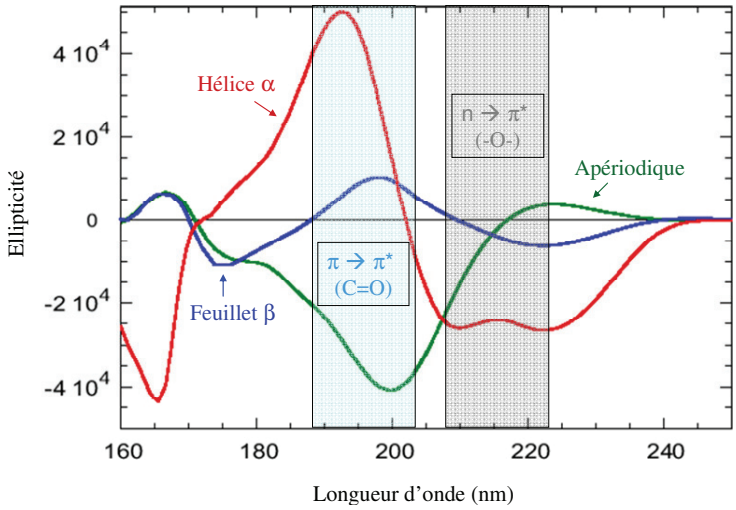


Figure I.12 Composante des spectres obtenus par dichroïsme circulaire sur (rouge) la myoglobine essentiellement composée d'hélices α, (bleu) la concanavaline essentiellement composée de feuillets β et (vert) le collagène de type VI, apériodique essentiellement composé d'hélices polyproline II [73]

1.4.2.3. SPECTROSCOPIE INFRAROUGE ET RAMAN POUR DETERMINER LA PRESENCE DE GROUPEMENTS FONCTIONNELS

Les spectroscopies IR et RAMAN sont deux techniques complémentaires basées sur la vibration des liaisons entre atomes d'une molécule correspondant à des transitions entre les différents niveaux d'énergie vibrationnelle. Ces méthodes consistent à focaliser un faisceau laser sur un échantillon en solution et à analyser la lumière diffusée pour déterminer la

présence de groupements fonctionnels spécifiques au sein de la molécule, leur conformation et leurs éventuelles interactions.

i. SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

Au sein d'une protéine, les différents groupements chimiques peuvent se déformer selon six modes de vibration (élongation symétrique et antisymétrique, le cisaillement, la bascule, l'agitation et la torsion). Toutes les vibrations de ces groupements chimiques, impliquant une variation du moment dipolaire électrique permanent, absorbent dans le domaine infrarouge. L'énergie de ces vibrations dépend de la force des liaisons chimiques, de la masse des atomes impliqués dans la vibration, de l'environnement chimique (liaisons hydrogènes, interactions électrostatiques, transferts de charges...) voire du champ électrostatique environnant le groupe chimique (l'état d'oxydoréduction d'un site métallique).

Ainsi, à chaque fonction ou groupe chimique correspond une gamme de fréquences de vibration caractéristique. La liaison peptidique possède de nombreux modes de vibration récapitulés dans le *Tableau I.55* (9 bandes, notées amide I à amide VII et amide A et B). L'absorption infrarouge possède une fréquence caractéristique pour chacun des différents groupements chimiques. La position et la structure de ces bandes donnent des informations sur la structure primaire (acides aminés et chaines latérales) et secondaire de la protéine étudiée. Il est également possible d'étudier les changements de conformation des molécules biologiques en interaction avec leur environnement.

Vibrations de la liaison peptidique		Vibrations des chaînes latérales	
Fréquence (cm^{-1})	Attribution	Fréquence (cm^{-1})	Attribution
3250-3300	Amide A (résonance de Fermi ν (N-H) avec amide II)	1716	ν_{as} (C=O) de COO^- de l'aspartate
3090-3100	Amide B (résonance de Fermi ν (N-H) avec amide II)	1712	ν_{as} (C=O) de COO^- du glutamate
1600-1700	Amide I ν (C=O) couplé avec ν (C-N) et δ (N-H)	1622	δ (CH_2) de l'asparagine
1550	Amide II δ (N-H) couple avec ν (C-N)	1596	Histidine (mouvement du cycle)
1230-1330	Amide III δ (N-H) et ν (C-N)	1516	tyrosine (mouvement du cycle)
625-767	Amide IV δ (0=C-N) et autres modes	2400-2700	Cystéine ν (S-H)
640-800	Amide V δ (0=C-N-H) et autres modes	3486-3491	Tryptophane ν (N-H du noyau indole)
537-606	Amide VI δ (N-H) hors du plan		
200	Amide VII (torsion du squelette)		

Tableau I.5 Pics d'absorption attribués aux vibrations des protéines (ν : vibration d'élongation, ν_{as} : élongation antisymétrique, δ : vibration de déformation)

La déconvolution de la bande amide I permet de déterminer les pourcentages de structures secondaires (*Figure I.13*)

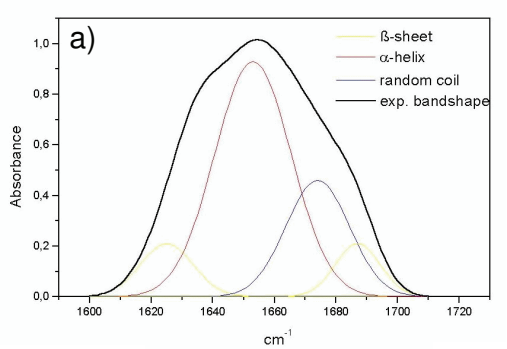


Figure I.13 a) Déconvolution de la bande amide I pour en extraire le taux des différentes structures secondaires dans la protéine[74]

ii. SPECTROSCOPIE RAMAN

Contrairement à la diffusion élastique de la lumière connue sous le terme de diffusion Rayleigh, la spectroscopie Raman est basée sur la diffusion inélastique d'un photon par un milieu après interaction entre le photon et la matière (*Figure I.14*). Cet échange est dû à la vibration de la molécule [75]. La spectroscopie Raman est une forme de spectroscopie vibrationnelle avec des règles de sélection différentes de celles de la spectroscopie infrarouge classique. Lorsqu'il y a échange d'énergie entre le photon incident et la molécule, la lumière diffusée n'a alors plus la même longueur d'onde que la lumière incidente. La longueur d'onde de la lumière diffusée par la matière est ainsi décalée vers les hautes (décalage Stokes) et basses (décalage anti-stokes) longueurs d'onde. La différence d'énergie entre le photon incident et le photon Raman diffusé est égale à l'énergie de vibration de la molécule diffusante.

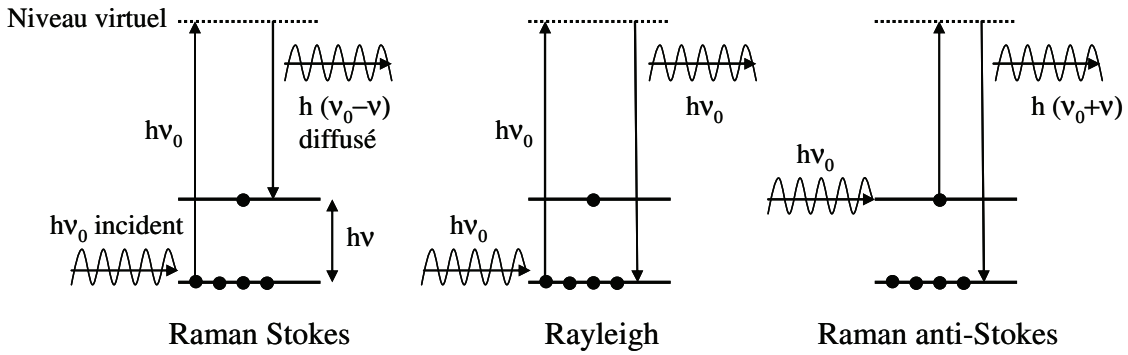


Figure I.14 Mécanismes de diffusion Rayleigh et Raman

La spectroscopie Raman est utilisée pour obtenir des informations sur la structure, la fonction et la réactivité de molécules biologiques. Les spectres vibrationnels des protéines dépendent sensiblement de l'organisation et de l'interaction de ces molécules avec leur environnement : les effets inter et intra moléculaires tels que les angles des liaisons peptidiques et les liaisons hydrogène qui peuvent se former.

L'étude des protéines en spectroscopie Raman s'intéresse essentiellement aux positions des bandes amide : amide I (80% C=O stretch, vers 1650cm^{-1}), amide II (60% N–H bend et 40% C–N stretch, vers 1550cm^{-1}), et amide III (40% C–N stretch, 30% N–H bend, vers 1300cm^{-1}). La position de ces bandes dépend de la structure secondaire des protéines, qui elle-même régit bien souvent la fonction et la réactivité des protéines. En analysant les spectres vibrationnels des protéines, il est donc possible de comprendre certains aspects de l'activité biologique des protéines (*Figure I.15*).

Conformation	H_2O	D_2O
hélice α	1650-1657	1647-1654
feuillet-β antiparallèle	1612-1640	1628-1635
	1670-1690 (fine)	
feuillet-β parallèle	1626-1640	
boucle	1655-1675	
	1680-1696	
non ordonné	1640-1651	1643

Figure I.15 Fréquence de la bande amide I

Du fait des mouvements des molécules en phase liquide (diffusion, rotation, convection) et de la grande taille des protéines, les spectres obtenus sont relativement larges, et il est fréquent d'observer la superposition de plusieurs vibrations sous une seule raie large. Les spectres Raman donnent plutôt des informations globales comparatives lorsque des spectres sont effectués dans différentes conditions, comme illustré dans la *Figure I.16* avec l'exemple de la dénaturation de l'alpha-synucléin :

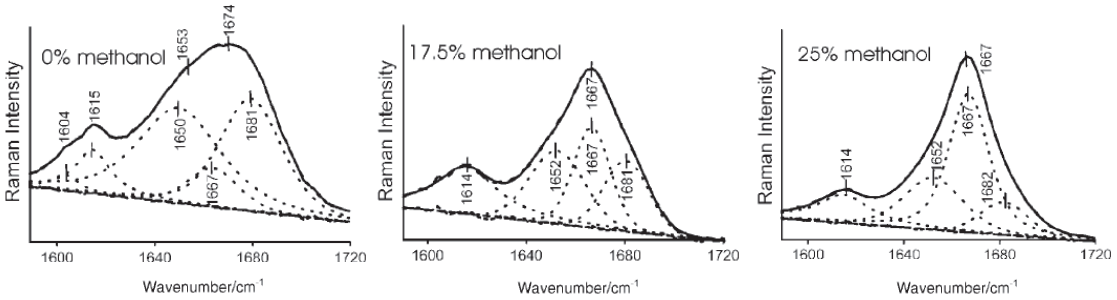


Figure I.16 Spectre Raman de l'alpha-synucléin dans différentes concentrations de méthanol menant à la dénaturation et à la formation de feuillets β. Solution tampon de Tris-Hcl 20 mM, pH = 7.5[76, 77]. Les bandes amine I centrées à 1650-1656, 1664-1670 et 1680 cm^{-1} sont respectivement attribuées aux conformations hélice α ; feuillet β et polyproline II.

I.5. CARACTERISATION OPTIQUE DES PEPTIDES ET DES PROTEINES EN PHASE GAZEUSE

Les spectromètres de masse et en particulier les pièges à ions (QIT, FT-ICR…) permettent d'isoler un ion moléculaire dans un environnement complètement contrôlé. Le couplage spectrométrie de masse avec la spectroscopie laser va alors permettre d'estimer les propriétés optiques intrinsèques de l'ion isolé. La comparaison avec l'optique en solution permettra notamment de mieux comprendre l'influence de l'environnement (solvant, charges, pH…). De même, les spectres obtenus en phase gazeuse sont plus facilement comparables à ceux obtenus par simulation théorique puisque l'absence d'interaction avec les molécules de solvant facilite grandement les calculs. Deux techniques couplant la spectrométrie de masse à la spectroscopie laser ont été développées : la spectroscopie de fluorescence en phase gazeuse et la spectroscopie de photodissociation. Les toutes premières expériences de spectroscopie de protéines piégées dans un spectromètre de masse ont été réalisées par Mc Lafferty en irradiant

des peptides dans FTICR à l'aide un OPO infrarouge [78]. Notons l'apport de Dunbar et de la spectroscopie de photodissociation sur des ions biomoléculaires piégés [79].

I.5.1. LE FRET (TRANSFERT RESONNANT D'ENERGIE DE FLUORESCENCE)

Dans les années 2000, suite aux travaux pionniers de Parks, certains groupes comme ceux de Zenobi à Zurich, de Jockusch au Canada et celui Kappes à Karlsruhe [80-82] ont mis au point un montage expérimental permettant de détecter la fluorescence en phase gazeuse. L'équipe de Jockusch a également démontré que le FRET pouvait être utilisé pour sonder les conformations de biopolymères formés par électrospray en phase gazeuse avant d'être injecté dans un piège à ion quadripolaire [83]. Lorsque deux chromophores sont attachés de manière chimique à la molécule, un transfert énergétique entre les deux chromophores peut avoir lieu. La molécule fluorescente donneuse dans un état électronique excité après absorption d'un rayon lumineux peut transférer son énergie d'excitation à un chromophore accepteur. Néanmoins pour que ce transfert ait lieu, il faut que le spectre d'émission du donneur chevauche le spectre d'absorption de l'accepteur et que la distance les séparant soit inférieure à dix nanomètres. Le transfert énergétique par résonance est un processus non radiatif qui ne requiert pas de collision entre les chromophores. La distance entre les deux chromophores et le changement structural (dénaturation…) peuvent être suivit en temps réel [83-85].

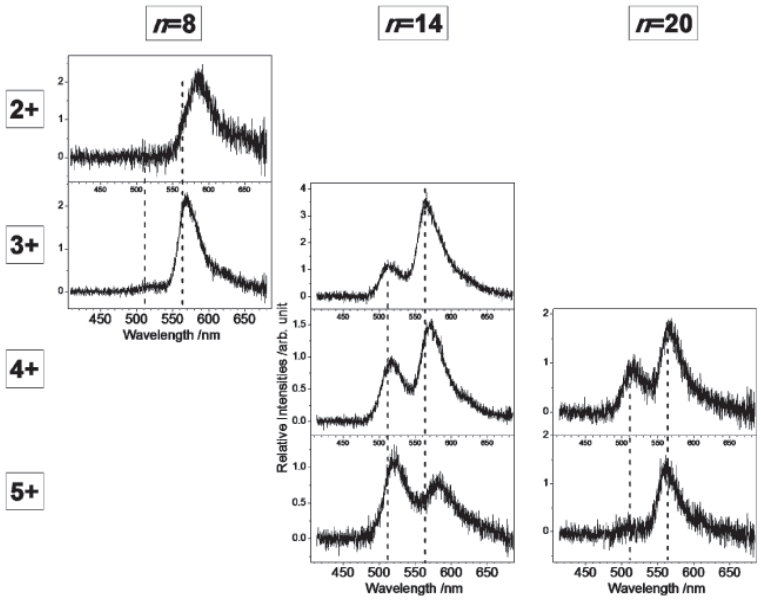


Figure I.17 Spectres d'émission du peptide (A)-GlyGlyPronLys(D)-NH2 pour n = 8, 14 et 20 prolines. Les lignes pointillées à 512 et 564 nm indiquent les positions des bandes d'émission des chromophores donneur et accepteur respectivement.

La *Figure I.17* illustre l'influence de la longueur de la chaine et de l'état de charge des polypeptides (A)-GlyGlyPro_nLys(D)-NH_2 sur le spectre d'émission. Pour n = 8, aucune fluorescence n'est observée pour le donneur, ce qui montre que le transfert d'énergie entre le chromophore donneur et le chromophore accepteur est total quel que soit l'état de charge. Pour n = 14, le transfert d'énergie décroit quand le nombre de charges portées par le peptide augmente. En effet, l'élongation du peptide est causée par l'augmentation des répulsions coulombiennes lorsque le nombre de charges augmente. La similarité des spectres obtenus pour n = 14 et n = 20 pour l'état de charge 4+ montre que les chromophores donneurs et accepteurs sont à une distance semblable dans les deux cas. Et plus étonnamment, pour n = 20, lorsque la charge augmente, le signal du donneur devient quasi nul. Ce transfert total d'énergie traduit la proximité des chromophores, autrement dit, le peptide contenant 20 prolines possède un coude dans sa structure secondaire [86].

Les expériences FRET nous permettent ainsi d'évaluer la conformation des peptides en sondant la distance entre les chromophores. Cependant, ces techniques nécessitent le couplage chimique de chromophores visibles sur des biomolécules à des endroits sensibles à la conformation, ce qui n'est pas forcement aisé.

I.5.2. LA SPECTROSCOPIE D'ACTION

La spectroscopie des biomolécules en phase gazeuse est aujourd'hui étudiée sur une large gamme de longueurs d'onde variant de l'IR au VUV, permettant ainsi d'étudier les propriétés intrinsèques des biomolécules. En solution, le spectre optique est obtenu en mesurant l'absorption de la lumière par un composé. En phase gazeuse, les ions sont isolés dans un piège ionique où la densité des ions présents dans le piège est trop faible pour mesurer directement l'extinction du faisceau qui traverse le nuage d'ions piégés (de type Beer-Lambert). On regarde alors l'action de la lumière sur les ions. La spectroscopie d'action est une spectroscopie résolue en fréquence, qui permet d'enregistrer le spectre de fragmentation d'une molécule, lui-même résolu longueur d'onde. Les informations qui en découlent sont de nature différente selon la gamme de longueur d'onde étudiée.

1.5.2.1. LA SPECTROSCOPIE D'ACTION INFRAROUGE

La spectroscopie d'action infrarouge est utilisée pour sonder directement et spécifiquement la structure d'ions moléculaires. La spectroscopie IR couplée à des simulations théoriques permet de déterminer les fréquences de vibration des liaisons et de remonter à la structure en comparant les spectres expérimentaux aux spectres calculés pour différentes structures moléculaires. Le spectre infrarouge est représenté par un rendement de fragmentation en fonction de l'énergie des photons infrarouges. L'énergie requise pour effectuer la fragmentation étant supérieure à celle d'un photon infrarouge, la fragmentation observée résulte d'une absorption IR multiphotoniques (*Figure I.18*).

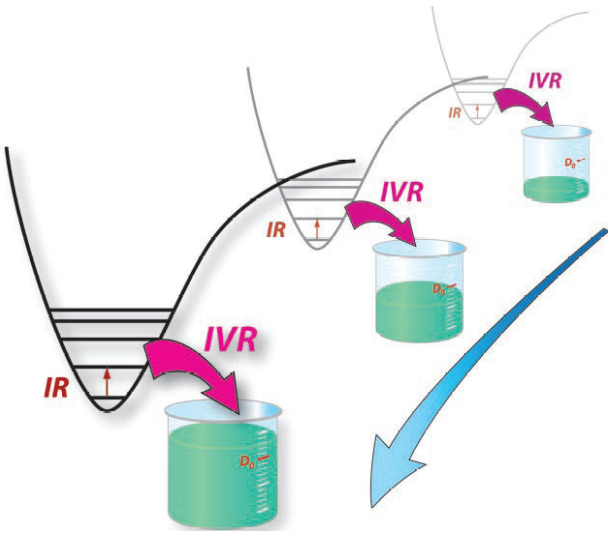


Figure I.18 Mécanisme de l'IRMPD dans les molécules polyatomiques montrant comment l'énergie vibrationnelle est redistribuée par IVR. Les molécules peuvent absorber plusieurs photons lors de la même transition. Une fois que l'énergie accumulée atteint l'énergie de dissociation (marque rouge)la molécule peut subir une fragmentation unimoléculaire[87]

L'étude des transitions vibrationnelles nécessite l'utilisation de lasers puissants et accordables dans le domaine de l'IR. Les plus intenses sources lumineuses sont les lasers à électrons libres qui utilisent le rayonnement synchrotron. On peut citer par exemple celui d'Orsay (CLIO) [88] ou celui des Pays Bas (FELIX) qui ont une gamme de fréquence variant de 100 à 3000 cm^{-1}. L'OPO IR (oscillateur paramétrique optique infrarouge) est également largement utilisé. Cette technique est habituellement mise en œuvre dans un spectromètre de masse de type FT-ICR, où la pression d'hélium au sein de la cellule ICR est d'environ 10^{-7} Torr afin d'éviter un éventuel refroidissement par collision.

Le principal problème de la spectroscopie infrarouge est la présence de plusieurs isomères. En couplant la spectroscopie IR à la spectroscopie UV (expériences pompe sonde) il est possible de sélectionner une transition électronique spécifique d'un conformère donné grâce au laser UV. La spectroscopie ainsi résolue en conformères permet de déterminer le nombre de conformères formés en phase gazeuse et d'obtenir les spectres IR de ces différents conformères.

Trois domaines d'IR sont généralement utilisés pour suivre les bandes amides : les régions amide I et II (5 – 8 µm) et amide A (3 µm) [89]. Les bandes amides I (élongation de CO) et amides II (torsion de NH) sont généralement utilisées en phase condensée puisque l'eau n'influe pas sur les spectres. La bande amide A n'est, quant à elle, que très peu étudiée en phase liquide à cause de la forte absorption du groupement OH. Par contre, cette région permet d'obtenir des informations en phase gazeuse. En effet, les vibrations d'élongation NH sont sensibles aux interactions dans lesquelles un groupement NH est impliqué, en particulier en présence de liaison hydrogène. Chaque groupe NH de la molécule va ainsi donner une bande d'absorption amide en IR et fournir des informations sur leur propre environnement. Plus l'interaction est forte, plus la bande est décalée vers le rouge (vers les plus hautes longueurs d'onde).

Ce type de spectroscopie, extrêmement performante pour la caractérisation structurelle de peptides [87, 90], a été initiée par Levy [91] et est utilisée avec succès par Rizzo [90, 92]. Le groupe de Rizzo s'est intéressé à la spectroscopie IR en phase gazeuse dans la région de l'amide A de deux polypeptides Ac-Phe-$(Ala)_5$-Lys-H^+ et Ac-Phe-$(Ala)_{10}$-Lys-H^+ pour étudier les caractéristiques associées à la structure en hélice (*Figure I.19*).

Après irradiation UV, le spectre de photofragmentation montre deux principaux conformères pour chaque espèce. Pour enregistrer le spectre IR d'une conformation particulière, ils ont fixé le laser UV sur la transition correspondante et ont introduit un laser IR en amont (100 ns avant). Lorsque les lasers IR et l'UV sont réglés sur les transitions d'un même conformère, on observe une déplétion dans le signal UV puisque lorsque l'IR est en résonance avec une transition vibrationnelle de l'ion, la population des états excités diminue. En enregistrant le signal de photofragmentation en fonction de la longueur d'onde IR, ils obtiennent ainsi un spectre IR spécifique en conformère.

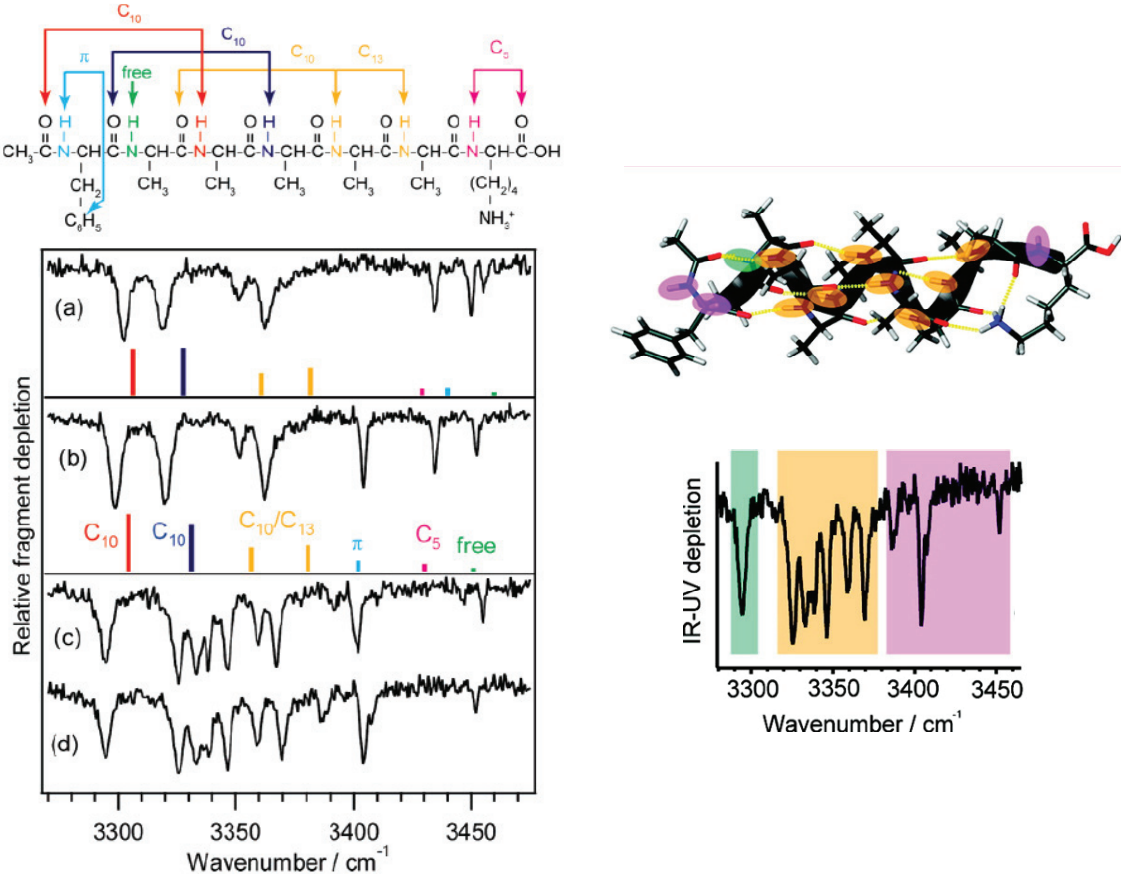


Figure I.19 A gauche : Spectres UV /IR des différents conformères dans la région d'élongation de la fonction NH (région amide A) : (a et b) Ac-Phe-(Ala)5-Lys-H+ et (c et d) Ac-Phe-(Ala)10-Lys-H+. A droite : attribution des bandes pour l'espèce Ac-Phe-(Ala)10-Lys-H+

En comparant les résultats expérimentaux (*Figure I.19* a et b) avec les calculs de fréquences harmoniques (B3LYP), ils ont ainsi pu assimiler la structure de ces deux conformères du peptide Ac-Phe-$(Ala)_5$-Lys-H^+ à une hélice 3_{10}. Les spectres de déplétion montrent que les différences entre les conformères se trouvent dans la région où les interactions sont faibles (plus basse longueur d'onde) qui sont principalement dues à l'orientation de la chaine latérale de la phénylalanine.

Les *Figure I.19* c et d montrent les spectres IR associés aux deux transitions UV de l'espèce Ac-Phe-$(Ala)_{10}$-Lys-H^+, de taille plus importante. La comparaison avec les spectres obtenus pour l'espèce Ac-Phe-$(Ala)_5$-Lys-H^+ permet d'assigner de nombreuses fonctions. Les transitions intenses entre 3320 et 3350 cm-1 n'apparaissent que pour l'espèce Ac-Phe-$(Ala)_{10}$-

Lys-H^+, ce qui suggère fortement que ces transitions peuvent être assimilées aux groupes N-H interne de l'hélice α.

Cette technique permet donc de fournir des informations sur l'environnement des groupements NH, et par conséquent, d'obtenir des informations sur la structure secondaire de petits peptides. Par contre, quand la taille du système augmente, la simple étude de la bande amide A n'est plus suffisante et l'analyse du spectre IR dans d'autres régions est alors nécessaire. En effet, la spectroscopie IR a également permis d'enregistrer des spectres de protéines entières dans le domaine 1400 – 1800 cm^{-1}. Par contre, l'interprétation des bandes obtenues est très complexe et n'est, à l'heure actuelle, pas encore réalisable. La *Figure I.20* illustre la complexité des spectres d'action infrarouge.

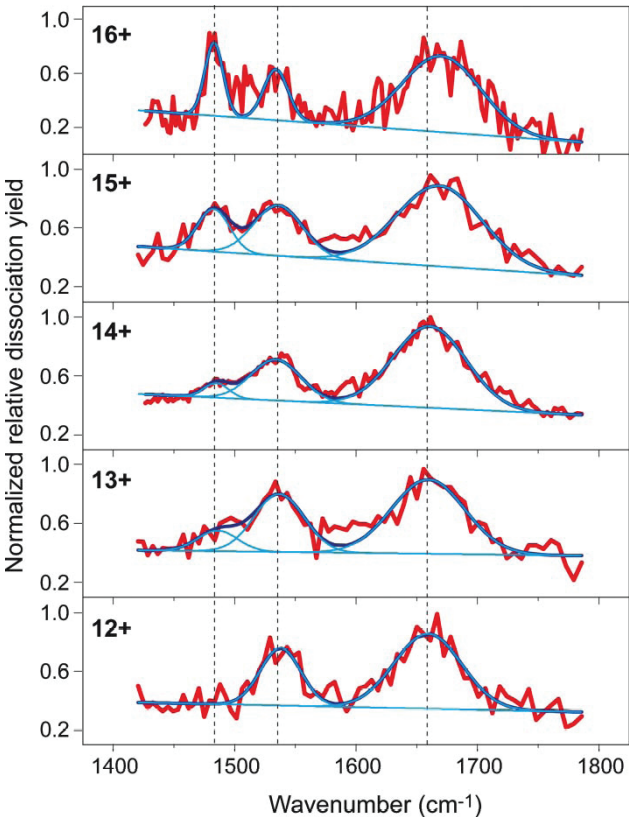


Figure I.20 Spectres IRMPD de différents états de charge (12+ à 16+) du cytochrome c montrant les variations des vibrations : amide I (1660 cm^{-1}), amide II (1535 cm^{-1}) et un mode de vibration non déterminé (1480 cm^{-1})[87, 93]

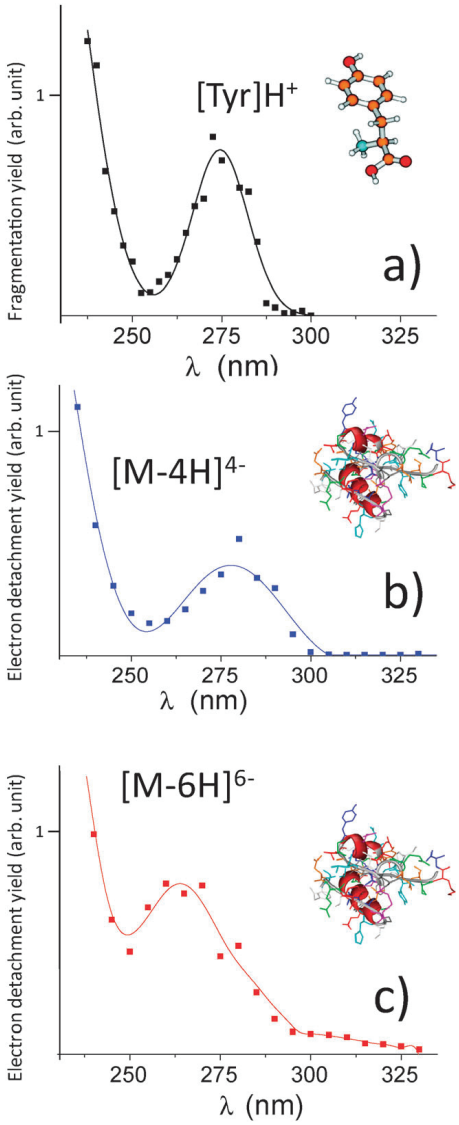
Rizzo proposa également une autre approche qui consiste à la coupler à la mobilité ionique pour permettre de séparer les isomères en amont de la spectroscopie optique [94]. Cette approche est également utilisée pour les expériences de spectroscopie de photoélectrons [95, 96] et sera détaillé dans le chapitre III [97].

1.5.2.2. SPECTROSCOPIE D'ACTION UV

Le domaine UV-Vis correspond à l'excitation électronique des chromophores naturels des protéines, en particulier quand la longueur d'onde est inférieure à 300 nm, zone où absorbent les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine).

Les voies de relaxation des peptides et protéines après absorption d'un photon UV-Vis dépendent fortement de la nature de la charge. Les peptides positivement chargés relaxent principalement par fragmentation des liaisons peptidiques tandis que le principal canal de fragmentation observé pour les polyanions est détachement d'électron. Ce canal est plus rapide que la conversion d'énergie interne suivi de sa redistribution sur l'ensemble des modes de vibration. Ceci est corrélé aux différences d'énergies d'ionisation entre les cations (> 8 eV) et les anions (2.5-3.5 eV) [98, 99].

En mode négatif, le détachement d'électron permet d'enregistrer des spectres d'action en phase gazeuse de larges systèmes comme des protéines entières. En effet, les chromophores des acides aminés sont sensibles à leur environnement et de ce fait, les transitions électroniques peuvent être utilisées pour obtenir des informations structurelles sur les ions biomoléculaires. Il est alors possible d'étudier les relations entre la conformation de la biomolécule, l'environnement et la structure électronique des chromophores ainsi que leurs interactions avec le solvant.



Une étude préalablement réalisée par L. Joly montre l'importance de la structure électronique des groupements aromatiques [100, 101]. Cette étude porte sur l'influence de l'état de charge sur le spectre optique de l'insuline, protéine de 51 acides aminés dont quatre résidus acides et quatre tyrosines. Les espèces $[M-4H]^{4-}$ et $[M-6H]^{6-}$ ont été comparées au spectre d'action de la tyrosine protonée $[Tyr+H]^{+}$ (*Figure I.21*).

Le décalage des bandes entre les différents états de charge de l'insuline s'expliquent par le fait que les chromophores ne sont pas tous dans le même état d'ionisation. Pour l'espèce $[M-4H]^{4-}$, la bande centrée aux alentours de 275 nm (comme pour l'espèce $[Tr+H]^{+}$) est principalement due aux excitations π du chromophore neutre de la tyrosine. Ces deux espèces n'absorbent pas après 300 nm.

Figure I.21 a) Le taux de photofragmentation de la tyrosine protonée $[Tyr+H]^{+}$ et les taux de photodétachement de l'insuline b)$[M-4H]^{4-}$ et c)$[M-6H]^{6-}$ en fonction de la longueur d'onde du laser.

L'espèce $[M-6H]^{6-}$ montre, quant à elle, une bande principale à 260 nm et une plus faible bande au-delà de 300 nm. Ces bandes reflètent la déprotonation d'une des quatre tyrosines. Ce phénomène avait déjà été observé en solution pour des protéines contenant des tyrosines [102, 103]. Ce décalage vers les hautes longueurs d'onde traduit la déstabilisation de l'orbitale moléculaire par la charge portée par l'oxygène du groupement indole. Cette déstabilisation provoque une diminution de l'écart d'énergie entre les orbitales HOMO-LUMO et une absorption alors possible à de plus basse énergie (> 300 nm) [100, 104, 105].

Nous venons de voir que le bathochromisme représente une signature de l'état d'ionisation de la tyrosine dans une protéine. Ces résultats démontrent également la faisabilité de la spectroscopie UV-Vis sur de gros systèmes isolés.

Une autre étude réalisée par B. Bellina montre l'importance de l'environnement des chromophores sur le spectre d'action [106, 107].

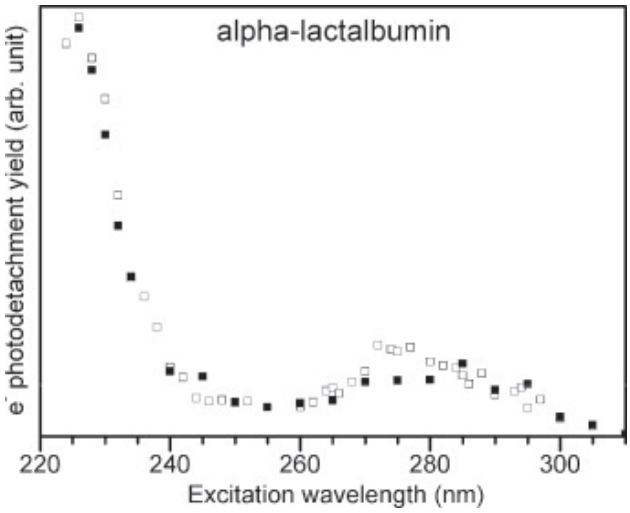


Figure I.22 Le taux de photodétachement de l'alpha-lactalbumine $[M-10H]^{10-}$ native (carrés blancs) et dénaturée (carrés noirs) en fonction de la longueur d'onde du laser.

B. Bellina a comparé les spectres de photodétachement de l'alpha-lactalbumine $[M-10H]^{10-}$ native et dénaturée (*Figure I.22*). Afin de réduire les 4 ponts disulfures contenus dans la protéine, l'alpha-lactalbumine a été dénaturée par du DTT (6 mM) et de la guanidine (3 mM).

La superposition des spectres de la forme native et dénaturée montre qu'ils sont assez similaires avec une bande à 230 et 280 nm. Par contre la région $\pi\pi^*$ (270 – 280 nm) a une réponse plus intense dans le cas de la protéine native. En effet, contrairement au groupement SH, les ponts disulfures sont optiquement actifs dans la région 240-280 nm [108]. Ceci explique l'augmentation du taux de photodétachement dans cette région, pour la protéine native qui contient 4 ponts disulfures. L'addition individuelle des absorbances de chaque chromophore dans le cas de la protéine native et dénaturée indique que les 4 ponts disulfures engendreraient une augmentation de 15% de la réponse optique, or ce n'est exactement pas le

cas ici. Ce résultat souligne l'importance de la conformation de la protéine pour la compréhension des spectres expérimentaux.

Durant mon travail de thèse, je me suis également intéressée à cette problématique. L'importance de la conformation de la protéine et de l'environnement de l'hème sur le spectre visible de la bande de Soret du cytochrome c sera développée dans le chapitre III.

Notons que les expériences de spectroscopie optique permettent également de tracer les rapports de branchement des différents ions fragments. Cette information supplémentaire permet d'étudier les mécanismes de fragmentation selon les longueurs d'onde d'excitation.

I.6. CONCLUSION

Ce premier chapitre donne une vision d'ensemble des différentes techniques de caractérisation couramment utilisées à ce jour. Il permet de mieux situer l'apport de l'interaction photon UV - ion comme outil de caractérisation structurelle et optique des protéines.

(i) L'irradiation UV de peptides et protéines peut servir comme outils de dissociation. L'a-EPD, basée sur la dissociation d'une espèce radicalaire formée par l'interaction entre la protéine et un photon UV, a été développé dans notre laboratoire à Lyon et permet d'obtenir des informations sur la structure primaire des protéines. Ces informations sont différentes et complémentaires de celles obtenues par les autres méthodes, en particulier par CID, technique de fragmentation installée en routine sur tous les spectromètres de masse.

(ii) L'irradiation UV de peptides et protéines permet également de mesurer l'action de la lumière sur la protéine et d'en tirer ainsi des spectres de photodétachement (EPD), permettant de relier la conformation de la biomolécule à l'environnement et la structure des chromophores, ainsi que leurs interactions avec le solvant.

Ces deux aspects ont été principalement étudiés pendant mon travail de thèse. Après une description des différents procédés expérimentaux, les chapitres suivant détailleront les résultats utilisant ces deux approches.

I.7. BIBLIOGRAPHIE

1. Pauling, L., R.B. Corey, and H.R. Branson, *The Structure of Proteins - 2 Hydrogen-Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1951. **37**(4): p. 205-211.
2. Pauling, L. and R.B. Corey, *Configurations of Polypeptide Chains with Favored Orientations around Single Bonds - 2 New Pleated Sheets.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1951. **37**(11): p. 729-740.
3. http://web.expasy.org/tagident/.
4. Edman, P., *Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides.* Acta Chemica Scandinavica, 1950. **4**(2): p. 283-293.
5. Niall, H.D., *Automated Edman degradation: the protein sequenator.* Methods in enzymology, 1973. **27**: p. 942-1010.
6. Biemann, K. and S.A. Martin, *Mass-Spectrometric Determination of the Amino-Acid-Sequence of Peptides and Proteins.* Mass Spectrometry Reviews, 1987. **6**(1): p. 1-75.
7. Biemann, K., *Nomenclature for Peptide Fragment Ions (Positive-Ions).* Methods in Enzymology, 1990. **193**: p. 886-887.
8. Bowie, J.H., C.S. Brinkworth, and S. Dua, *Collision-induced fragmentations of the (M-H)(-) parent anions of underivatized peptides: An aid to structure determination and some unusual negative ion cleavages.* Mass Spectrometry Reviews, 2002. **21**(2): p. 87-107.
9. Griffiths, W.J., et al., *Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry.* Biochemical Journal, 2001. **355**: p. 545-561.
10. Shukla, A.K. and J.H. Futrell, *Tandem mass spectrometry: dissociation of ions by collisional activation.* Journal of Mass Spectrometry, 2000. **35**(9): p. 1069-1090.
11. Massey, H.S.W., *Collisions between Atoms and Molecules at Ordinary Temperatures.* Reports on Progress in Physics, 1948. **12**: p. 248-269.
12. Biemann, K., *Sequencing of Peptides by Tandem Mass-Spectrometry and High-Energy Collision-Induced Dissociation.* Methods in Enzymology, 1990. **193**: p. 455-479.
13. Marcus, R.A. and O.K. Rice, *The Kinetics of the Recombination of Methyl Radicals and Iodine Atoms.* Journal of Physical and Colloid Chemistry, 1951. **55**(6): p. 894-908.
14. Marcus, R.A., *Unimolecular Dissociations and Free Radical Recombination Reactions.* Journal of Chemical Physics, 1952. **20**(3): p. 359-364.
15. Rosenstock, H.M., et al., *Absolute Rate Theory for Isolated Systems and the Mass Spectra of Polyatomic Molecules.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1952. **38**(8): p. 667-678.

16. Lorquet, J.C., *Unimolecular reaction dynamics from kinetic energy release distributions. 7. Average translational energy release.* Journal of Physical Chemistry A, 2000. **104**(23): p. 5422-5429.

17. Brodbelt, J.S. and J.J. Wilson, *Infrared Multiphoton Dissociation in Quadrupole Ion Traps.* Mass Spectrometry Reviews, 2009. **28**(3): p. 390-424.

18. Little, D.P., et al., *Infrared Multiphoton Dissociation of Large Multiply-Charged Ions for Biomolecule Sequencing.* Analytical Chemistry, 1994. **66**(18): p. 2809-2815.

19. Madsen, J.A. and J.S. Brodbelt, *Comparison of Infrared Multiphoton Dissociation and Collision-Induced Dissociation of Supercharged Peptides in Ion Traps.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2009. **20**(3): p. 349-358.

20. Dunbar, R.C., *BIRD (blackbody infrared radiative dissociation): Evolution, principles, and applications.* Mass Spectrometry Reviews, 2004. **23**(2): p. 127-158.

21. Price, W.D., P.D. Schnier, and E.R. Williams, *Tandem mass spectrometry of large biomolecule ions by blackbody infrared radiative dissociation.* Analytical Chemistry, 1996. **68**(5): p. 859-866.

22. Tsybin, Y.O., et al., *Combined infrared multiphoton dissociation and electron capture dissociation with a hollow electron beam in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2003. **17**(15): p. 1759-1768.

23. Hakansson, K., et al., *Combined electron capture and infrared multiphoton dissociation for multistage MS/MS in a Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer.* Analytical Chemistry, 2003. **75**(13): p. 3256-3262.

24. Zubarev, R.A., N.L. Kelleher, and F.W. McLafferty, *Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. A nonergodic process.* Journal of the American Chemical Society, 1998. **120**(13): p. 3265-3266.

25. Syka, J.E.P., et al., *Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(26): p. 9528-9533.

26. Coon, J.J., et al., *Electron transfer dissociation of peptide anions.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2005. **16**(6): p. 880-882.

27. Yoo, H.J., et al., *Negative-Ion Electron Capture Dissociation: Radical-Driven Fragmentation of Charge-Increased Gaseous Peptide Anions.* Journal of the American Chemical Society. **133**(42): p. 16790-16793.

28. Budnik, B.A., K.F. Haselmann, and R.A. Zubarev, *Electron detachment dissociation of peptide di-anions: an electron-hole recombination phenomenon.* Chemical Physics Letters, 2001. **342**(3-4): p. 299-302.

29. Kjeldsen, F., et al., *C-alpha-C backbone fragmentation dominates in electron detachment dissociation of gas-phase polypeptide polyanions.* Chemistry-a European Journal, 2005. **11**(6): p. 1803-1812.

30. Bowers, W.D., et al., *Fragmentation of Oligopeptide Ions Using Ultraviolet-Laser Radiation and Fourier-Transform Mass-Spectrometry.* Journal of the American Chemical Society, 1984. **106**(23): p. 7288-7289.

31. Reilly, J.P., *Ultraviolet Photofragmentation of Biomolecular Ions.* Mass Spectrometry Reviews, 2009. **28**(3): p. 425-447.

32. Madsen, J.A., D.R. Boutz, and J.S. Brodbelt, *Ultrafast Ultraviolet Photodissociation at 193 nm and its Applicability to Proteomic Workflows.* Journal of Proteome Research, 2010. **9**(8): p. 4205-4214.

33. Ly, T. and R.R. Julian, *Ultraviolet Photodissociation: Developments towards Applications for Mass-Spectrometry-Based Proteomics.* Angewandte Chemie-International Edition, 2009. **48**(39): p. 7130-7137.

34. Antoine, R., et al., *Photo-induced formation of radical anion peptides. Electron photodetachment dissociation experiments.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007. **21**(2): p. 265-268.

35. Larraillet, V., et al., *Activated-Electron Photodetachment Dissociation for the Structural Characterization of Protein Polyanions.* Analytical Chemistry, 2009. **81**(20): p. 8410-8416.

36. Gabelica, V., et al., *Electron photodetachment dissociation of DNA polyanions in a quadrupole ion trap mass spectrometer.* Analytical Chemistry, 2006. **78**(18): p. 6564-6572.

37. Neff, D. and J. Simons, *Analytical and Computational Studies of Intramolecular Electron Transfer Pertinent to Electron Transfer and Electron Capture Dissociation Mass Spectrometry.* Journal of Physical Chemistry A. **114**(3): p. 1309-1323.

38. Zubarev, R.A., *Reactions of polypeptide ions with electrons in the gas phase.* Mass Spectrometry Reviews, 2003. **22**(1): p. 57-77.

39. McAlister, G.C., et al., *Analysis of the Acidic Proteome with Negative Electron-Transfer Dissociation Mass Spectrometry.* Analytical Chemistry, 2012. **84**(6): p. 2875-2882.

40. Kjeldsen, F., et al., *Dissociative capture of hot (3-13 eV) electrons by polypeptide polycations: an efficient process accompanied by secondary fragmentation.* Chemical Physics Letters, 2002. **356**(3-4): p. 201-206.

41. Fung, Y.M.E., C.M. Adams, and R.A. Zubarev, *Electron Ionization Dissociation of Singly and Multiply Charged Peptides.* Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(29): p. 9977-9985.

42. Nielsen, M.L., et al., *Tandem MALDI/El ionization for tandem Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of polypeptides.* International Journal of Mass Spectrometry, 2003. **226**(1): p. 181-187.

43. Nielsen, M.L., et al., *Intramolecular hydrogen atom transfer in hydrogen-deficient polypeptide radical cations.* Chemical Physics Letters, 2000. **330**(5-6): p. 558-562.

44. Oh, J.Y., J.H. Moon, and M.S. Kim, *Sequence- and site-specific photodissocniation at 266nm of protonated synthetic polypeptides containing a tryptophanyl residue.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2004. **18**(22): p. 2706-2712.

45. Gabryelski, W. and L. Li, *Photo-induced dissociation of electrospray generated ions in an ion trap/time-of-flight mass spectrometer.* Review of Scientific Instruments, 1999. **70**(11): p. 4192-4199.

46. Wilson, J.J. and J.S. Brodbelt, *MS/MS simplification by 355 nm ultraviolet photodissociation of chromophore-derivatized peptides in 4-3 quadrupole ion trap.* Analytical Chemistry, 2007. **79**(20): p. 7883-7892.

47. Joly, L., et al., *Specific UV photodissociation of tyrosyl-containing peptides in multistage mass spectrometry.* Journal of Mass Spectrometry, 2007. **42**(6): p. 818-824.

48. Tabarin, T., et al., *Specific photodissociation of peptides with multi-stage mass spectrometry.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005. **19**(20): p. 2883-2892.

49. Morgan, J.W. and D.H. Russell, *Comparative studies of 193-nm photodissociation and TOF-TOFMS analysis of bradykinin analogues: The effects of charge site(s) and fragmentation timescales.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2006. **17**(5): p. 721-729.

50. Williams, E.R., J.J.P. Furlong, and F.W. McLafferty, *Efficiency of Collisionally-Activated Dissociation and 193-Nm Photodissociation of Peptide Ions in Fourier-Transform Mass-Spectrometry.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1990. **1**(4): p. 288-294.

51. Fung, Y.M.E., et al., *Facile disulfide bond cleavage in gaseous peptide and protein cations by ultraviolet photodissociation at 157 nm.* Angewandte Chemie-International Edition, 2005. **44**(39): p. 6399-6403.

52. Thompson, M.S., W. Cui, and J.P. Reilly, *Factors that impact the nacuum ultraviolet photofragmentation of peptide ions.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2007. **18**(8): p. 1439-1452.

53. Brunet, C., et al., *Gas phase Photo-Formation and Vacuum UV Photofragmentation Spectroscopy of Tryptophan and Tyrosine Radical-Containing Peptides.* Journal of Physical Chemistry A, 2011. **115**(32): p. 8933-8939.

54. Brunet, C., et al., *Formation and Fragmentation of Radical Peptide Anions: Insights from Vacuum Ultra Violet Spectroscopy.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2012. **23**(2): p. 274-281.

55. Silivra, O.A., F. Kjeldsen, and R.A. Zubarev, *In Realization of 157 nm UV Photodissociation in a Linear Ion Trap.* 53rd ASMS Conference on Mass Spectrometry, San Antonio, TX, 2005.

56. Schermann, J.P., *Spectroscopy and modelling of biomolocular building blocks.* Amsterdam : Elsevier, 2008.

57. Falconer, R.J., *Terahertz spectroscopy's application to protein chemistry.* Spectroscopy Europe, 2012. **24**(2): p. 12-14.

58. Creighton, T.E., *Proteins, Structures and Molecular Properties.* 1993. **2nd ed.**: p. 15.

59. Latypov, R.F., et al., *Structural characterization of an equilibrium unfolding intermediate in cytochrome c.* Journal of Molecular Biology, 2006. **357**(3): p. 1009-1025.

60. Hu, S.Z., et al., *Complete Assignment of Cytochrome-C Resonance Raman-Spectra Via Enzymatic Reconstitution with Isotopically Labeled Hemes.* Journal of the American Chemical Society, 1993. **115**(26): p. 12446-12458.

61. Negrerie, M., et al., *Ultrafast heme dynamics in ferrous versus ferric cytochrome c studied by time-resolved resonance Raman and transient absorption spectroscopy.* Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(25): p. 12766-12781.

62. Reynolds, M.F., et al., *Electronic absorption, EPR, and resonance raman spectroscopy of CooA, a CO-sensing transcription activator from R-rubrum, reveals a five-coordinate NO-heme.* Biochemistry, 2000. **39**(2): p. 388-396.

63. Andrade, A.A., et al., *Two-photon absorption investigation in reduced and oxidized cytochrome c solutions.* Chemical Physics Letters, 2004. **390**(4-6): p. 506-510.

64. Aubert, C., et al., *Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase.* Nature, 2000. **405**(6786): p. 586-590.

65. Van Der Meer, B.W., Coker, G. III, Simon Chen, S.-Y., *Resonance Energy Transfer: Theory and Data.* (New York: VCH Publishers, Inc., 1994.

66. Cantor CR., S.P., *Biophysical chemistry.* Edition W.H. Freeman and compagny, 1980.

67. Albani, J.R., *Absorption et fluorescence,.* Edition Tec Doc Lavoisier, 2001.

68. Vivian, J.T. and P.R. Callis, *Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins.* Biophysical Journal, 2001. **80**(5): p. 2093-2109.

69. Callis, P.R. and J.T. Vivian, *Understanding the variable fluorescence quantum yield of tryptophan in proteins using QM-MM simulations. Quenching by charge transfer to the peptide backbone.* Chemical Physics Letters, 2003. **369**(3-4): p. 409-414.

70. Sreerama, N., Woody, R. W., *Circular dichroism of peptides and proteins, In: Circular Dichroism: Principles and Applications.* R. W. Woody (ed.), Wiley-VCH, New York, 2000: p. 601-620.

71. Kelly, S.M. and N.C. Price, *The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function.* Current Protein & Peptide Science, 2000. **1**(4): p. 349-384.

72. Kelly, S.M., T.J. Jess, and N.C. Price, *How to study proteins by circular dichroism.* Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2005. **1751**(2): p. 119-139.

73. Wallace, B.A. and R.W. Janes, *Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins: secondary structure, fold recognition and structural genomics.* Current Opinion in Chemical Biology, 2001. **5**(5): p. 567-571.

74. Susi, H. and D.M. Byler, *Resolution-Enhanced Fourier-Transform Infrared-Spectroscopy of Enzymes.* Methods in Enzymology, 1986. **130**: p. 290-311.

75. Keresztury, G., *Handbook of Vibrational Spectroscopy,.* John Wiley & Sons, Ldt, Chichester, West Sussex, Englang, 2001.

76. Tuma, R., *Raman spectroscopy of proteins: from peptides to large assemblies.* Journal of Raman Spectroscopy, 2005. **36**(4): p. 307-319.

77. Maiti, N.C., et al., *Raman spectroscopic characterization of secondary structure in natively unfolded proteins: alpha-synuclein.* Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(8): p. 2399-2408.

78. Oh, H., et al., *Secondary and tertiary structures of gaseous protein ions characterized by electron capture dissociation mass spectrometry and photofragment spectroscopy.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(25): p. 15863-15868.

79. Dunbar, R.C., *Photodissociation of trapped ions.* International Journal of Mass Spectrometry, 2000. **200**(1-3): p. 571-589.

80. Khoury, J.T., S.E. Rodriguez-Cruz, and J.H. Parks, *Pulsed fluorescence measurements of trapped molecular ions with zero background detection.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2002. **13**(6): p. 696-708.

81. Chingin, K., et al., *Exploring Fluorescence and Fragmentation of Ions Produced by Electrospray Ionization in Ultrahigh Vacuum.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2009. **20**(9): p. 1731-1738.

82. Bian, Q., et al., *Gas-phase fluorescence excitation and emission spectroscopy of mass-selected trapped molecular ions.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2010. **12**(11): p. 2590-2598.

83. Talbot, F.O., et al., *Fluorescence Resonance Energy Transfer in Gaseous, Mass-Selected Polyproline Peptides.* Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(45): p. 16156-16164.

84. Dashtiev, M., et al., *Clear evidence of fluorescence resonance energy transfer in gas-phase ions.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2005. **16**(9): p. 1481-1487.

85. Iavarone, A.T., et al., *Fluorescence probe of polypeptide conformational dynamics in gas phase and in solution.* International Journal of Mass Spectrometry, 2006. **253**(3): p. 172-180.

86. Talbot, F.O., et al., *Fluorescence Resonance Energy Transfer in Gaseous, Mass-Selected Polyproline Peptides.* Journal of the American Chemical Society. **132**(45): p. 16156-16164.

87. Polfer, N.C. and J. Oomens, *Vibrational Spectroscopy of Bare and Solvated Ionic Complexes of Biological Relevance.* Mass Spectrometry Reviews, 2009. **28**(3): p. 468-494.

88. Ortega, J.M., et al., *Activities of the CLIO infrared facility.* Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section a-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment, 1996. **375**(1-3): p. 618-625.

89. Barth, A. and C. Zscherp, *What vibrations tell us about proteins.* Quarterly Reviews of Biophysics, 2002. **35**(4): p. 369-430.

90. Rizzo, T.R., J.A. Stearns, and O.V. Boyarkin, *Spectroscopic studies of cold, gas-phase biomolecular ions.* International Reviews in Physical Chemistry, 2009. **28**(3): p. 481-515.

91. Levy, F., *Energy-Distribution in the Beam of an Infrared Microscope.* Analytical Chemistry, 1988. **60**(15): p. 1623-1624.

92. Stearns, J.A., O.V. Boyarkin, and T.R. Rizzo, *Spectroscopic signatures of gas-phase helices: Ac-Phe-(Ala)(5)-Lys-H+ and Ac-Phe-(Ala)(10)-Lys-H+.* Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(45): p. 13820-+.

93. Oomens, J., et al., *Charge-state resolved mid-infrared spectroscopy of a gas-phase protein.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2005. **7**(7): p. 1345-1348.

94. Papadopoulos, G., et al., *Conformational Distribution of Bradykinin [bk+2 H]2+ Revealed by Cold Ion Spectroscopy Coupled with FAIMS.* American Society for Mass Spectrometry, 2012. **ASAP**.

95. Vonderach, M., et al., *Probing electrostatic interactions and structural changes in highly charged protein polyanions by conformer-selective photoelectron spectroscopy.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2011. **13**(34): p. 15554-15558.

96. Vonderach, M., et al., *Combining Ion Mobility Spectrometry, Mass Spectrometry, and Photoelectron Spectroscopy in a High-Transmission Instrument.* Analytical Chemistry. **83**(3): p. 1108-1115.

97. Joly, L., et al., *Optical and Structural Properties of Copper-Oxytocin Dications in the Gas Phase.* Journal of Physical Chemistry B, 2009. **113**(32): p. 11293-11300.

98. Marzluff, E.M., et al., *Collisional Activation of Large Molecules Is an Efficient Process.* Journal of the American Chemical Society, 1994. **116**(15): p. 6947-6948.

99. Paizs, B. and S. Suhai, *Fragmentation pathways of protonated peptides.* Mass Spectrometry Reviews, 2005. **24**(4): p. 508-548.

100. Joly, L., et al., *Ultraviolet spectroscopy of peptide and protein polyanions in vacuo: Signature of the ionization state of tyrosine.* Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(27): p. 8428-+.

101. Joly, L., *Couplage spectroscopique / spectrométrie de masse : Propriétés optiques et photofragmentation de biomolécules*, in *Physique*. 2009, Université Lyon 1: Lyon.

102. Wetlaufer, D.B., J.T. Edsall, and B.R. Hollingworth, *Ultraviolet Difference Spectra of Tyrosine Groups in Proteins and Amino Acids.* Journal of Biological Chemistry, 1958. **233**(6): p. 1421-1428.

103. Wetlaufer, D.B., *Ultraviolet Spectra of Proteins and Amino Acids.* Advances in Protein Chemistry, 1962. **17**: p. 303-390.

104. Seyedsayamdost, M.R., et al., *Mono-, di-, tri-, and tetra-substituted fluorotyrosines: New probes for enzymes that use tyrosyl radicals in catalysis.* Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(5): p. 1569-1579.

105. Pross, A., L. Radom, and R.W. Taft, *Theoretical Approach to Substituent Effects - Phenols and Phenoxide Ions.* Journal of Organic Chemistry, 1980. **45**(5): p. 818-826.

106. Bellina, B., et al., *UV spectroscopy of entire proteins in the gas phase.* International Journal of Mass Spectrometry. **297**(1-3): p. 36-40.

107. Bellina, B., in *Physique*. 2012: Lyon.

108. Johnson, E.A., *UV Atlas of Organic Compounds.* Butterworths and Weinheim, London, 1971.

CHAPITRE II

PROCEDES EXPERIMENTAUX

II.1. Introduction 63
II.2. ESI, une source commune 64
II.2.1. Principe 64
II.2.1.1. La production de gouttelettes chargées 64
II.2.1.2. Evaporation des gouttelettes chargées 65
II.2.1.3. Formation des ions en phase gazeuse. 66
II.3. La spectroscopie d'action par photodétachement d'électron 68
II.3.1. Principe général 68
II.3.1.1. Conditions et paramètres typiques de la source ESI et du système de guidage 70
II.3.1.2. Le piège linéaire (Thermo) 71
i. L'analyseur quadripolaire : Principe et fonctionnement 71
ii. Activation des ions 75
iii. Caractéristiques de la trappe utilisée 76
II.3.2. Couplage LTQ-Laser UV-Vis 76
II.3.2.1. Source de lumière : OPO, Continuum 78
II.3.2.2. Spectroscopie d'action, principe et fonctionnement 80
II.3.2.3. Types de mesures (EPD, activated-EPD) 81
II.3.3. Couplage LTQ-SR (Synchrotron Radiation) 82
II.3.3.1. Sources de lumière 83
i. Le rayonnement du synchrotron 83
ii. Brillant B, Quantel 86
II.3.3.2. Types de mesures 86
II.4. Expériences de dissociation par détachement d'électron 87
II.4.1. FTICR : La résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier [27] : Principe et fonctionnement 87
II.4.2. Couplage avec une cathode chauffante comme source d'électron 89
II.4.3. Types de mesures 90
II.5. Spectroscopie de photoélectrons résolue en conformation [29] 90
II.5.1. La mobilité ionique 91
II.5.2. PES principe 92
II.5.3. Couplage IMS/PES 93
II.5.4. Types de mesures (PES) 95
II.6. Conclusion 95
II.7. Bibliographie 96

II.1. INTRODUCTION

Le couplage spectroscopie laser – spectrométrie de masse fut développé dans notre équipe en 2004 par F. Talbot (alors post-doc dans le groupe) [1] et a constitué le travail de thèse de T. Tabarin [2]. Ce montage a ensuite été utilisé par L. Joly [3] pour l'étude des peptides et des protéines initiant ainsi la spectroscopie par photodétachement d'électron et les premières expériences de dissociation par photodétachement d'électron (a-EPD). Ces travaux antérieurs ont essentiellement été réalisés sur un spectromètre de masse LCQ (Thermo) de type piège de Paul.

Pour ce mémoire de thèse, les expériences de spectroscopie optique et de dissociation par photodétachement d'électron (a-EPD) ont été réalisées sur un spectromètre de masse de type piège à ions linéaire (LTQ) couplé à un laser accordable en longueur d'onde. Le LTQ possède une résolution d'environ 30 000, bien supérieure à celle du LCQ (~ 5 000), et permet ainsi de mieux explorer les aspects d'a-EPD sur les peptides et les protéines. Par contre, l'implémentation d'un laser sur ce type de spectromètre de masse est plus difficile qu'avec un piège de Paul.

Le photodétachement d'électron sur peptides et protéines suite à l'irradiation UV suscite de nombreuses interrogations quant aux processus mis en jeu mais également sur son intérêt comme technique de fragmentation ou encore sur son exploration dans le domaine VUV. C'est pourquoi durant mon travail de thèse, j'ai été amenée à participer à de nombreuses collaborations enrichissantes autour de ces problématiques. Les expériences d'EDD, visant à comparer cette technique de fragmentation à l'a-EPD, ont été réalisées sur un FTICR 7T chez Thermo à Brême. Les expériences dans le VUV, qui permettent d'élargir la gamme de longueur d'onde pour les études de spectroscopie d'électron, ont été réalisées à SOLEIL, au synchrotron de Paris. Enfin, les expériences de spectroscopie de photoélectron résolue en conformères pour analyser les propriétés de l'électron éjecté, ont été réalisées à Karlsruhe, cher M. Kappes.
Ce chapitre décrit en détail le montage expérimental développé à Lyon ainsi que les différents couplages utilisés lors de nos collaborations.

II.2. ESI, UNE SOURCE COMMUNE

Durant mon travail de thèse et quelque soit le montage expérimental utilisé, la source d'ions en amont du spectromètre de masse est une source de type électrospray, soit commercialisée par Thermo (Lyon, Lausanne, SOLEIL) soit développée en laboratoire (Karlsruhe).

Proposée par M. Dole [4] et développée par J.B. Fenn en 1984 [5, 6], cette technique d'ionisation douce était au début dédiée à l'analyse de protéines. Très rapidement son utilisation a été élargie aux polymères, aux petites molécules… Et en quelques années, elle devient la technique d'ionisation la plus répandue. Cette source présente l'avantage de pouvoir atteindre des sensibilités élevées et permet un couplage aisé entre un spectromètre de masse et différents appareils de séparation d'analytes, tels que l'électrophorèse capillaire, la chromatographie liquide ou la mobilité ionique.

De plus, cette technique permet de faire passer des molécules en phase gazeuse sans les fragmenter ou sans même rompre les liaisons non covalentes telles que les liaisons hydrogènes responsables de l'organisation spatiale et de l'appariement. Ceci explique son grand domaine d'application, allant de la petite molécule organique jusqu'aux complexes protéiques [7] ou encore aux nanoparticules [8] voir aux virus entiers [9]

II.2.1. PRINCIPE

Le composé doit premièrement être dissout dans un solvant approprié avant de pouvoir être injecté dans la source par l'intermédiaire d'un fin capillaire de silice métallisé en surface (~100µm de diamètre), à débit constant (quelques $\mu l.min^{-1}$). L'ionisation se fait à pression atmosphérique en appliquant un champ électrique sur l'échantillon liquide. Le processus peut se scinder en trois étapes principales : il s'agit de former des gouttelettes chargées puis de les désolvater et les réduire pour enfin former les ions en phase gazeuse.

II.2.1.1 PRODUCTION DE GOUTTELETTES CHARGEES

La production de gouttelettes chargées est due à l'application d'une différence de potentiel de quelques kV entre le capillaire et la contre-électrode (*Figure II.1*). Ce champ électrique très

intense appliqué à la pointe du capillaire (de l'ordre de 10^6 V/m) provoque une accumulation de charges à la surface du liquide. Lorsque la force exercée par répulsion de charges devient plus importante que la tension de surface du fluide, la goutte naissante va se déformer pour optimiser sa surface, donnant naissance au cône de Taylor [10]. Ainsi la surface se rompt et de fines gouttelettes fortement chargées apparaissent. La source est ainsi assimilée à une cellule électrolytique [11].

La production de gouttelettes chargées est réalisable si le champ électrique E_0 vaut :

$$E_0 = \left(\frac{2\gamma \cos\theta_0}{\varepsilon_0 r_{ci}} \right)^{1/2}$$

γ, la tension de surface du liquide

ε_0, la permittivité électrique du vide,

θ_0, le demi-angle du liquide formant le cône de Taylor,

r_{ci}, le rayon interne du capillaire.

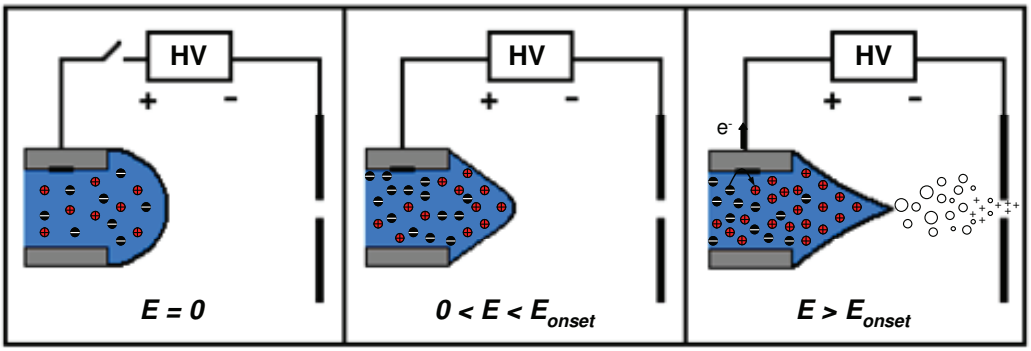


Figure II.1 Principe de formation du cône de Taylor [12]

La formation des gouttelettes chargées dépend donc des propriétés de la solution (tension de surface, conductivité…) et des paramètres instrumentaux (tension électrique appliquée, diamètre du capillaire…)

II.2.1.2. EVAPORATION DES GOUTTELETTES CHARGEES

Ces gouttelettes migrent en traversant simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression pour passer de la partie electrospray à pression atmosphérique (760 Torr)

vers l'entrée de l'analyseur à pression de l'ordre du Torr. Sous l'effet du chauffage (~250°C) et d'un gaz séchant (N_2), la taille des gouttelettes, initialement de quelques µm de diamètre, diminue par évaporation. Lorsque les répulsions électrostatiques aux sein des gouttelettes atteignent le niveau des tensions superficielles, la limite de stabilité de Rayleigh est atteinte [12]. Les gouttelettes de charge Q explosent en libérant des microgouttelettes de tailles variables (*Figure II.2*). Ce phénomène apparaît lorsque le rayon de la gouttelette atteint le rayon limite de Rayleigh, R_R, défini selon :

$$Q = 8\pi\left(\varepsilon_0\, \gamma R_R^3\right)^{1/2} \qquad (1)$$

La fission ne génère pas deux gouttelettes identiques mais provoque l'émission d'un courant de petites gouttelettes de masse équivalente à 0.1% de la masse de la gouttelette parent et de charge égale à 1% de la gouttelette mère [13, 14]. Le temps nécessaire pour que la gouttelette mère se fissionne en gouttelette fille, qui est lié à la vitesse d'évaporation du solvant et à sa température, détermine la sensibilité de la technique.

II.2.1.3. LIBERATION DES IONS EN PHASE GAZEUSE.

Un mécanisme ultime de formation des ions désolvatés en phase gazeuse à partir de gouttelettes nanométriques fait encore débat. Le modèle de la charge résiduelle (CRM) a été proposé par Dole [4, 15]. Une succession d' « évaporation-fission » se poursuivrait jusqu'à l'obtention d'un ion complètement désolvaté. Un autre modèle est le modèle d'évaporation des ions (IEM) qui a été introduit par Iribane et Thomson en 1976 [16, 17]. Comme celle de Dole, la théorie d'évaporation d'ions repose sur une succession initiale de fissions de type coulombiennes qui réduirait la taille des gouttelettes en augmentant leur densité de charge. Lorsque les gouttelettes atteignent un rayon suffisamment petit et une densité de charge très élevée (R = 8-10 nm et Q ~ 10^{-17} C), le champ électrostatique à leur surface est assez intense pour expulser directement les ions en phase gazeuse. Ce principe suggère que la charge requise en surface de la gouttelette pour provoquer l'évaporation des ions est alors plus faible que celle nécessaire à l'explosion coulombienne.

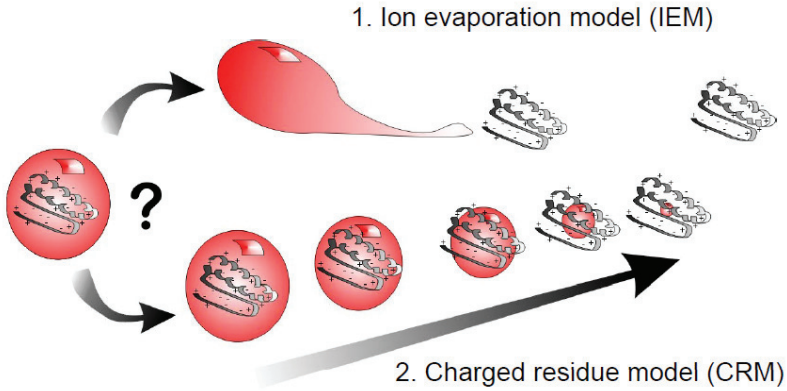


Figure II.2 Emission des ions en phase gazeuse selon le modèle 1) IEM et 2) CRM

La vitesse d'émission des ions à partir de la gouttelette dépendrait du rayon R et de la charge Q de la gouttelette mais également des propriétés chimiques et physiques des ions [16, 17].
Il semblerait actuellement que le modèle de Dole soit utilisé pour expliquer le processus d'ionisation de macromolécules telles que les protéines [18] et le modèle d'Iribrane celui des molécules de petites tailles telles que les agrégats de sel [19].

Les ions ainsi produits peuvent être porteurs d'un grand nombre de charges s'ils possèdent plusieurs sites ionisables. Les spectres ESI obtenus en mode positif (négatif) présentent en général un ensemble de pics correspondant aux ions multichargés de type $[M+nH]^{n+}$ ($[M-nH]^{n-}$) où M correspond à la masse moléculaire, et n au nombre de charges portées par la molécule ionisée. Il est important de noter que la technique d'électrospray est applicable à des molécules ne possédant aucun site ionisable par protonation (ou déprotonation) grâce à la formation d'adduits. Les particules chargées ainsi produites sont transférées vers l'analyseur. Les molécules non chargées (neutres) sont éliminées.

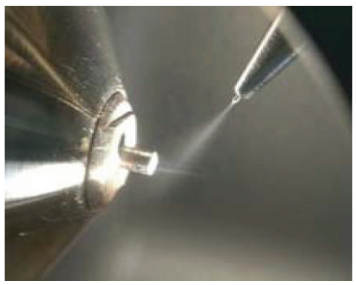
.

Figure II.3 Photographie d'une source électrospray (Thermo)

II.3. LA SPECTROSCOPIE D'ACTION PAR PHOTODETACHEMENT D'ELECTRON

II.3.1. PRINCIPE GENERAL

Les expériences de photodétachement d'électron ont été réalisées au sein de notre laboratoire sur un piège à ions linéaire LTQ (Linear Trap Quadrupole, Thermo Electron, San Jose, CA, USA) qui comporte trois grandes parties : la source d'ionisation, l'analyseur et le détecteur.

Les ions issus de la source électrospray sont injectés puis piégés. L'étape d'isolation consiste à ne garder dans le piège que les anions d'intérêt (ayant un rapport *m/z* donné). Dans l'étape d'activation, le laser est injecté au sein du piège linéaire. Les anions stockés sont alors excités et une espèce oxydée est ainsi formée par détachement d'électron. L'espèce radicalaire est ensuite analysée en masse lors de l'étape d'éjection.

Il est également possible d'effectuer des expériences de dissociation multi-étapes (expériences MS^n) en recommençant le cycle isolation-activation-détection avec une des espèces obtenues lors d'un premier cycle de dissociation. Il est ainsi possible d'effectuer des expériences hybrides en couplant l'activation par laser (photodétachement d'électron : EPD) et activation par collision (CID) au sein de la cellule de collision. Des expériences hybrides peuvent être réalisées grâce à la synchronisation laser-piège.

Le schéma général des expériences de photodétachement d'électron est illustré dans la *Figure II.4.*

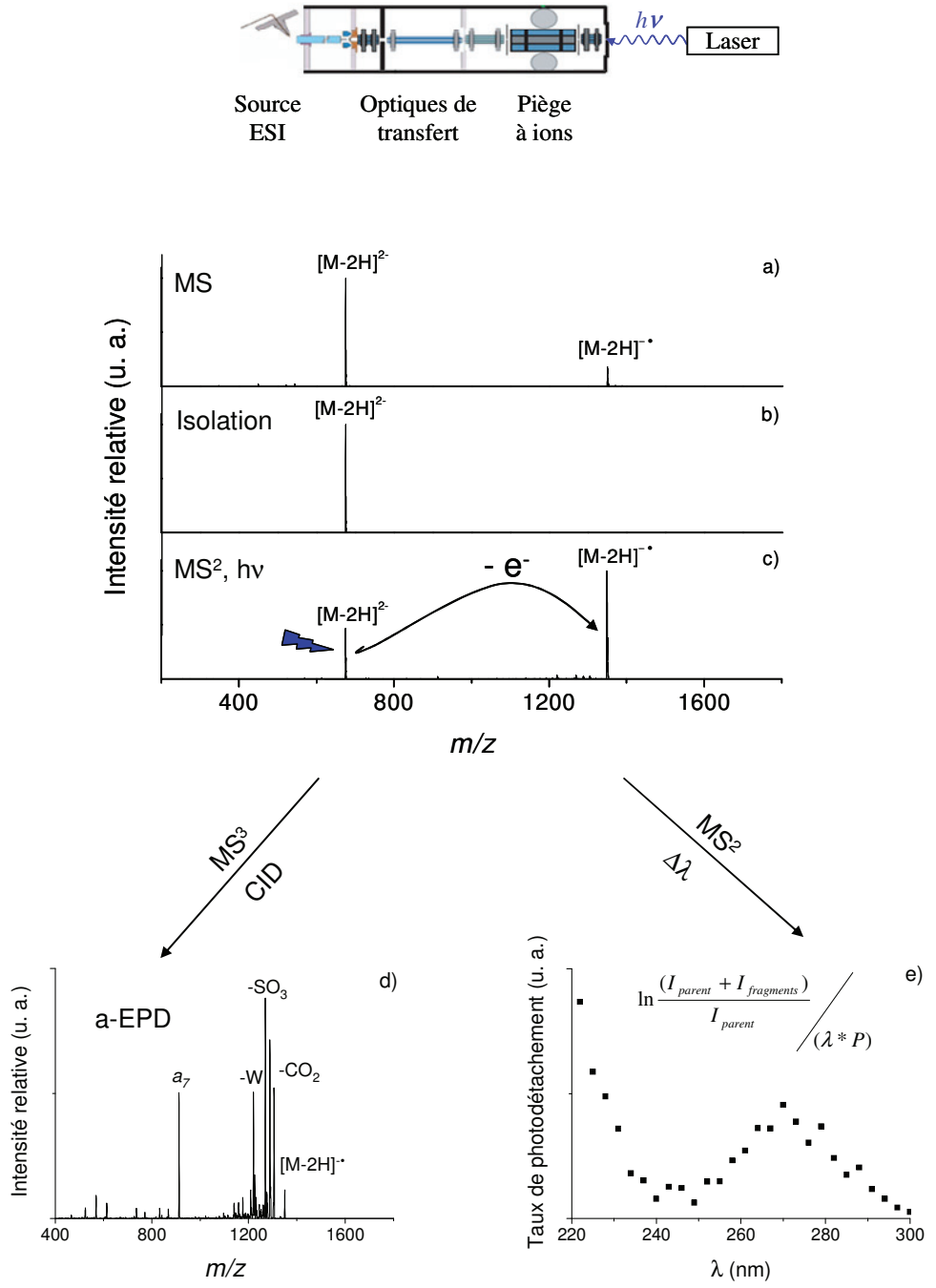


Figure II.4 Schéma général des expériences de photodétachement d'électron. a) Spectre de masse MS, b) isolation d'une espèce multichargée, c) formation d'une espèce radicalaire par irradiation du polyanion par un laser accordable en longueur d'onde MS², d) spectre de fragmentation a-EPD obtenu par dissociation CID de l'espèce radicalaire, e) taux de photodétachement du polyanions en fonction de la longueur d'onde du laser MS²

II.3.1.1. CONDITIONS ET PARAMETRES TYPIQUES DE LA SOURCE ESI ET DU SYSTEME DE GUIDAGE

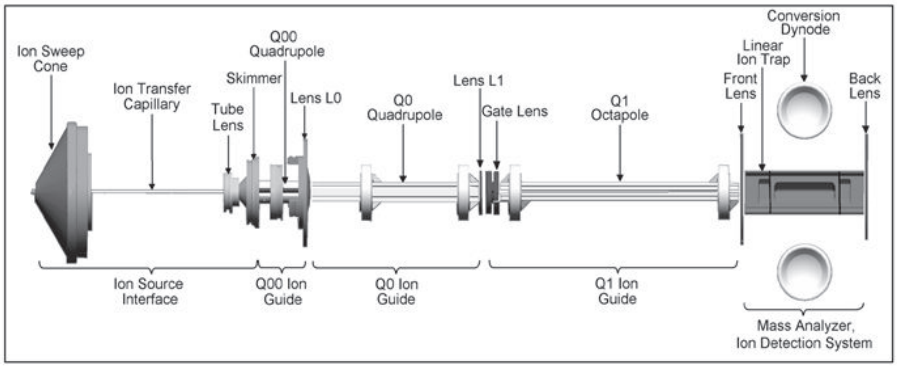


Figure II.5 L'analyseur LTQ est composé d'un piège à ion linéaire et de deux lentilles positionnées de part et d'autre du piège

Les ions préalablement formés en electrospray sont injectés dans le piège grâce aux optiques de guidage des ions composées de deux quadripôles et d'un octapôle. La lentille d'entrée permet de contrôler la quantité et l'énergie des ions entrant dans le piège.
Un système de pompage et des chambres intermédiaires permettent de passer graduellement d'une pression atmosphérique au niveau de la source à un vide plus poussé au niveau des détecteurs (~10^{-5} Torr). Au niveau du piège, la pression d'hélium (quelques mTorr) est importante. Ce gaz est utilisé comme gaz de collision (en CID) mais également pour focaliser les ions au centre du piège. En effet, les collisions avec l'hélium réduisent l'énergie cinétique des ions par thermalisation et permettent ainsi de les refocaliser.

L'intensité du signal ainsi que la distribution des états de charges d'une protéine sont directement influencées par les conditions opératoires de la source electrospray et par la qualité du transfert des ions en phase gazeuse. Ces paramètres seront à adapter en fonction de la solution infusée. En effet, plusieurs paramètres de la solution influent sur la qualité du spray. Par exemple, l'utilisation d'un solvant possédant une tension de surface importante implique une augmentation de la tension à appliquer pour former le cône de Taylor. La viscosité du solvant influe également sur la taille des gouttelettes formées et les solvants les plus polaires stabilisent les charges élevées.
Ainsi un pourcentage élevé en solvant organique tel que le méthanol (voir l'acétonitrile) permet d'obtenir un spray généralement stable.

Dans le tableau ci-dessous sont données des valeurs indicatives des différents paramètres de source et des optiques de transfert à appliquer lors de l'analyse de protéines polyanioniques (mode négatif).

Source	Typical values
Source voltage (kV)	~ 3.5
Source current (µA)	~ 3
Sheat gas flow rate	~ 20
Aux gas flow rate	~ 5
Sweep gas flow rate	~ 5
Capillary temperature (C)	~ 275
Capillary volatge (V)	~ -45
Tube lens voltage (V)	~ -250

Ion Optics	Typical values
Multipole 00 Offset (V)	~ 3
Lens 0 (V)	~ 7
Multipole 00 Offset (V)	~ 6
Lens 1 (V)	~ 9
Gate lens (V)	~ 35
Multipole 1 Offset (V)	~ 7
Multipole RF amplitude	~ 406
Front lens (V)	~ 6
Front section (V)	~ 9
Center section (V)	~ 12
Back section (V)	~ 7
Back lens (V)	~ 0.1

Tableau II.1 Valeurs type des différents paramètres de la source ESI et de l'optique de guidage des ions (exemple des paramètres utilisés pour l'analyse du cytochrome c $[M-6H]^{6-}$) . Ces valeurs sont données à titre indicatif et peuvent être soumises à des modifications selon les protéines étudiées.

Les solutions infusées dans le spectromètre de masse sont issues de la dilution de peptides et de protéines sous forme de poudre dans un mélange de solvant type MeOH/H_2O ou ACN/H_2O) à une concentration finale variant entre 5 et 50 µM. L'ajout d'une base (ammoniaque, pipéridine ou 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), par exemple) permet une meilleure ionisation des composés en mode négatif [20].

II.3.1.2. LE PIEGE LINEAIRE (THERMO)

i. L'ANALYSEUR QUADRIPOLAIRE : PRINCIPE ET FONCTIONNEMENT

Les analyseurs ont pour fonction de séparer les ions précédemment créés en fonction de leur rapport *m/z*. Comme pour les sources, il existe une grande variété d'analyseurs. Les plus courants étant des analyseurs dits à balayage qui détectent successivement les ions au cours du temps. Il est aussi possible d'associer plusieurs analyseurs pour combiner les spécificités de chacun.

Le choix d'un analyseur se fait principalement en fonction :

- de sa gamme de masse (valeur limite du rapport m/z mesurable)
- de sa précision dans la mesure de la masse
- de sa résolution (capacité à différencier des ions de rapport m/z très proche)
- de sa vitesse de balayage (domaine de masse mesurable par unité de temps)
- de sa transmission (rapport entre le nombre d'ions arrivant au détecteur et celui entrant dans l'analyseur).

Dans ces travaux de thèse, l'analyseur utilisé est un piège ionique linéaire. Son principe repose sur la stabilité des trajectoires des ions en fonction des tensions appliquées sur les électrodes du quadripôle pour les séparer selon leur *m/z*. Le piège linéaire est constitué de quatre barres hyperboliques d'un quadripôle fermé par des électrodes d'entrée et de sortie (*Figure II.6*) [21]. Les barres sont connectées électriquement et les barres opposées, distantes de r_0 sont de même polarité. Ce quadripôle comprend trois parties : une partie centrale ou les ions sont confinés, éjectés et détectés et deux parties latérales plus courtes, protégeant l'expulsion des ions en les stabilisant sur l'axe *z*.

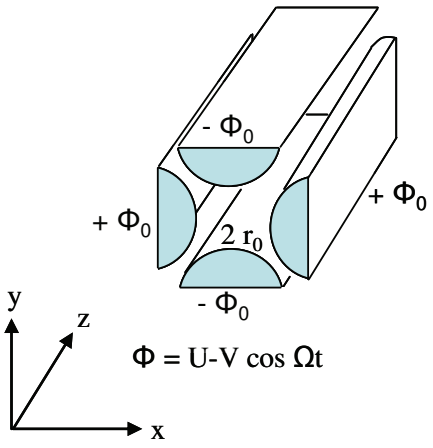


Figure II.6 Représentation d'un analyseur quadripolaire

Pour piéger les ions, il faut créer un pseudo puits de potentiel où la trajectoire des ions serait stable dans les trois directions. Paul proposa en 1953 d'utiliser des potentiels quadripolaires oscillants à radiofréquences [22]. L'application simultanée d'un potentiel alternatif radiofréquence ($V \cos \omega t$) sur les barres du quadripôle et d'une tension continue (U) sur les électrodes d'entrée et de sortie ainsi que sur les barres du quadripôle, impose aux ions un

chemin oscillant au sein du quadripôle selon le plan *xy* alors qu'ils cheminent librement selon l'axe *z*, tout en restant confinés au sein du piège [23]. Ces ions subissent les forces résultantes d'un potentiel électrique total (Φ) selon les axes *x* et y, d'équation :

$$\phi = \pm (U \pm V \cos \Omega t)(x^2 - y^2) / r_0^2 \qquad (2)$$

Où Φ est la tension appliquée aux électrodes, ω la fréquence angulaire, r_0 la distance séparant les hyperboles de l'axe optique O_z, *U* la tension continue et *V*, l'amplitude de la tension RF. A partir de l'expression de Φ, il est alors possible de décrire le mouvement d'un ion de masse *m*, de charge *z* pénétrant dans l'analyseur avec une vitesse constante *v* selon l'axe *z*. Les ions sont soumis suivant *x* et *y* aux accélérations résultantes des forces dues aux champs électriques :

$$F_x = ma = m\frac{d^2x}{dt^2} = -ze\frac{\delta\phi}{dx} \qquad (3)$$

$$Fy = ma = m\frac{d^2y}{dt^2} = -ze\frac{\delta\phi}{dy} \qquad (4)$$

où *m* est la masse de l'ion, *ze* sa charge et *a*, l'accélération.

En introduisant des variables appropriées,

$$u = x \quad ou \quad y \qquad \xi = \frac{\Omega t}{2} \qquad a_u = \frac{8zeU}{mr_0^2\Omega^2} \qquad q_u = \frac{8zeV}{mr_0^2\Omega^2}$$

on obtient des équations différentielles connues sous le nom d'équations de Mathieu :

$$\frac{d^2u}{d\varepsilon^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\xi)u = 0 \qquad (5)$$

La trajectoire des ions obéit aux équations de Mathieu qui établissent une relation entre les coordonnées d'un ion et le temps [24]. Pour des valeurs précises de tension, de radiofréquence et de géométrie du piège, seuls des ions avec un rapport *m/z* donné pourront avoir une trajectoire stable et être piégés. Tant que les coordonnées *x* et *y* qui expriment la distance de l'ion par rapport au centre des barres restent inférieures à r_0, l'ion traversera le quadripôle sans toucher les barres. Cette zone est illustrée par le diagramme de stabilité [25] (*Figure II.7*).

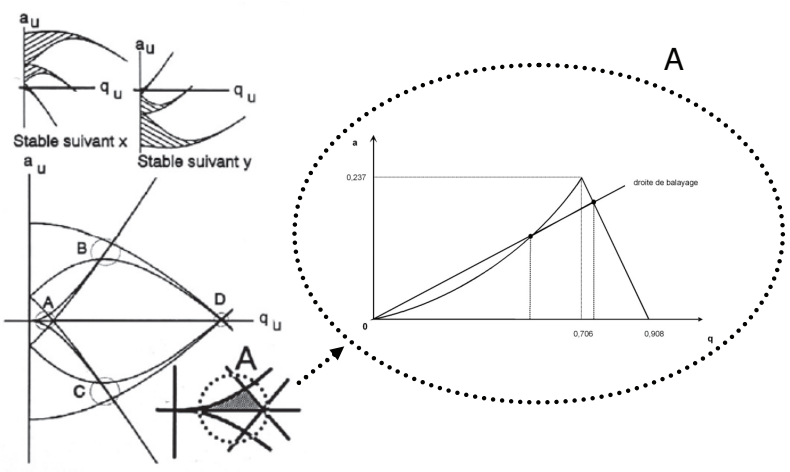


Figure II.7 Zone de stabilité dans un analyseur quadripolaire selon x et y en coordonnées (a_u, q_u)

La partie de la zone A de la *Figure II.7* (où *U* est positif) est la partie exploitée dans les spectromètres de masse. Les ions situés sous la courbe ($a_u = f(q_u)$) ont une trajectoire stable et pourront être piégés. Les ions dont les coordonnées sont à l'extérieur seront instables.

Les variables définies ci-dessus montrent que si la masse *m* est modifiée par un facteur quelconque, *a* et *q* seront divisés par ce même facteur. Le triangle de la zone A évoluera alors d'une masse à l'autre. La *Figure II.8* montre ces zones de stabilité dans le repère (*U* ; *V*) pour trois masses distinctes.

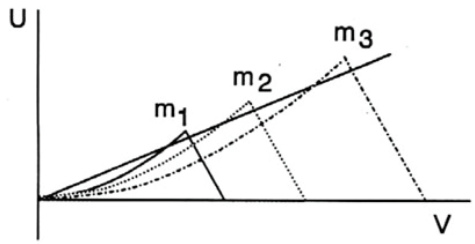


Figure II.8 Droite de fonctionnement d'un analyseur quadripolaire

Ainsi, un balayage de *U* et *V* avec *U/V* constant permet de balayer différentes masses. Les ions de différentes masses seront ainsi amenés séquentiellement dans leur zone de stabilité. En utilisant cette droite de fonctionnement *U/V* = constante, les ions m_1 auront une trajectoire stable dans des conditions où les ions de masse m_2 et m_3 ne seront pas stables. Les ions de

masse m_1 seront donc résolus des ions voisins. On remarque que si la pente de la droite diminue, la droite recouvrera de plus importantes sections du domaine de stabilité et par conséquent, un plus grand nombre d'ions peuvent atteindre le détecteur. Dans ce cas, la sensibilité est meilleure. Par contre, avec ce type d'appareil, il est important de noter que l'amélioration de la sensibilité se fait au détriment de la résolution. En effet, lorsque la pente de la droite diminue, les ions de masse m_1 sont amenés dans la zone de stabilité dans des conditions où les ions de masse m_2 pourront être stables également. On perd ainsi en résolution.

Lorsque la tension appliquée sur le quadripôle est limitée à sa composante radiofréquence (V cos Ωt), les trajectoires stables des ions ne sont limitées que par le paramètre q_z. Le diagramme de stabilité se limite qu'au segment $0 \leq q_z \leq 0.908$. Cela signifie que, pour une valeur V déterminée (r_0 et Ω étant fixe), tous les ions de rapport m/z supérieur à $(m/z)_{min}$ seront confinés dans le piège.

$$\left(m/z\right)_{\min} = \frac{4eU}{0.908 r_0^2 \Omega^2} \qquad (6)$$

Dans le cas de couplage de plusieurs analyseurs, le rôle d'un des quadripôles peut être de transmettre tous les ions. Pour cela, il suffit donc de fixer $U = 0$. Ainsi la résolution sera nulle mais tous les ions seront transmis dès lors qu'une tension V est appliquée. C'est le mode radiofréquence pure.

Le spectre de masse sera obtenu en augmentant progressivement la tension V de façon à déstabiliser les trajectoires des ions en fonction de leurs masses croissantes. Les ions sont alors éjectés les uns après les autres de l'analyseur. Ici, l'éjection est radiale, les ions traversent les fentes percées sur deux barreaux du quadripôle pour être détectés à l'aide d'un multiplicateur d'électrons.

ii. ACTIVATION DES IONS

Après éjection de tous les ions non désirés, il est possible d'isoler un ion spécifique de m/z donné au sein du piège ionique. Cette isolation sélective peut être suivie d'une étape d'activation au cours de laquelle l'ion peut être excité vibrationnellement ou électroniquement

(se référer au paragraphe I.3.1 : Les différentes méthodes de fragmentation par spectrométrie de masse) pour mener à divers types de fragmentation.

iii. CARACTERISTIQUES DE LA TRAPPE UTILISEE

Les caractéristiques de l'analyseur utilisé pour ces travaux sont décrites dans le tableau ci-dessous :

Vitesse d'analyse (uma/s)	11 000 (Normal Scan)
Transmission	50-70%
Exactitude en masse (Da)	0.1 (Ultra Zoom Scan)
Gamme de masse (m/z)	50- 4 000
Résolution	30 000 (Ultra Zoom Scan) pour m/z = 1000
Capacité de piégeage (nombre de charges)	20 000

Tableau II.2 Caractéristiques du piège ionique linéaire utilisé.

II.3.2 COUPLAGE LTQ-LASER UV-VIS

Le faisceau laser est introduit sur l'axe central du quadripôle du piège linéaire (*Figure II.9*). Pour garantir l'étanchéité du vide et par conséquent les spécificités du spectromètre de masse, une fenêtre de 30 mm de diamètre et de 3 mm d'épaisseur a été aménagée à l'arrière du LTQ. Le matériau de cette fenêtre doit être adapté au domaine spectral étudié : le quartz (silice fondue) est utilisé dans le domaine de l'UV-Visible.

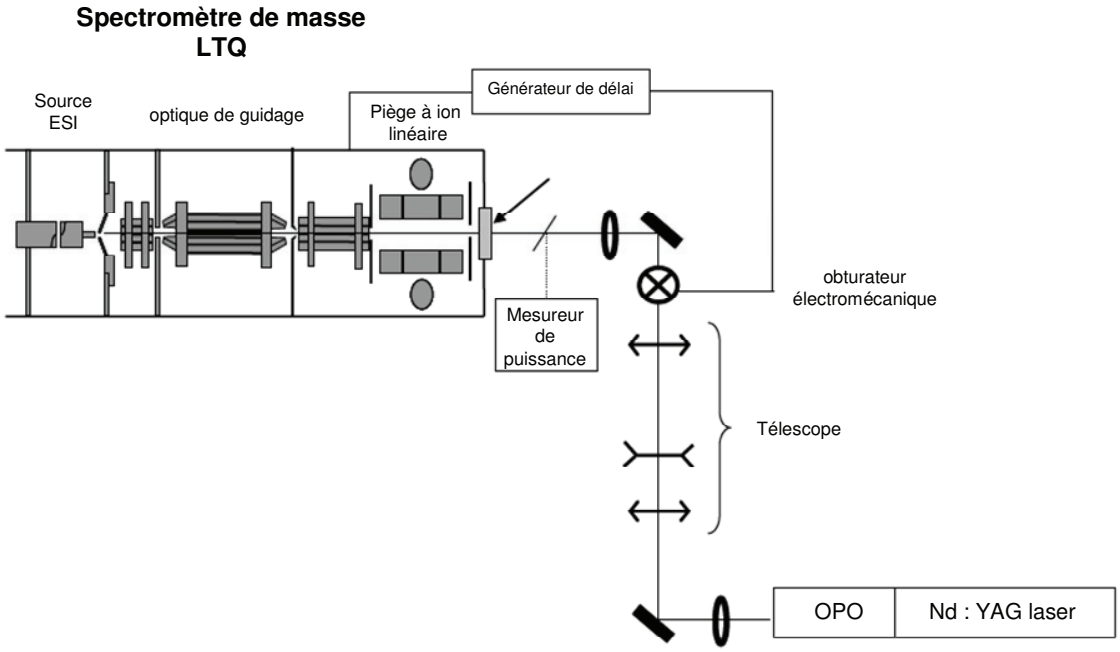


Figure II.9 Schéma détaillé du couplage LTQ-Laser UV/Vis.

Une série de lentilles (+200, -100 et +500 mm) et de miroirs permet de collimater et de focaliser le diamètre du faisceau et d'assurer son introduction dans le piège. Le réglage est minutieux et l'alignement du faisceau laser sur l'axe des ions piégés doit être réalisé de telle sorte que le recouvrement avec le nuage d'ions soit maximal.

Deux mesureurs de puissance sont installés sur le trajet optique. Le premier est utilisé directement à la sortie du laser afin de pouvoir régler les positions des cristaux BBO de l'OPO pour lesquels la puissance du faisceau est maximale. Le second sert à mesurer la quantité de photons qui parvient jusqu'au nuage d'ions. Une lame de quartz qui transmet 90% du faisceau est alors placée en amont du hublot. Ainsi, les 10% réfléchis peuvent être récupérés par le second mesureur.

Cette mesure de puissance est essentielle pour étudier les propriétés optiques linéaires d'un ion car l'absorption doit être monophotonique. Autrement dit, le taux de détachement d'électron (ou de dissociation…) en fonction de la puissance du laser doit être linaire. Pour vérifier cela, une lame demi-onde et un cube polarisateur sont placés sur le trajet optique et permettent de faire varier la puissance du laser à une longueur d'onde donnée.

La lumière produite par le laser est cohérente, monochromatique, rectiligne et polarisée linéairement (verticalement ou horizontalement). La lame demi-onde provoque un changement de la direction de polarisation de la lumière de façon symétrique par rapport à son axe rapide : la composante selon l'axe lent a changé de sens. Le cube polariseur permet quant à lui de séparer le faisceau en deux faisceaux de polarisations différentes, perpendiculaires entre elles. La variation de θ, angle entre l'onde laser et l'axe de polarisation de la lame demi-onde, permet de diminuer progressivement l'intensité de l'onde sortant du polariseur selon la loi de Malus ($I = I_0 \cos^2 \theta$)

La synchronisation temporelle, entre le moment où le laser est injecté dans le piège et la période d'activation des ions, est assurée par un obturateur électromécanique placé sur le trajet du faisceau (*Figure II.9*). Relié à un générateur de délai synchronisé avec le spectromètre de masse, l'obturateur permet de contrôler le déclanchement de l'irradiation laser et d'ajuster sa durée en fonction de la période d'activation des ions dans le piège. Le temps nécessité par l'obturateur pour se déclencher est de l'ordre de la milliseconde et n'influe donc pas devant les différents temps d'expériences (> 100 ms). La durée de l'activation des ions, définie en unité de temps (milliseconde), est donc reliée à la durée de l'irradiation, exprimée en nombre d'impulsions laser. Ainsi, pour une fréquence laser de 10 Hz, 100 ms d'activation correspondent à l'injection d'un seul pulse laser.

II.3.2.1. SOURCE DE LUMIERE : OPO, CONTINUUM

Ce laser accordable en longueur d'onde est proposé par Continuum. Il est composé d'un oscillateur paramétrique optique (OPO) (Panther^{TM}Ex) pompé par un laser Nd^{3+} : YAG (grenat d'yttrium aluminium dopé au néodyme $Y_3A_{15}O_{12}$) (Surelite^{TM}).
Le laser pompe est un laser Surelite II de fréquence 10 Hz, composé d'un oscillateur et d'un amplificateur, comportant un cristal et une lampe flash fournissant des impulsions laser à 1064 nm de 5 ns. A la sortie de l'amplificateur, le faisceau traverse des cristaux BBO (Bêta Borate de Baryum), il est ainsi doublé puis triplé en fréquence (*Figure II.10*). Le faisceau résultant de 355 nm qui possède une énergie par impulsion de 160 mJ et une largeur d'impulsion de 5 ns est ensuite injecté dans l'OPO. Un premier cristal BBO permet de balayer les longueurs d'onde de 410 à 710 nm pour le λ_{signal} et de 710 à 2200 nm pour λ_{idler} en convertissant un photon à 355 nm, en photon visible et un photon IR (*Figure II.10*).

$$1/\lambda_{Pompe} = 1/\lambda_{Signal} + 1/\lambda_{Idler} \qquad (7)$$

Un second cristal permet de doubler λ_{Signal} et λ_{Idler} pour obtenir des longueurs d'onde de 215 à 355 nm et de 355 à 410 nm respectivement. Ainsi ce système permet de couvrir une large gamme de longueur d'onde, allant de 215 à 2200 nm. Le diamètre du faisceau en sortie d'OPO est d'environ 7 mm avec une divergence inférieure à 2 mrad.

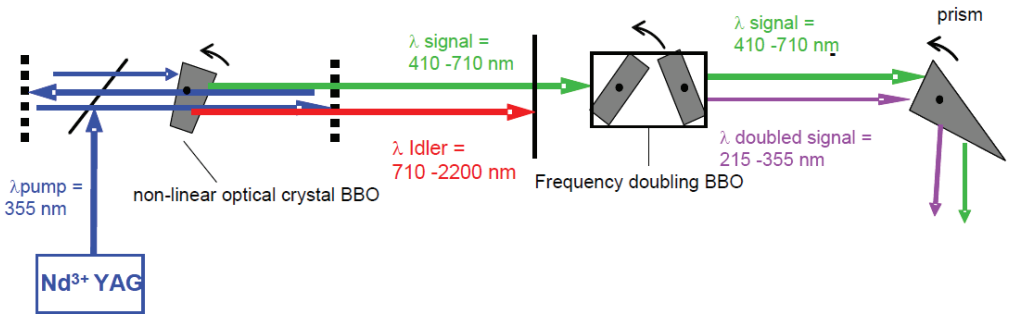


Figure II.10 Production du faisceau UV au niveau de l'OPO par conversion de fréquence des BBO

L'énergie du faisceau varie en fonction de sa longueur d'onde (*Figure II.11*). Notons qu'il est difficile de balayer entre 320 nm et 390 nm du fait de la faible énergie laser (< 1 mJ) obtenue autour de la dégénérescence (355 nm).

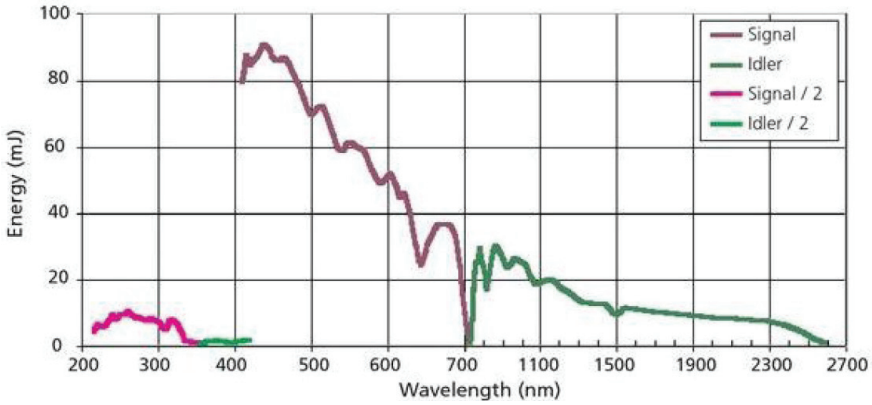


Figure II.11 Energie en fonction de la longueur d'onde en sortie d'OPO

Les différents composants du laser sont pilotés par le logiciel Panther OPO Software.

II.3.2.2. SPECTROSCOPIE D'ACTION, PRINCIPE ET FONCTIONNEMENT

Lors de l'irradiation de polyanions avec une lumière UV-Vis, le processus de photodétachement d'électron est la principale voie de relaxation observée. Le détachement d'électron peut être utilisé pour enregistrer des spectres d'action en phase gazeuse de larges systèmes comme des protéines entières. L'absorption du photon peut ainsi être détectée en mesurant l'action du laser sur la protéine polyanionique (l'absorption d'un photon par un ion piégé) par spectrométrie de masse. Le spectre d'action est obtenu en traçant le taux de photodétachement d'électron corrigé du flux de photons ($\Phi \propto \lambda P$) en fonction de la longueur d'onde du laser selon l'équation :

$$\ln \frac{(I_{parent} + I_{fragments})}{I_{parent}} \Big/ (\lambda * P) \qquad (8)$$

Avec I_{parent}, l'intensité de l'ion parent ; $I_{fragments}$, l'intensité de l'espèce radicalaire formée par photodétachement ; λ, la longueur d'onde et P, la puissance du laser pour une longueur d'onde donnée.

Le schéma ci-dessous récapitule les différentes étapes d'obtention d'un spectre d'action :

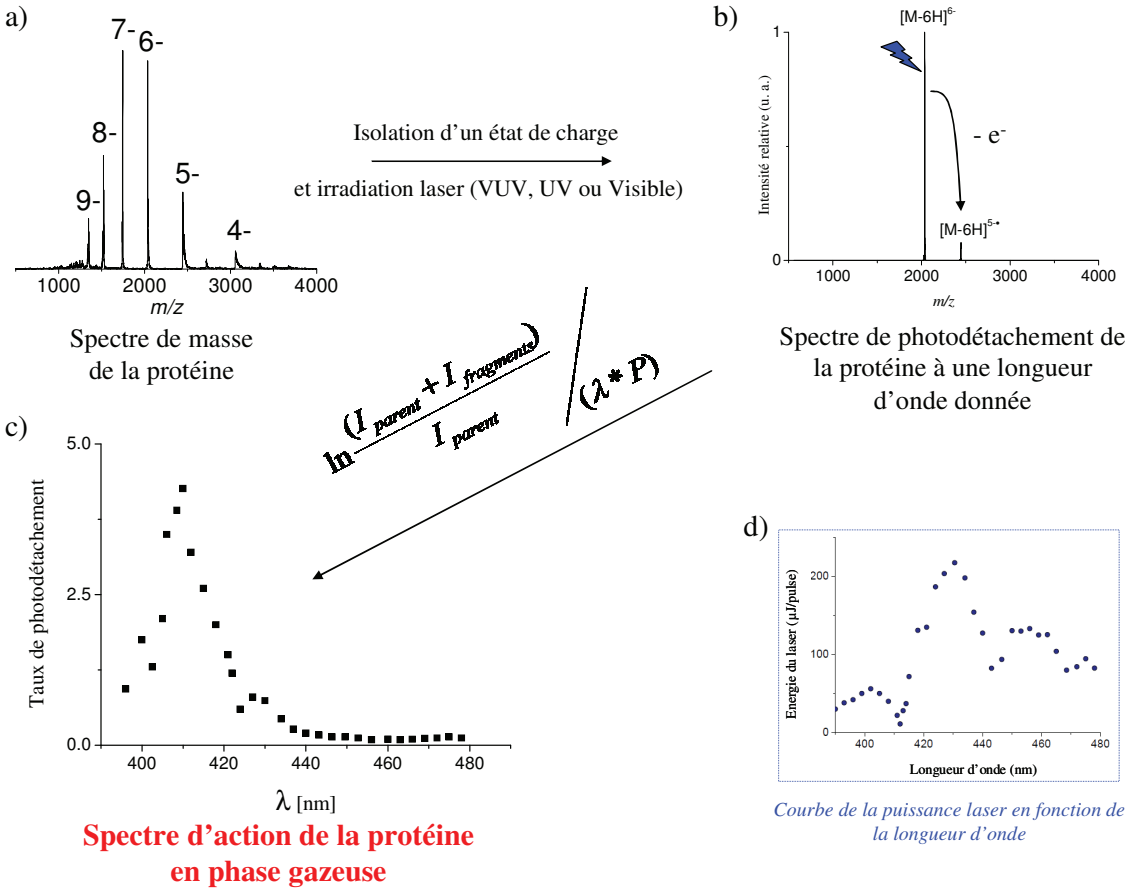


Figure II.12 Schéma d'obtention du spectre d'action.
a) Spectre de masse du cytochrome c en mode négatif, b) Spectre de photodétachement (MS^2) du cytochrome c $[M-6H]^{6-}$ après 200 ms d'irradiation à 415 nm, c) Spectre d'action dans la gamme 390-480 nm, d) courbe de puissance laser sur cette gamme de longueur d'onde.

II.3.2.3. Types de mesures (EPD, activated-EPD)

Des expériences de fragmentation de CID, UVPD et a-EPD de peptides et de protéines ont été réalisées avec ce montage. Contrairement à l'UVPD et l'a-EPD, les expériences de CID ne nécessitent pas la présence du couplage optique mais il est important de noter que ce couplage n'altère en rien les performances CID de l'instrument.

Ce couplage a également permis de réaliser toutes les expériences de spectroscopie d'action UV/VIS sur différents systèmes.

II.3.3. COUPLAGE LTQ-SR (SYNCHROTRON RADIATION)

Les expériences de photodétachement et de photoionisation dans le domaine VUV ont été réalisées sur la ligne DESIRS. Ce projet visait à étendre la source de lumière habituellement utilisée (le laser Continuum) par le rayonnement synchrotron. Ensuite, un montage expérimental à deux couleurs, plus complexe, a été mis en place. Ce montage permet de réaliser des expériences de spectroscopie VUV sur des espèces radicalaires, comme détaillé dans le chapitre IV. Un laser Brillant B (Quantel) à 266 nm a été aligné avec le rayonnement synchrotron comme illustré sur la *Figure II.13*. Un système de pompage et des enceintes intermédiaires permet le couplage entre le piège ionique et le rayonnement du synchrotron sous vide très poussé.

Les deux faisceaux de lumière ont été alignés dans l'espace grâce à un miroir percé par un trou de 2 mm de diamètre à 45°, placé à environ 30 cm de l'entrée du piège ionique. Le faisceau issu du laser YAG (266 nm) est réfléchi à 90° sur le miroir pour être injecté au sein du piège ionique, parallèlement à son axe. Le rayonnement du synchrotron passe à travers les 2 mm d'ouverture du miroir pour être injecté selon le même axe. Deux générateurs de délai, l'un placé sur le faisceau du laser et l'autre sur le rayonnement du synchrotron sont synchronisés avec le spectromètre de masse et permettent ainsi l'alignement temporel des expériences.

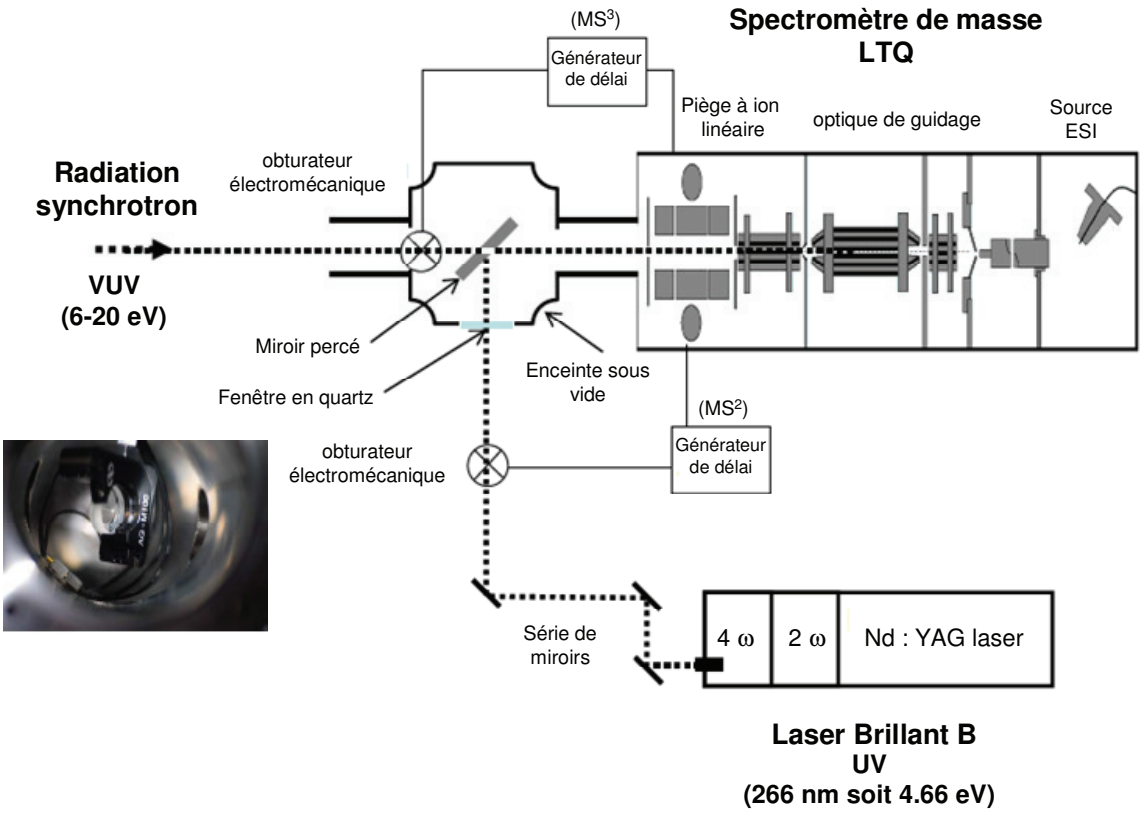


Figure II.13 Schéma de la ligne optique

II.3.3.1. SOURCES DE LUMIERE

i. LE RAYONNEMENT DU SYNCHROTRON

Le rayonnement du synchrotron SOLEIL (Source Optimisée de Lumière d'Energie Intermédiaire du LURE), en fonctionnement depuis janvier 2008, est une source de troisième génération, conçue pour obtenir des sources de rayonnement très brillantes, très stables et adaptables à diverses applications.

Les électrons sont produits par un canon et sont ensuite accélérés dans un accélérateur linéaire appelé LINAC à 100 MeV. Un second accélérateur, le booster, permet aux électrons d'atteindre 2,75 GeV. Une fois l'énergie atteinte, ils sont transférés dans un anneau de stockage de 354 m de circonférence et qui peut accumuler jusqu'à 500 mA (la circulation des

particules correspond alors à un courant continu). Les électrons peuvent ainsi rester en orbite plusieurs heures.

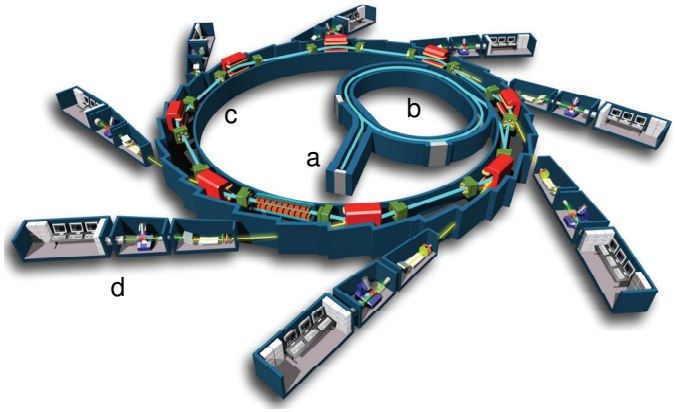


Figure II.14 SOLEIL : (a) LINAC, (b) Booster, (c) Anneau de stockage, (d) Lignes de lumière

Dans l'anneau de stockage, des aimants de courbure dipolaires maintiennent les électrons sur une orbite fermée. Des aimants quadripolaires et hexapolaires permettent de focaliser le faisceau d'électrons. Les pertes d'énergie du faisceau dues à l'émission de rayonnement sont compensées par deux cryomodules contenant des cavités RF. Seuls les électrons qui arrivent en phase avec l'oscillation du champ RF sont maintenus en orbite stable. Les électrons peuvent ainsi être ramassés en paquets, ce qui est à l'origine de la structure temporelle du rayonnement synchrotron.

Les aimants de courbure et les éléments d'insertion sont les deux principales sources du rayonnement. Les aimants de courbure produisent une lumière blanche tangentiellement à la trajectoire des électrons. Les sections droites accueillent des éléments d'insertions magnétiques appelés wigglers et des onduleurs. C'est une série de petits aimants dont les polarités sont alternées et qui servent ainsi à rendre le rayonnement plus cohérent et ainsi, plus brillant dans l'ultraviolet lointain (VUV) et les rayons X (RX).

Le rayonnement synchrotron est extrait de l'anneau par une tête de ligne pour être envoyé dans une des lignes de lumière. Les lignes de lumière sont composées de l'ensemble des éléments du vide, d'optique et de diagnostique nécessaires pour assurer le transport de la lumière vers les stations expérimentales, dont la ligne DESIRS (Dichroïsme Et Spectroscopie par Interaction avec le Rayonnement Synchrotron) où ont été réalisées nos expériences.

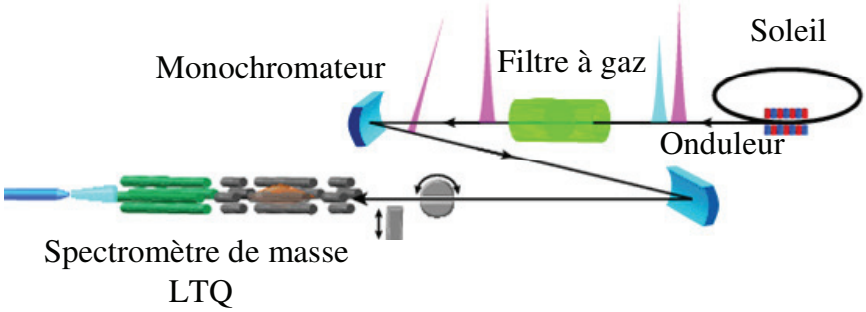


Figure II.15 Représentation schématique de la ligne DESIRS

La ligne de lumière DESIRS [26] est basée sur un onduleur couvrant la gamme VUV (5-40 eV). La gamme du Vacuum UV (< 200 nm) est définie par l'opacité de l'air ordinaire en-dessous de cette longueur d'onde, due à la forte absorption de l'oxygène présent dans l'air.

L'onduleur est constitué de succession de bobines fixes de trois types différents (bobines à champ horizontal, à champ vertical et à champ vertical déphasé). Il est capable de produire tous types de polarisations (de circulaire à linéaire à phase variable) et de faire varier très rapidement cette polarisation grâce à un champ horizontal 0,2 s avec une fréquence de 1 Hz. La fenêtre en MgF_2 (< 9eV) et le filtre à gaz (8 – 16 eV) permettent de s'affranchir des harmoniques hautes de l'ondulateur qui sont transmises par le réseau du monochromateur.

Cette ligne permet de produire un rayonnement VUV monochrome avec une ultra-haute résolution (E/ΔE proche de 200 000 avec un monochromateur), une grande stabilité, une pureté spectrale, un haut flux et des polarisations totalement variables.

Le spectromètre de masse est utilisé pour enregistrer les spectres d'action dans la gamme VUV.

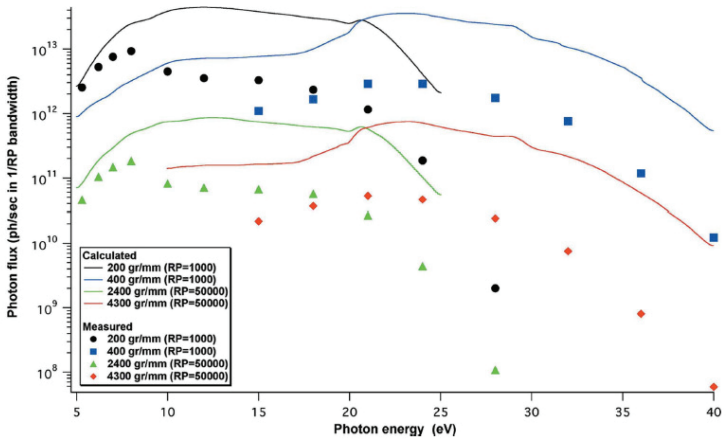


Figure II.16 Flux du rayonnement synchrotron de 5 à 16 eV pour un courant de 500 mA de la ligne DESIRS. Les symboles correspondent aux résultats expérimentaux et les lignes aux simulations optiques[26].

Une photodiode de type AXUV 100 (IDR), qui permet de donner un courant en fonction de la puissance qu'elle reçoit, est utilisée pour mesurer le flux de photon (*Figure II.16*). Cette diode a été calibrée à l'aide de la diode de Bessy II (« detector calibration facilities » de Berlin) [27]. Le fichier de calibration permet de relier le courant fournit par la diode avec la puissance reçue. Une mesure du flux de photon à SOLEIL a été réalisée avec les deux diodes sur une même gamme d'énergie de photon sur la ligne DISCO (SOLEIL)

ii. BRILLANT B, QUANTEL

Ce laser est un oscillateur ND : YAG pulsé de haute énergie comprenant des modules pouvant générer des harmoniques jusqu'à 5 ω.
Des impulsions laser à 1064 nm d'une durée de 6.3 ns sont produites à une fréquence de 20 Hz. Ensuite, un doubleur (2ω) et un quadrupleur (4ω) permettent d'obtenir des faisceaux à 532 et 266 nm respectivement. L'énergie en sortie de laser à 266 nm est de 60 mJ/impulsion avec une largeur de raie de 0.8 cm^{-1}. Le diamètre du faisceau est d'environ 9 mm

II.3.3.2. TYPES DE MESURES

Le rayonnement VUV démarre à des énergies de photons supérieures à 6.2 eV ($\lambda < 200$nm). Le domaine d'énergie entre 6 et 20 eV correspond aux énergies nécessaires pour atteindre le premier potentiel d'ionisation de tout atome ou molécule neutre. Il permet donc d'étudier des états excités des ions moléculaires jusqu'à leur premier seuil de fragmentation.
Le rayonnement VUV offre donc la possibilité d'étudier des processus photo-induits en couche de valence, sur les échantillons en phase diluée tels que des radicaux, espèces excitées avec un laser. Le couplage entre le rayonnement synchrotron et le spectromètre de masse a été utilisé pour enregistrer des spectres d'action de protéine dans le VUV. Le couplage à deux couleurs a permis d'oxyder des peptides et protéines avec le laser Brillant B (266 nm) par photodétachement d'électron, puis de sonder les propriétés optiques et les différentes voies de fragmentation de ces ions radicalaires sur toute la gamme du rayonnement synchrotron.
Ainsi, des spectres d'action VUV sur des peptides et des protéines entières ont pu être enregistrés ainsi que l'influence de la présence de radicaux sur les propriétés optiques de ces ions, comme décrit dans les chapitres III et IV de ce manuscrit.

I.4. EXPERIENCES DE DISSOCIATION PAR DETACHEMENT D'ELECTRON

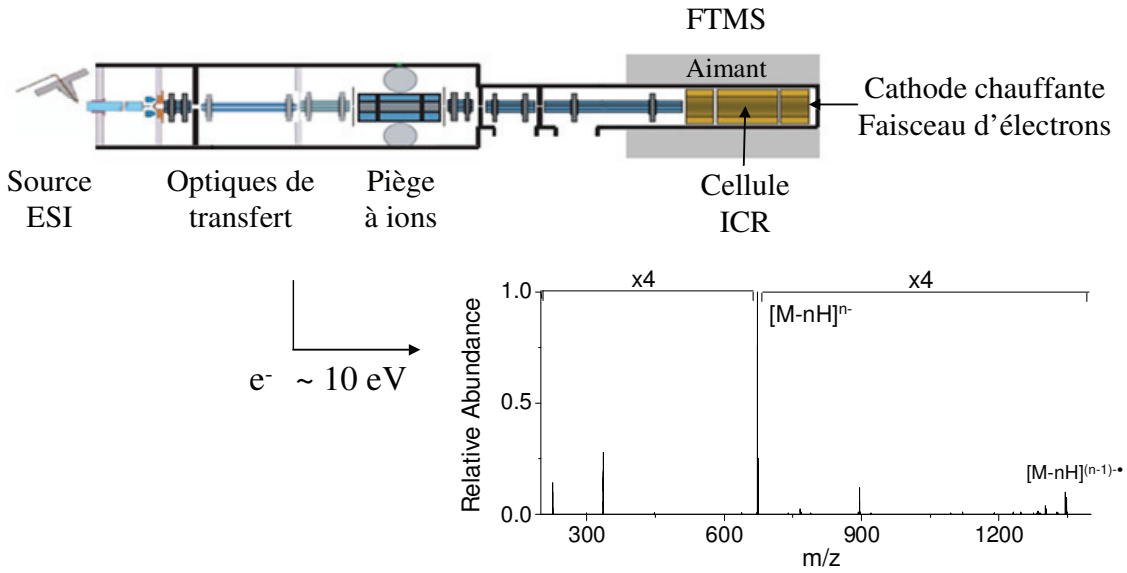


Figure III.17 Schéma général des expériences d'EDD

Les expériences de dissociation par détachement d'électron ont été réalisées sur un FT-ICR MS par l'équipe de Yury Tsybin à Lausanne et à Brême. Cet instrument hybride consiste en un piège à ion linéaire (LTQ de chez Thermo) combiné avec une cellule cyclotronique.

II.4.1. FTICR : LA RESONANCE CYCLOTRONIQUE IONIQUE A TRANSFORMEE DE FOURIER [28] : PRINCIPE ET FONCTIONNEMENT.

Les ions sont ionisés par une source ESI. Une fois dans l'analyseur, un ion de masse m avec une vitesse *v* soumis à un champ magnétique *B* va se trouver piégé sur une trajectoire circulaire de rayon de courbure *R*, résultant de l'équilibre entre la force centripète (*F*) produite par le champ magnétique et la force centrifuge (*f*).

$$F = qvb \qquad (9)$$

$$f = (mv^2)/R \qquad (10)$$

Ce mouvement de rotation est appelé mouvement cyclotronique de fréquence

$$\nu = qB / 2\pi\ m \qquad (11)$$

La fréquence de l'ion dépend uniquement du champ magnétique et du rapport masse sur charge. La mesure de la fréquence de ce mouvement de rotation permet donc de déterminer le rapport *m/z*. Sous l'influence d'un champ magnétique, les ions sont uniquement piégés selon le plan xy. Pour piéger les ions selon l'axe z, deux plaques perpendiculaires à l'axe z sont portées à un potentiel répulsif. Une fois piégés dans la cellule, les ions ont donc la même trajectoire mais pas la même position à un instant déterminé. Il convient donc de donner aux ions de même *m/z* un mouvement d'ensemble en les mettant en phase par résonance cyclotronique. Pour cela, les ions sont excités par un champ alternatif de fréquence correspondant à leur fréquence de résonance. C'est le principe de la résonance d'ions en cyclotron (ICR : Ion Cyclotron Resonance) (*Figure II.18*). Les ions sont alors accélérés, mis en phase et le rayon de leur orbite augmente. Le courant induit par le mouvement cohérent des ions de même *m/z* est mesuré sur les plaques de détection. Le signal détecté en fonction du temps est une somme des signaux temporels correspondant aux différents ions présents. Par transformée de Fourier, il est converti en signal correspondant à une somme de fréquences. La fréquence cyclotron étant inversement proportionnelle à *m/z*, elle permet d'aboutir au spectre de masse en *m/z*.

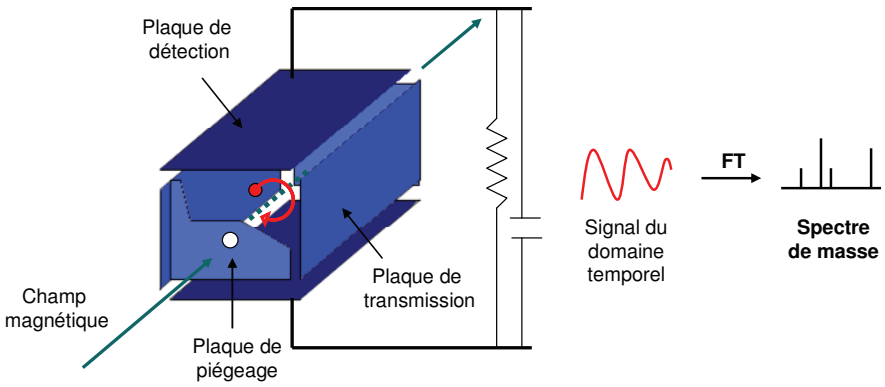


Figure II.18 Obtention d'un spectre de masse par transformée de Fourier du « courant image » du mouvement des ions dans la cellule ICR.

Ce qui caractérise cet analyseur, c'est sa haute résolution (Rs > 100 000, pour B = 7 T). De plus, l'excellente précision du FTICR sur la mesure de masse (0.5-10 ppm) lève ou diminue les ambiguïtés sur l'identification des composés. Le FTICR permet de faire de la spectrométrie de masse en tandem dans la cellule même, avec possibilités variées d'activation

des ions et donc de fragmentations sélectives. Il est possible d'associer avec ce type d'analyseur, des systèmes quadripolaires, comme le piège à ions linéaire que nous utilisons (*Figure III.17*). Leur propriété de confinement permet de stocker un paquet d'ions avant de l'envoyer vers la cellule ICR. C'est un instrument hybride de ce genre qui a été utilisé pour nos expériences : un LTQ-FTICR commercialisé par Thermo Electron.

Dans ce type de spectromètre de masse, la collision avec des atomes de gaz est également utilisée pour induire de la fragmentation. Dans ce cas, l'énergie cinétique est apportée à l'ion sélectionné dans la cellule par activation résonnante à la fréquence cyclotronique. Des méthodes d'activation avec des électrons peuvent être réalisées dans un FTICR comme l'ECD ou l'EDD. Ces techniques conviennent aux FTICR car elles nécessitent un temps d'interaction des électrons avec les ions assez long et un très haut vide dans l'analyseur.

II.4.2. COUPLAGE AVEC UNE CATHODE CHAUFFANTE COMME SOURCE D'ELECTRON

Les réactions de type ion-électron (type EDD) nécessitent la formation d'un faisceau d'électrons qui est produit par l'intermédiaire d'une cathode indirectement chauffée. Autrement dit, cette cathode bien qu'électroniquement isolée du dispositif chauffant, est en contact thermique avec ce dernier et permet ainsi la production d'un faisceau d'électrons (*Figure II.19*). Les électrons traversent la plaque de piégeage percée avant d'interagir avec les ions sélectionnés.

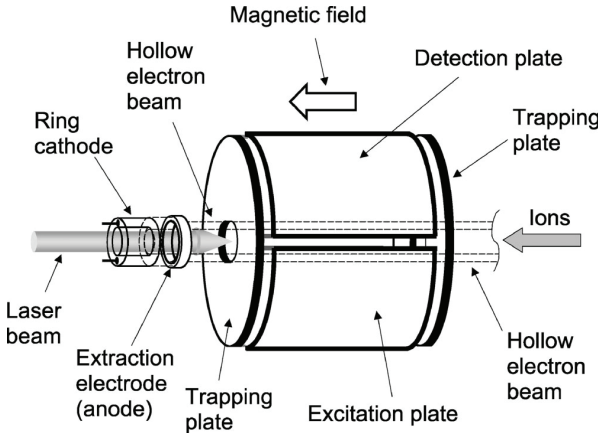


Figure II.19 Schéma d'une cellule ICR équipée d'une cathode chauffante servant à la production du faisceau d'électrons [29].

La plupart des instruments FTICR sont commercialisés avec l'équipement nécessaire pour réaliser des expériences d'ECD, d'EDD et d'IRMPD. Le développement d'une cathode percée a permis de combiner les expériences d'IRMPD (réaction ion-photon) et d'ECD (réaction ion-électron). Ainsi, le faisceau infrarouge peut être introduit dans la cellule ICR même lorsque la cathode est en fonctionnement [29].

II.4.3. TYPES DE MESURES

Le FT ICR, équipé d'une cathode chauffante servant de source d'électrons, a été utilisé lors des expériences de fragmentation peptidique EDD, en collaboration avec l'équipe de Y. Tsybin. Le but de cette étude est de comparer la fragmentation obtenue en EDD et en a-EPD et d'en tirer ainsi des informations sur les mécanismes de fragmentation.

Pour ces expériences d'EDD, les peptides ont été dilués dans 50/50 eau/acétonitrile à une concentration de 2 µM et injectés avec un débit de 10 $\mu L.min^{-1}$ avant d'être isolés dans le piège ionique et transférés à la cellule ICR. Le potentiel de piégeage des ions au sein de la cellule ICR a été optimisé à 1 V. Les ions d'intérêt ont été bombardés par des électrons de 10 eV pendant 1 s.

II.5. SPECTROSCOPIE DE PHOTOELECTRONS RESOLUE EN CONFORMATION [30]

Les expériences de spectroscopie d'électrons résolue en conformation ont été réalisées dans l'équipe de Mandfred Kappes, à Karlsruhe sur un couplage développé au sein de leur laboratoire (*Figure II.20*).

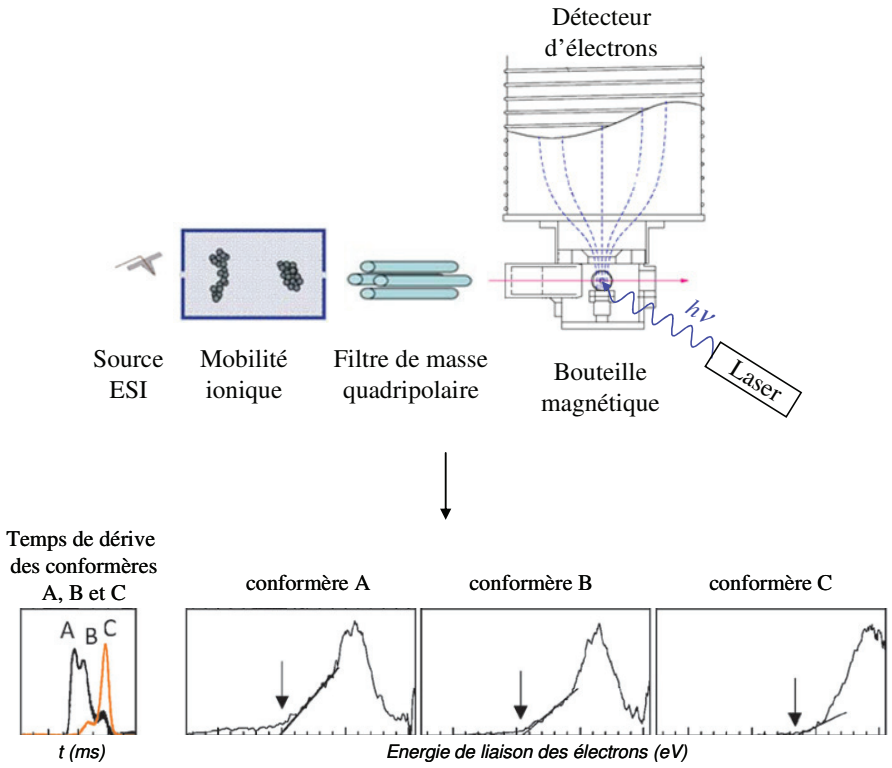


Figure II.20 Schéma général des expériences de spectroscopie de photoélectrons résolue en conformères.

La source ESI permet l'ionisation des molécules. La cellule de mobilité ionique sert à séparer les différents conformères en phase gazeuse. Le quadripôle est utilisé pour sélectionner les espèces selon leur rapport *m/z*. Le laser UV permet de détacher un électron de l'espèce anionique préalablement séparé en conformation. Enfin une bouteille magnétique est utilisée pour collecter et analyser les électrons émis.

II.5.1. LA MOBILITE IONIQUE

La mobilité ionique permet de sonder la conformation des ions en phase gazeuse et d'ainsi séparer les différents conformères d'une protéine. Le principe est illustré sur la *Figure II.21* :

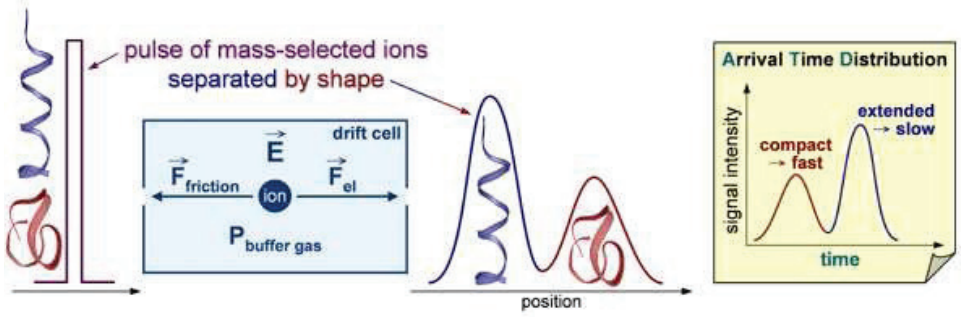


Figure II.21 Schéma de principe de la mobilité ionique

Les ions sont produits par la source électrospray et sont injectés en paquet compact dans la cellule de mobilité dans laquelle règne une pression relativement élevée de gaz tampon (~5 Torr d'hélium) et un champ électrique E. Les ions sont entrainés dans le tube par le champ électrique mais les collisions avec le gaz tampon les ralentissent. Il s'établit donc un régime stationnaire : les ions atteignent une vitesse de translation constante. Le rapport entre la vitesse de dérive (V_d) et le champ appliqué (E) est appelé mobilité ionique (K).

$$K = \frac{V_d}{E} \qquad (12)$$

Plus les protéines sont de conformation dépliée, plus la friction avec l'hélium contenu dans la cellule est importante et donc, plus leurs vitesses de dérive seront faibles. Les protéines dépliées auront donc une valeur de K plus faible que les protéines compactes et atteindront le détecteur plus tardivement.

II.5.2. PES PRINCIPE

La spectroscopie de photoélectron est un processus de photoionisation d'une molécule, au cours duquel l'impact de photons d'énergie $h\nu$ sur un système anionique provoque l'éjection d'un électron et la formation d'ions radicalaires. Sous l'action d'un rayonnement UV, tous les électrons possédant une énergie de liaison inférieure à l'énergie des photons incidents sont arrachés puis captés par une bouteille magnétique avant de pouvoir être détectés. La spectroscopie de photoélectron permet de mesurer précisément l'énergie cinétique des électrons (EKE) et d'obtenir ainsi des informations sur les caractéristiques physiques de

l'électron. En effet, la détermination de l'énergie cinétique des électrons détachés en fonction de l'énergie du photon incident permet d'évaluer l'énergie de liaison de l'électron, la barrière de répulsion coulombienne ainsi que l'affinité électronique.

Cette technique, couplée à la mobilité ionique, permet de sonder les propriétés structurelles des biomolécules.

II.5.3. COUPLAGE IMS/PES

Le montage expérimental utilisé pour les expériences de spectroscopie de photoélectron se décompose en plusieurs parties distinctes, comme illustré sur le schéma ci-dessous [31].

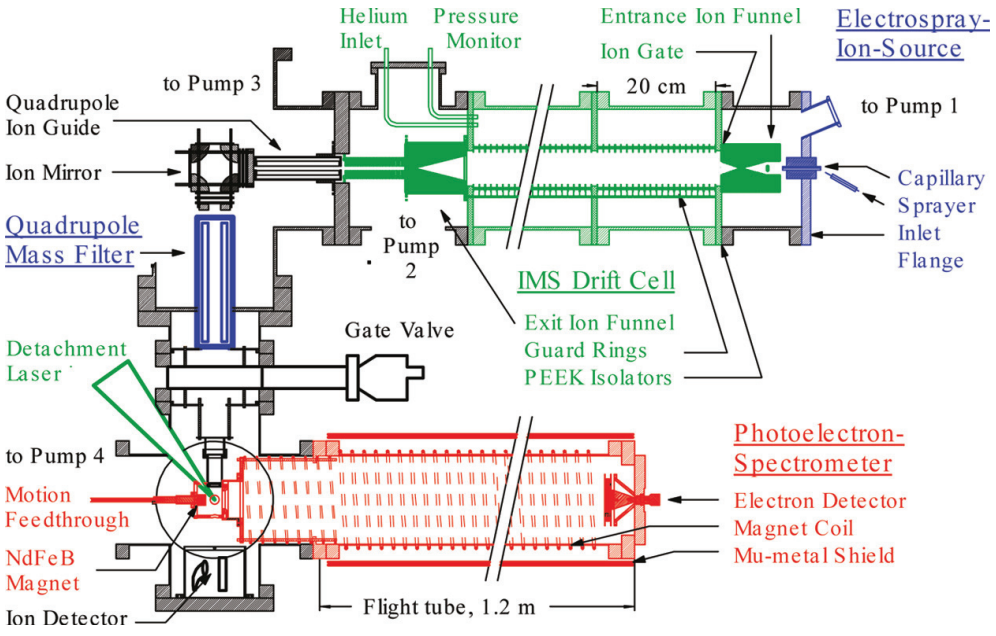


Figure II.22 Schéma du montage expérimental IMS/PES

Les molécules sont tout d'abord ionisées à pression atmosphérique par une source electrospray. Les ions ainsi formés sont transmis à travers un « funnel d'entrée » au sein d'une cellule de mobilité ionique (P ~ 1.5 mbar, T = 2000 V) où ils sont entrainés par un champ électrique qui permet leur séparation en fonction de leur conformation. Les différents conformères sont ensuite extraits par un autre funnel à la sortie de tube de mobilité et traversent un filtre de masse quadripolaire (QMF) (P ~ 5.10^{-6} bar) permettant de les sélectionner selon leur rapport masse/charge. Un système de pompage et des chambres

intermédiaires permettent de passer graduellement d'une pression atmosphérique à un vide plus poussé. La basse pression régnant dans le QMF permet aux ions d'éviter toute collision avec des molécules de gaz résiduel et les ions peuvent être ainsi guidés par des lentilles électrostatiques conventionnelles vers la chambre de détachement du spectromètre de photoélectron. Le paquet d'ions correspondant à un conformère donné est alors irradié avec un laser pulsé Nd :YAG (Spectra Physics, LAB 150-30) à 4.66 eV (266 nm) cadencé à 30 Hz, orthogonal au faisceau d'ions. La durée d'une impulsion varie entre 5 et 6 ns. La sélection du temps d'arrivée d'un isomère donné dans le spectromètre de photoélectron a été réalisée en implémentant un générateur de délai temporel entre l'injection électrospray du paquet d'ions dans la cellule de mobilité et les impulsions laser. L'irradiation des ions provoque le détachement de photoélectrons qui seront collectés avec une efficacité proche de 100% grâce à des miroirs magnétiques appliquant un champ magnétique fort et inhomogène juste au-dessous du lieu d'interaction du laser et du faisceau d'ions qui convergent ainsi à l'intérieur du tube de dérive. Au sein même de la bouteille magnétique, un champ de guidage faiblement magnétique permet ainsi aux électrons de traverser le tube de dérive de 120 cm et d'ainsi garantir l'efficacité de la transmission des photoélectrons (*Figure II.23*).

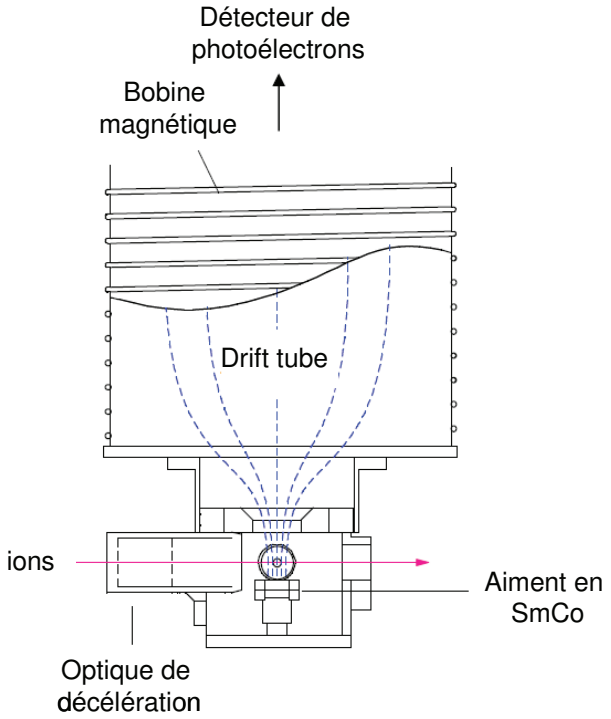


Figure II.23 Schéma de la bouteille magnétique

Les distributions des temps d'arrivée des photoélectrons dépendent de leur énergie cinétique et sont mesurées par un détecteur à galettes de micro-canaux monté en chevron. Le temps d'arrivée des électrons est converti en énergie cinétique et le spectre de photoélectron est ensuite obtenu en transformant l'énergie cinétique des électrons émis (E_c) en énergie de liaison des électrons (EBE) selon l'équation : $EBE = h\nu - E_c$

L'ionisation des molécules de gaz résiduel, les interactions entre le laser et les surfaces métalliques, le bruit électronique… causent un bruit de fond non négligeable. Pour s'affranchir des électrons qui seraient émis par des processus différents, les spectres de photoélectron sont enregistrés en mode cadencé on / off (15Hz / 15Hz). En soustrayant le spectre off du spectre on, on s'affranchit ainsi de tout bruit de fond.
Les spectres sont intégrés sur environ 20 000 impulsions laser. La résolution des mesures d'énergie cinétique (DE_c/E_c) est d'environ 3% pour une énergie cinétique de 1 eV.

II.5.4. TYPES DE MESURES (PES)

Le montage PES a été utilisé pour des expériences de spectroscopie de photoélectron de protéines entières, suite aux études préalables que K. Matheis *et al.* avaient réalisées sur des peptides [32]. Plusieurs états de charge d'une protéine (le cytochrome c) ont été étudiés (de 5- à 12-). Pour chaque état de charge, les spectres de mobilité ont permis de déterminer le nombre d'isomères et pour chaque isomère, un spectre de photodétachement d'électron a été enregistré.

II.6. CONCLUSION

Nous venons de décrire les différents montages utilisés lors de la thèse. Une brève explication des types de mesures effectuées a également été donnée. Les chapitres suivant seront consacrés à l'étude des résultats obtenus avec ces différents couplages et détailleront plus précisément le principe de chacune des techniques utilisées. Ce type de mesure a permis d'établir l'influence de la protéine sur l'énergie de liaison des électrons.

II.7. BIBLIOGRAPHIE

1. Dugourd, P., Aatoine, R., Broyer, M., Talbot, FO,. *Device and mass analysis of molecules using UV or visible laser beam photodissociation*. 2006: International patent.
2. Tabarin, T., *Conformation et dynamique de biomolécules en phase gazeuse*, in *physique*. 2007, Université de Lyon 1: Lyon.
3. Joly, L., *Couplage spectroscopique / spectrométrie de masse : Propriétés optiques et photofragmentation de biomolécules*, in *Physique*. 2009, Université Lyon 1: Lyon.
4. Dole, M., L.L. Mack, and R.L. Hines, *Molecular Beams of Macroions.* Journal of Chemical Physics, 1968. **49**(5): p. 2240-&.
5. Yamashita, M. and J.B. Fenn, *Electrospray Ion-Source - Another Variation on the Free-Jet Theme.* Journal of Physical Chemistry, 1984. **88**(20): p. 4451-4459.
6. Yamashita, M. and J.B. Fenn, *Negative-Ion Production with the Electrospray Ion-Source.* Journal of Physical Chemistry, 1984. **88**(20): p. 4671-4675.
7. Fenn, J.B., et al., *Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules.* Science, 1989. **246**(4926): p. 64-71.
8. Lenggoro, I.W., et al., *Sizing of colloidal nanoparticles by electrospray and differential mobility analyzer methods.* Langmuir, 2002. **18**(12): p. 4584-4591.
9. Fuerstenau, S.D., et al., *Mass spectrometry of an intact virus.* Angewandte Chemie-International Edition, 2001. **40**(3): p. 542-544.
10. Taylor, G., *Disintegration of Water Drops in Electric Field.* Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical and Physical Sciences, 1964. **280**(1380): p. 383-+.
11. Blades, A.T., M.G. Ikonomou, and P. Kebarle, *Mechanism of Electrospray Mass-Spectrometry - Electrospray as an Electrolysis Cell.* Analytical Chemistry, 1991. **63**(19): p. 2109-2114.
12. Rohner, T.C., N. Lion, and H.H. Girault, *Electrochemical and theoretical aspects of electrospray ionisation.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2004. **6**(12): p. 3056-3068.
13. Davis, E.J., *The Picobalance for Single Microparticle Measurements.* Isa Transactions, 1987. **26**(3): p. 1-5.
14. Taflin, D.C., T.L. Ward, and E.J. Davis, *Electrified Droplet Fission and the Rayleigh Limit.* Langmuir, 1989. **5**(2): p. 376-384.
15. Schmelzeisenredeker, G., L. Butfering, and F.W. Rollgen, *Desolvation of Ions and Molecules in Thermospray Mass-Spectrometry.* International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1989. **90**(2): p. 139-150.
16. Iribarne, J.V. and B.A. Thomson, *Evaporation of Small Ions from Charged Droplets.* Journal of Chemical Physics, 1976. **64**(6): p. 2287-2294.
17. Thomson, B.A. and J.V. Iribarne, *Field-Induced Ion Evaporation from Liquid Surfaces at Atmospheric-Pressure.* Journal of Chemical Physics, 1979. **71**(11): p. 4451-4463.
18. de la Mora, J.F., *Electrospray ionization of large multiply charged species proceeds via Dole's charged residue mechanism.* Analytica Chimica Acta, 2000. **406**(1): p. 93-104.
19. Kebarle, P. and M. Peschke, *On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions.* Analytica Chimica Acta, 2000. **406**(1): p. 11-35.

20. Ganisl, B., et al., *Charge as you like! Efficient manipulation of negative ion net charge in electrospray ionization of proteins and nucleic acids.* European Journal of Mass Spectrometry, 2011. **17**(4): p. 333-343.
21. Dawson, P.H., *Quadrupole Mass Analyzers - Performance, Design and Some Recent Applications.* Mass Spectrometry Reviews, 1986. **5**(1): p. 1-37.
22. Paul, W. and H. Steinwedel, **Ein Neues Massenspektrometer Ohne Magnetfeld.* Zeitschrift Fur Naturforschung Section a-a Journal of Physical Sciences, 1953. **8**(7): p. 448-450.
23. Douglas, D.J., A.J. Frank, and D.M. Mao, *Linear ion traps in mass spectrometry.* Mass Spectrometry Reviews, 2005. **24**(1): p. 1-29.
24. Hughes R. M., M.R.E., *Quadrupole storage mass spectrometry.* New York, Wiley, 1989.
25. De Hoffmann, E., Charette J., Stoobant, V., *Spectrométrie de masse.* ed Masson : Paris, 1994.
26. Nahon, L., et al., *DESIRS : a state-of-the-art VUV beamline featuring high resolution and variable polarization for spectroscopy and dichroism at SOLEIL.* Journal of Synchrotron Radiation 2012. **19**: p. 508-520.
27. Richter, M., et al., *Source and detector calibration in the UV and VUV at BESSY II.* Metrologia, 2003. **40**(1): p. S107-S110.
28. Marshall, A.G., C.L. Hendrickson, and G.S. Jackson, *Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer.* Mass Spectrometry Reviews, 1998. **17**(1): p. 1-35.
29. Tsybin, Y.O., et al., *Combined infrared multiphoton dissociation and electron capture dissociation with a hollow electron beam in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2003. **17**(15): p. 1759-1768.
30. Clemmer, D.E. and M.F. Jarrold, *Ion mobility measurements and their applications to clusters and biomolecules.* Journal of Mass Spectrometry, 1997. **32**(6): p. 577-592.
31. Vonderach, M., et al., *Combining Ion Mobility Spectrometry, Mass Spectrometry, and Photoelectron Spectroscopy in a High-Transmission Instrument.* Analytical Chemistry. **83**(3): p. 1108-1115.
32. Matheis, K., et al., *Photoelectron Spectroscopy of Gramicidin Polyanions: Competition between Delayed and Direct Emission.* Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(47): p. 15903-15906.

CHAPITRE III

SPECTROSCOPIE D'ACTION ET DE PHOTOELECTRON DE PEPTIDES ET DE PROTEINES

III.1. Introduction.....99
III.2. Mécanisme du détachement d'électron 99
III.3. Spectroscopie d'action dans le visible : La bande soret du cytochrome c 104
III.3.1. Introduction 104
III.3.2. Détachement de l'électron.....107
III.3.3. Spectre optique 108
III.3.4. Conclusion.....111
III.4. Spectroscopie d'action dans le VUV : cas de l'insuline. 112
III.4.1. Introduction 112
III.4.2. Influence de l'état de charge de l'insuline sur l'efficacité du photodétachement d'électron.....114
III.4.3. Dépendance du multiple détachement d'électron de l'insuline en fonction de l'énergie des photons dans le VUV : double détachement direct 116
III.4.4. Conclusion.....119
III.5. Spectroscopie de photoélectron 120
III.5.1. Introduction 120
III.5.2. IMS PES du cytochrome c 121
III.5.3. Conclusion.....127
III.6. Conclusion générale. 128
III.7. Bibliographie 129

III.1. INTRODUCTION

Le détachement d'électron sur les polyanions résulte en la formation de deux espèces négativement chargées : un polyanion radicalaire et un électron libre.

$$[M-nH]^{n-} + h\nu \longrightarrow [M-nH]^{(n-1)-\bullet} + e^{-} \longrightarrow Fragmentation \qquad (I)$$

Suite à ce phénomène, deux techniques peuvent être utilisées. Comme démontré dans le travail de thèse de L. Joly [1] le détachement d'électron peut être utilisé comme sonde optique pour les protéines. Dans ce chapitre, la spectroscopie par photodétachement d'électron sera explorée dans les domaines VUV grâce à un projet SOLEIL obtenu en 2010 [2]. La spectroscopie UV-Vis comme sonde conformationelle sera également expliquée avec le cytochrome c. Nous discuterons notamment l'utilité de la bande visible de Soret due à l'hème (groupe porphyrique) comme sonde d'environnement protéique. Enfin, la collaboration avec le groupe de M. Kappes (Karlsruhe) s'est poursuivie. Durant mon travail, la spectroscopie PES sur des protéines entières a été réalisée et le lien entre conformation et spectroscopie PES sera discuté avec le couplage IMS/PES. Cette technique permet de sonder l'énergétique mise en jeu dans le photodétachement d'électron et de relier ces énergies aux propriétés structurelles des protéines.

III.2. MECANISME DU DETACHEMENT D'ELECTRON

Pour que le photodétachement d'électron ait lieu, l'énergie du photon doit être supérieure à l'énergie de liaison (BE) de l'électron le moins lié au polyanion. Cette énergie peut être assimilée à l'affinité électronique dans le cas des anions en phase gazeuse. Pour les molécules négativement chargées, l'énergie nécessaire pour arracher un électron est beaucoup plus faible (typiquement entre 0 et 5 eV) que pour les molécules neutres ou positives (typiquement 8 à 10 eV)

Dans le cas d'anions multichargés, le photodétachement résulte en un électron libre et des charges négatives portées par le polyanion, dont l'interaction à longue distance est répulsive ($\sum_{\substack{i=1 \\ i\neq j}}^{N} \frac{e^2}{R_{ij}}$). La superposition de la liaison attractive à courte distance de l'électron et de la répulsion coulombienne à longue distance donne naissance à une barrière de potentiel pour l'électron éjecté (la barrière de répulsion coulombienne (RCB)) [3]. Cette barrière de répulsion coulombienne a pour effet de diminuer l'énergie de liaison entre l'électron et le polyanion. Comme l'illustre la *Figure III.1*, l'énergie de liaison dans le cas d'un polyanion se traduit par $BE'_{(multichargé)} = BE_{(monochargé)} - RCB$.

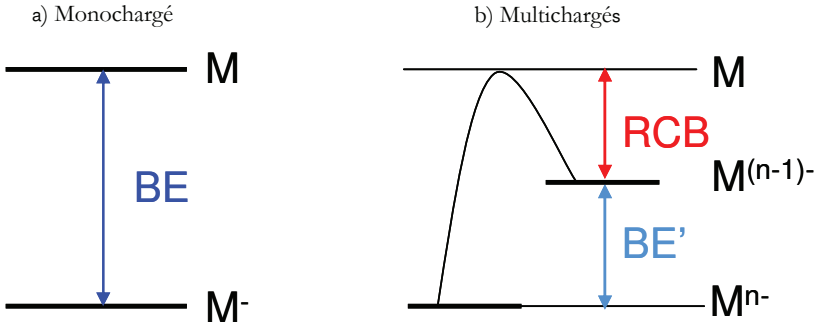


Figure III.1 Diagramme représentant l'énergie nécessaire pour détacher un électron de (a) des monoanions et (b) des dianions

Le départ de l'électron dépend donc de son énergie de liaison avec le groupement portant la charge négative et des répulsions coulombiennes entre les charges portées par le polyanion. Si le détachement d'électron a lieu, bien que l'énergie d'excitation soit comprise entre BE et BE+RCB, ce phénomène sera entièrement expliqué par le passage de l'électron à travers la RCB par effet tunnel [4]. Le détachement d'électron peut également être initié avec photons d'énergie inférieure à la BE (exemple des photons infrarouges) par un processus multiphotonique.

Pour comprendre le mécanisme du détachement d'électron, il faut savoir si le processus est mono- ou multiphotonique. Le processus est monophotonique quand le taux de détachement d'électron en fonction de la puissance laser est linéaire (un processus multiphotonique conduirait à une croissance non linéaire de cette courbe). *La Figure III.2*, avec l'exemple du cytochrome c, illustre ce phénomène. Le cytochrome c $[M-12H]^{12-}$, isolé au sein du piège, a été irradié 100 ms à 266 nm. Le pic annoté $[M-12H]^{11-\bullet}$ représente l'espèce oxydée obtenue

par photodétachement d'électron. L'insert montre le taux de photodétachement en fonction de la puissance laser.

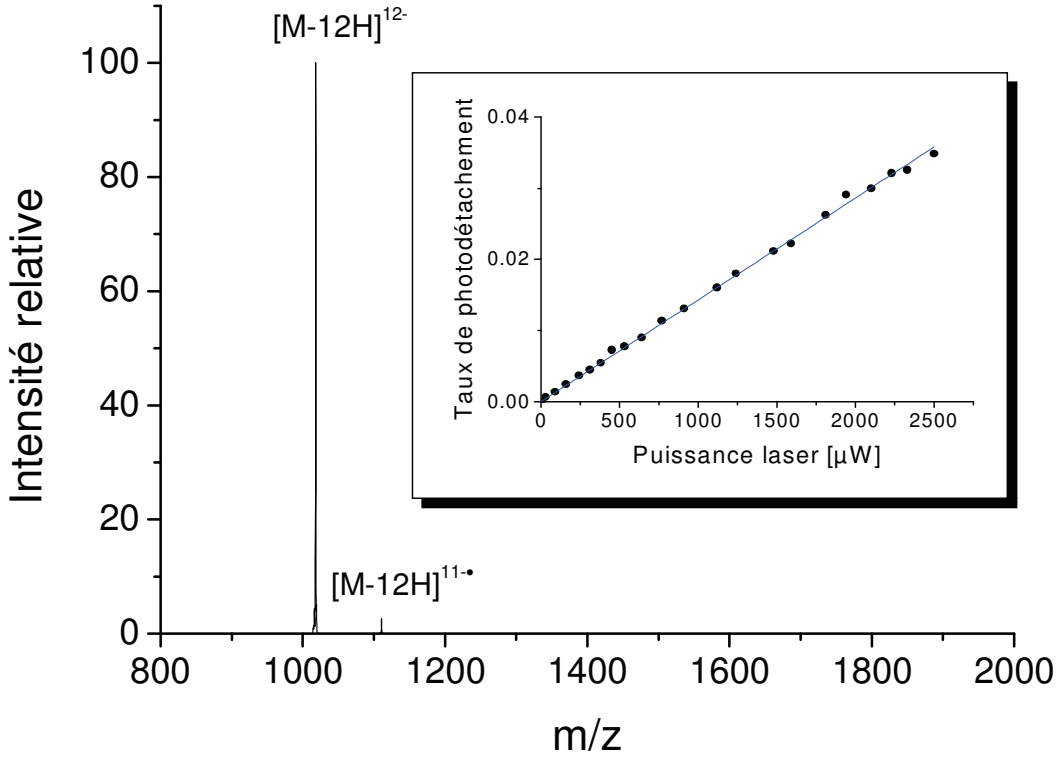


Figure III.2 Spectre de masse obtenu après 100 ms d'irradiation laser à 260 nm du cytochrome c $[M-12H]^{12-}$. L'insert montre le taux de détachement ($ln((I_{[M-12H]^{12-}} + I_{[M-12H]^{11-\bullet}})/ I_{[M-12H]^{12-}})$) en fonction de la puissance laser.

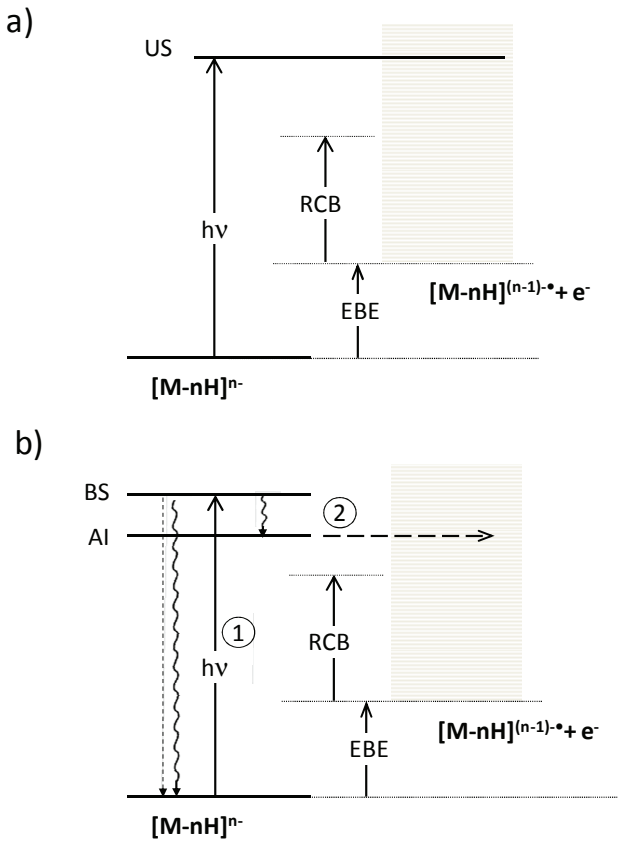


Figure III.3 Mécanismes de détachement d'électron en a) une étape vers le continuum, b) deux étapes par l'excitation électronique entre deux états liants suivie d'une relaxation menant à l'autoionisation de l'espèce [5]. RCB : barrière de répulsion coulombienne, EBE: énergie de liaison des électrons, BS : état liant, US : état non liant, AI : autoionisation.

Le photodétachement d'électron par un processus direct est dû à une transition électronique d'un état liant vers un état non liant après absorption d'un photon. Le détachement en deux étapes se traduit quant à lui par une transition électronique entre deux états liants, suivie d'une étape de relaxation vers un état autoionisant.

L'étude d'une série de peptides et de protéines réalisée par Joly et al. [6] a démontré que le taux de détachement d'électron en fonction de la longueur d'onde des photons incidents peut être directement comparé au spectre d'absorption en solution. Ainsi, comme nous pouvons le voir sur la *Figure III.4*, la courbe qui représente le taux de détachement d'électron pour l'ubiquitin $[M\text{-}7H]^{7-}$ est fortement dépendante de la longueur d'onde d'excitation. Or, selon la loi de Wigner [7], si l'électron est détaché directement vers le continuum, le taux de détachement augmenterait linéairement avec l'énergie, ce qui n'est pas le cas ici. Ces résultats illustrent donc le fait que dans l'UV, le détachement d'électron est un processus en

deux étapes dû à une excitation électronique résonante vers un état liant. Le croisement entre l'état excité ππ* et un état excité autoionisant mène alors à la formation d'une espèce radicalaire [5].

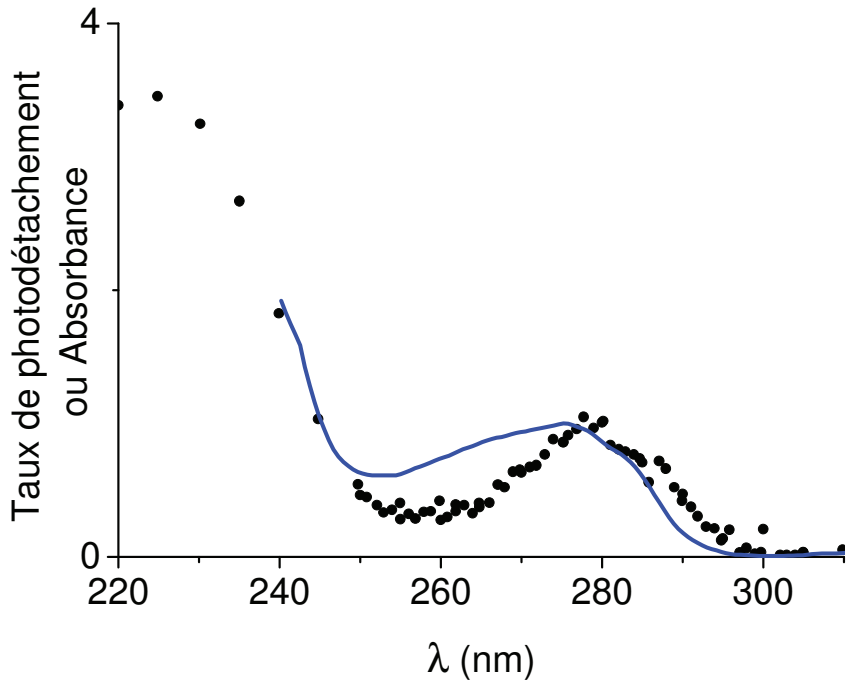


Figure III.4 Taux de photodétachement en fonction de la longueur d'onde pour l'ubiquitin $[M-7H]^{7-}$ (noir) et le spectre d'absorption en solution pour l'ubiquitin native (60/40 MeOH/H_20, pH = 6.5 (tampon acétate d'ammonium, 10 mM)) (bleu) [8].

Nous avons donc vu que le photodétachement d'électron peut avoir lieu sur une large gamme de longueurs d'onde, variant du visible au VUV. Les propriétés optiques des protéines en phase gazeuse ont été étudiées par L. Joly [1] et B. Bellina [8]. Nous allons dans ce chapitre utiliser le photodétachement d'électron comme sonde optique de protéines dans les domaines visible et VUV, domaines encore non explorés en phase gazeuse.

III.3. SPECTROSCOPIE D'ACTION DANS LE VISIBLE : LA BANDE SORET DU CYTOCHROME C

III.3.1. INTRODUCTION

Le cytochrome c est une hémoprotéine contenant un atome de fer relié à quatre groupes pyrroles au centre d'un anneau organique appelé porphyrine. Cet hème, lié de façon covalente à la chaine polypeptidique, augmente le degré de délocalisation des électrons et diminue par conséquent l'énergie nécessaire aux transitions électroniques permettant ainsi à ces protéines d'absorber également dans le visible. Les deux bandes d'absorption de l'hème dans le visible sont la bande de Soret autour de 400 nm et les bandes Q (Q_0 et Q_1) autour de 500 - 600 nm. Elles correspondent aux transitions électroniques π-π* (*Figure III.5*)

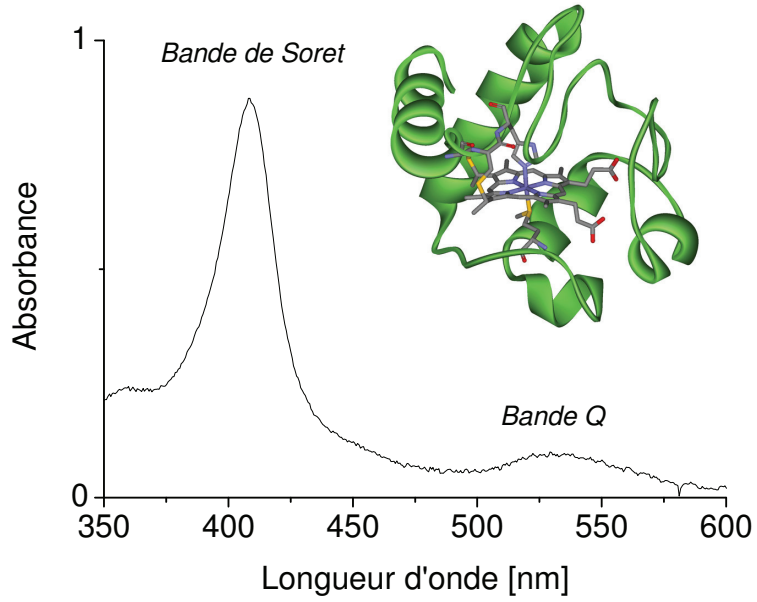


Figure III.5 Spectre d'absorption visible du cytochrome c (5µM, H2O/MeOH 20/80) et structure du cytochrome c (PDB 1HRC)

La présence de l'hème au sein de la protéine lui donne une couleur rouge-brun qui peut servir de sonde spectroscopie dans le visible [9-11]. Les bandes d'absorption caractéristiques du cytochrome c sont très sensibles à l'environnement autour de l'hème. Elles dépendent de l'état d'oxydation et de ligation de l'atome de fer ainsi que de la conformation de la protéine [11-15]. En solution, l'hème se situe dans une poche hydrophobique au centre de la protéine native. Les propriétés optiques du cytochrome c et de l'hème en solution ont déjà fait l'objet

de plusieurs publications tandis qu'en phase gazeuse, les études spectroscopiques ont principalement été réalisées sur l'hème seul [16-18]. Nielsen et ses collaborateurs ont montré qu'en phase gazeuse, l'absorption des bandes Q et de la bande de Soret du complexe [Fe(III)-Hème]$^+$, dont l'atome de fer lié à l'hème par quatre liaisons covalentes, est décalée d'environ 30 nm vers les plus basses longueurs d'onde comparé à l'absorption en solution du cytochrome c en condition native. Pour comprendre les effets dus à la ligation d'acides aminés au niveau de l'hème, des études spectroscopiques ont été réalisées sur des systèmes où l'hème est complexée à des acides aminés [16, 17].

La phase gazeuse permet de s'affranchir des effets solvatochromiques et d'analyser les propriétés intrinsèques de la protéine. Oomens et al. se sont intéressés aux spectres d'action de différents états de charge du cytochrome c dans l'infrarouge, sans pour autant trouver des informations structurelles [19]. L'utilisation de la spectroscopie d'action dans le domaine du visible permet d'étudier les changements de conformation ainsi que la dynamique associée au niveau de la bande de Soret ou des bandes Q [20]. Ainsi, pour comprendre les effets de l'environnement autour de la porphyrine et les décalages d'absorption associés, nous avons enregistré le spectre d'action de la bande de Soret du cytochrome c. Ce travail a donné lieu au premier spectre d'action dans le visible d'un complexe hème-protéine entière et intacte.

Le cytochrome c est une protéine de masse de 12228.2 uma comportant 104 acides aminés dont 13 résidus acides. Cette protéine est donc facilement déprotonable pour son étude en mode négatif. Les conditions expérimentales choisies (10/90 MeOH/H_20) permettent d'observer la protéine par spectrométrie de masse, dans sa conformation repliée *(Figure III.6*). Lorsque la protéine est dépliée, les états de charge varient du 18- au 8-.

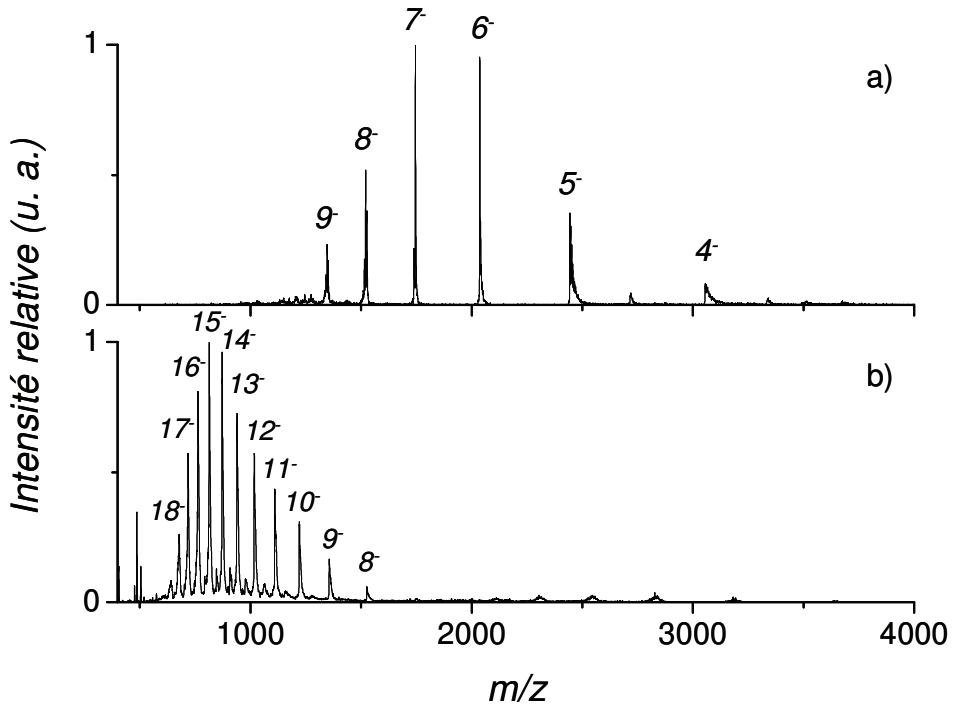
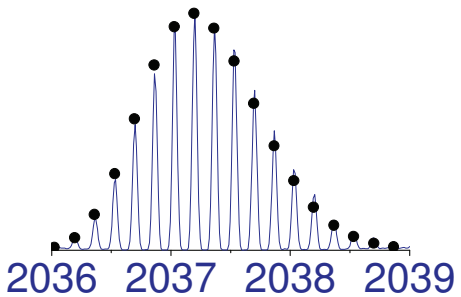
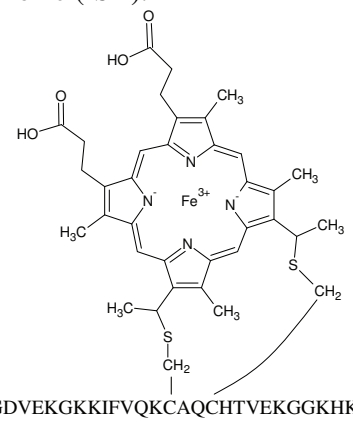


Figure III.6 Spectre de masse du cytochrome c dans sa conformation a) native et b) dénaturée

Pour déterminer l'état d'oxydation du fer, nous avons comparé la distribution isotopique théorique et expérimentale. Ceci nécessite l'utilisation d'un spectromètre de masse à haute résolution et indiquant la masse exacte. Cette expérience a donc été réalisée sur un Q Exactive (Thermo), récemment acquis par J. Lemoine (ISA).





Ac-GDVEKGKKIFVQKCAQCHTVEKGGKHKTGPNLHGLFGRKT
GQAPGFSYTDANKNKGITWGEETLMEYLENPKKYIPGTKM
IFAGIKKKGEREDLIAYLKKATNE-CO_2H

Figure III.7 A gauche : distribution isotopique du cytochrome c 6- théorique (point noir) et expérimental (bleu) indiquant que l'atome de fer est présent sous sa forme oxydée Fe(III). A droite : structure de l'hème et séquence du cytochrome c (cœur de bœuf).

Par comparaison avec la distribution isotopique théorique, l'expérience montre que l'atome de fer est sous son degré d'oxydation +III [21, 22]. L'isolation et l'irradiation du cytochrome c $[M\text{-}6H]^{6-}$ dans le visible provoquent le détachement d'un électron et la formation de l'espèce radicalaire $[M\text{-}6H]^{5-\bullet}$. Aucun autre fragment n'est observé. L'évolution du détachement à 415 nm en fonction de la puissance laser montre que le processus est monophotonique. Le spectre d'action est montré dans la *Figure III.8* :

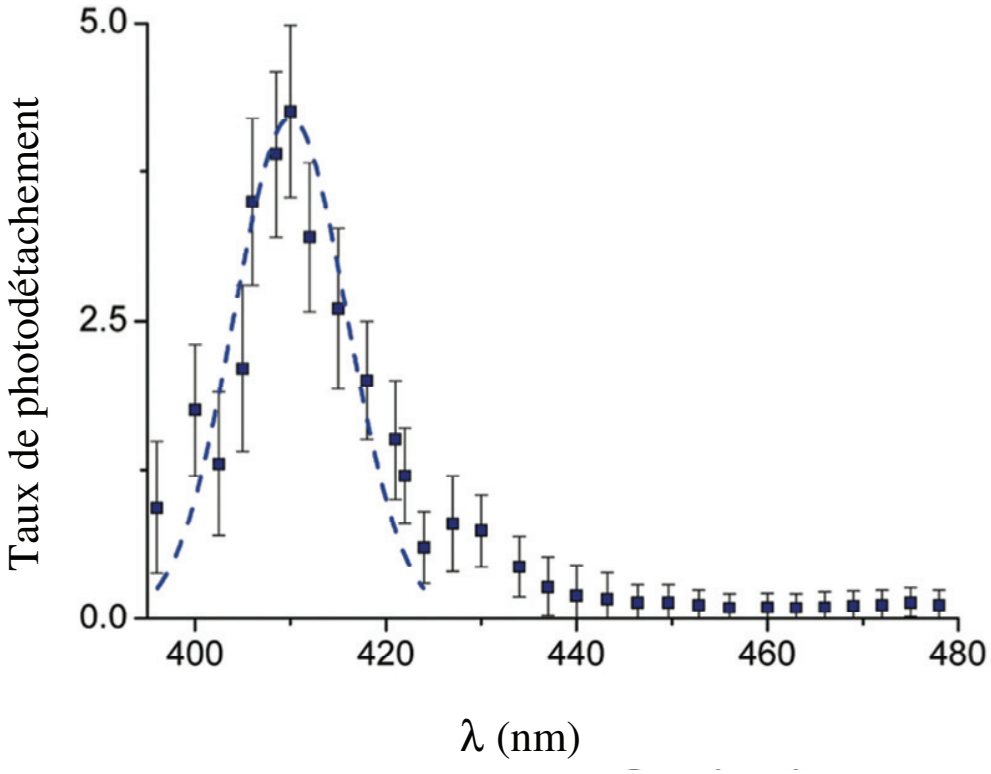


Figure III.8 Taux de photodétachement d'électron du cytochrome c $[M\text{-}6H]^{6-}$ ($\sigma = \ln((parent + fragments)/parent)/(P*\lambda)$) en fonction de la longueur d'onde. La courbe en pointillé est un ajustement gaussien des points expérimentaux (pour guider l'œil)

III.3.2. DETACHEMENT DE L'ELECTRON

L'hème est responsable de l'absorption à 410 nm (bande de Soret). Cette bande correspond à la transition ππ* de la porphyrine. En solution, la relaxation électronique se fait par transfert de charge entre porphyrine et l'orbitale d de l'atome de fer (transfert de charge entre le ligand

et le métal : LMCT). En phase gazeuse, on observe un détachement d'électron, qui peut provenir soit du complexe [Hème-Fe(III)], soit de la chaine peptidique.
La relaxation LMCT vers l'orbitale d partiellement occupée du fer est très favorable [23] et certainement plus rapide que le couplage entre l'état excité S2 et un état ionisant qui provoquerait le détachement d'électron à partir de la porphyrine avant le transfert de charge entre le ligand et le métal. Or, les potentiels d'ionisation des porphyrines contenant un atome de fer ont été estimés à environ 6 ± 0.5 eV selon le ligand [24, 25], valeur qui est largement supérieure à l'énergie d'excitation. Mais ici, la molécule est fortement chargée et les répulsions coulombiennes entre les électrons présents sur l'orbitale d de l'atome de fer et les charges négatives portées par la protéine entrainent la diminution de la BE. L'émission d'électron peut alors se produire par effet tunnel à travers la RCB [3, 26-28].

Une autre hypothèse qui peut expliquer le détachement est le transfert d'excitation de la porphyrine vers la chaine peptidique, ce qui provoquerait le départ d'un électron à partir des charges négatives portées par le squelette peptidique. En effet, les charges sont portées par les groupements carboxylates où l'énergie de liaison des électrons est beaucoup plus faible. Bien que l'affinité électronique du groupement COO soit estimée à ~3.5 eV [29], la BE des espèces multidéprotonées est beaucoup plus faible et d'environ 0.9 eV dans le cas du cytochrome c $[M-6H]^{6-}$ [30], valeur inférieure à l'énergie d'un photon de 410 nm (~ 3 eV). Le photodétachement est alors réalisable. Le transfert d'énergie entre l'hème et le tryptophane est très efficace pour le cytochrome c [23, 31, 32] ce qui rend alors le photodétachement à partir d'un groupe carboxylate possible. Selon une étude réalisée en collaboration avec l'équipe de Kappes dans l'UV, cette dernière hypothèse serait la plus probable [30]. Cependant, le processus de relaxation après excitation de la bande de Soret peut être différent et il est difficile de conclure définitivement.

III. 3.3. SPECTRE OPTIQUE

Le spectre optique montre une bande d'absorption centrée à 410 mn, avec un épaulement à 428 nm (*Figure III.8*). L'absorption est due à l'excitation de la porphyrine et plus précisément, dans le cas de la bande de Soret, à une transition $\pi\pi^*$ S2 ← S0 [20].
Ce spectre a été comparé avec le spectre d'absorption en phase gazeuse du $[Fe(III)\text{-Hème}]^+$ (avec l'atome de fer lié à l'hème par quatre liaisons covalentes) [17] (*Figure III.9* A).

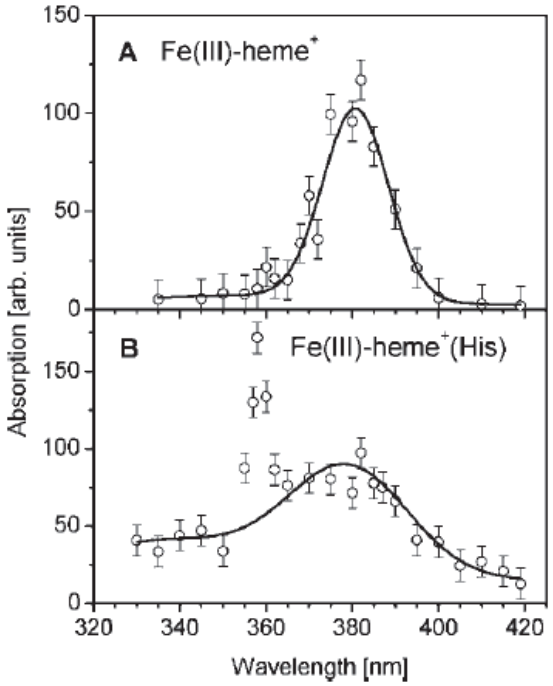


Figure III.9 Spectre d'absorption en phase gazeuse des complexes [Fe(III)-Hème]$^+$ (A) et [Fe(III)-Hème(His)]$^+$(B) [17]

Pour ce complexe, la bande d'absorption est observée à 380 nm. La liaison entre l'hème et la protéine entière induit un décalage de 30 nm, alors que lorsque ce complexe est lié à une histidine, seul un très faible décalage est observé. Pour restaurer les propriétés optiques de l'hème au sein de son environnement protéique, la simple analyse de l'hème lié à un acide aminé semble alors insuffisante. En effet, la liaison entre l'hème et la protéine modifie l'état de ligation du fer, la géométrie de l'hème et également le nombre de charges présentes autour du groupe optiquement actif.

Ce spectre a également été comparé aux spectres en solution des deux conformations repliée et dépliée du cytochrome c à pH 5. Les bandes d'absorption sont observées à 409 et 399 nm respectivement, comme illustré sur la *Figure III.10* :

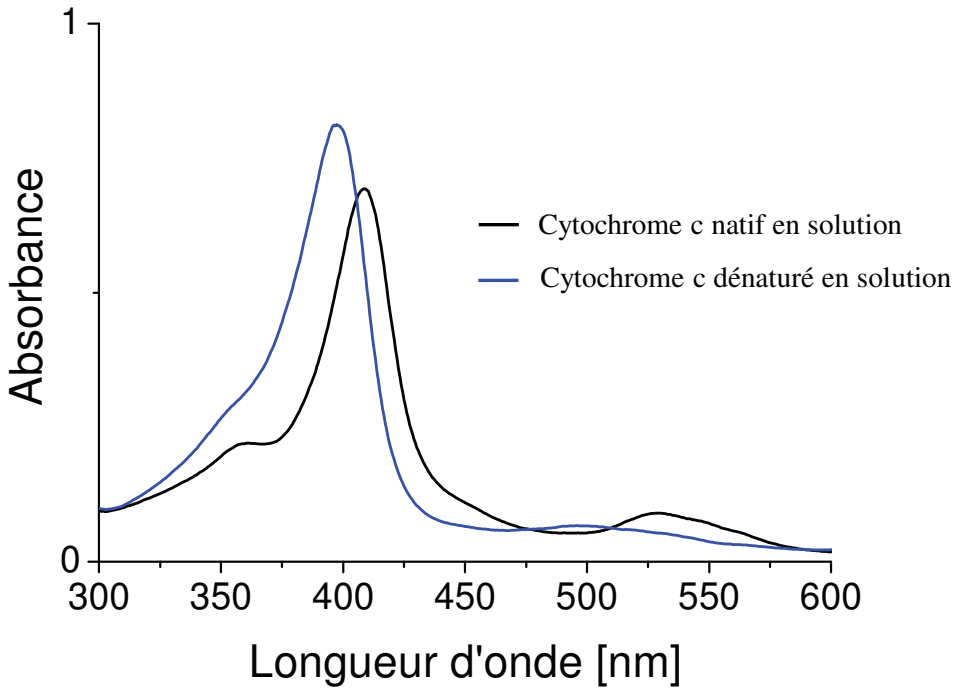


Figure III.10 Changement dans les absorbances de la bande de Soret du cytochrome c (10 µM) associé à la dénaturation de la protéine par la guanidine HCl (6.2 M, pH 5).

Le pI du cytochrome c est d'environ 10.5 donc à pH 5, la protéine est positivement chargée mais les charges sont écrantées par les ions libres en solution (solvants et contre-ions). La bande d'absorption de la protéine native en solution est très proche de celle enregistrée pour le cytochrome c en phase gazeuse. Ceci montre que les conformations de la protéine native en solution et en phase gazeuse sont très similaire et que l'état de ligation du fer est conservé. Ces résultats montrent également qu'en solution, la chaîne polypeptidique protège le chromophore du solvant, sinon un décalage dans l'absorption aurait été observé. Cependant la bande d'absorption du spectre en solution est plus large que celle enregistrée en phase gazeuse, bien que le chromophore soit situé dans une poche hydrophobe. En phase gazeuse, les couplages anharmoniques avec les modes de vibration, la flexibilité et l'hétérogénéité conformationnelle des protéines peuvent induire des distorsions de l'hème et ainsi provoquer des modifications du champ électrique autour de ce groupement [33]. Or même de légers changements dans la position des atomes du groupe prosthétique ou des atomes voisins de ce groupement optiquement actif modifient les propriétés d'absorption de la protéine [34]. En solution, en plus des effets dus aux vibrations de la molécule, les changements dans la conformation de la protéine peuvent également être dus aux interactions avec le solvant. Les mouvements anharmoniques du solvant peuvent être efficacement transmis aux mouvements du complexe métallo-porphyrine par des interactions non covalentes [35]. De plus, un

changement de l'environnement diélectrique (solvant, ligand…) peut entrainer une modification des charges partielles et totales portées par la protéine et ainsi modifier la conformation de la protéine et les transitions électroniques. Ces résultats soulignent l'influence du solvant qui peut avoir un effet sur l'élargissement de la bande en solution.

En phase gazeuse, plusieurs isomères du cytochrome c 6- coexistent [30, 36, 37]. Les changements de conformation de la protéine modifient la géométrie de la porphyrine et la structure électronique du complexe et en changent ainsi l'absorption [38]. L'épaulement observé dans la bande aux alentours de 427 nm peut être dû à la cœxistence de plusieurs isomères avec des positions de bande de Soret différentes. En phase gazeuse, la bande d'absorption est relativement fine et le spectre serait ainsi suffisamment résolu pour observer cet épaulement, comme illustré sur la *Figure III.8*.

III.3.4. CONCLUSION

Les expériences réalisées en phase gazeuse ont montré l'importance des interactions entre l'hème et son environnement protéique. L'excitation du cytochrome c à 415 nm provoque le détachement d'un électron, ce qui nous a permis d'enregistrer le spectre d'action du cytochrome c 6- en phase gazeuse. Le spectre est proche de celui obtenu en solution mais fortement décalé de celui du complexe $[Fe(III)\text{-Hème}]^+$ enregistré en phase gazeuse. Ces résultats montrent que l'environnement de la protéine en phase gazeuse est très proche de celui en solution et que l'enveloppe hydrophobe dans laquelle se trouve l'hème la protège ainsi des interactions avec le solvant. L'étude de l'influence de l'état de charge sur les propriétés électroniques et structurelles des protéines en phase gazeuse requière la séparation préalable des différents conformères par mobilité ionique et pourrait orienter ce travail vers de nouvelles perspectives.

III.4. SPECTROSCOPIE D'ACTION DANS LE VUV : CAS DE L'INSULINE.

III.4.1. INTRODUCTION

Le rayonnement VUV démarre à des énergies de photons supérieures à 6.2 eV ($\lambda < 200$ nm). Le domaine d'énergie entre 6 et 20 eV correspond à l'énergie nécessaire pour atteindre le premier potentiel d'ionisation de tout atome ou molécule neutre. L'absorption de ces radiations VUV par les protéines peut provoquer de la luminescence, de la photodestruction ou de la photoionisation à l'origine de l'inactivité des protéines et donc de pertes partielles de leurs activités biologiques.

Comme nous montre la *Figure III.11* qui représente les différentes transitions électroniques observables dans l'UV et le VUV, la nature des excitations dans le VUV de ~10 à 15 eV reste encore un domaine inconnu.

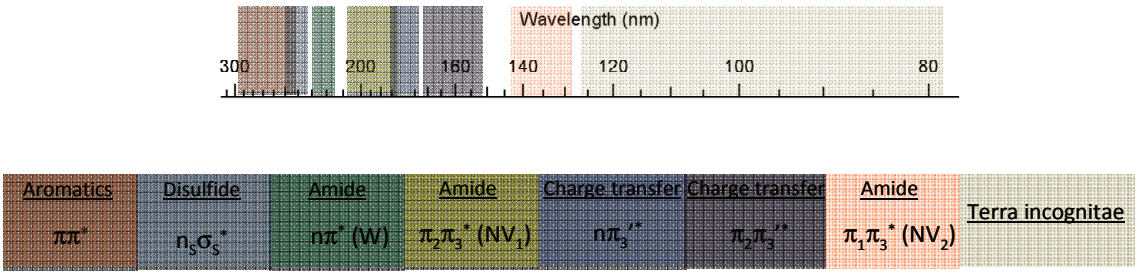


Figure III.11 Les transitions électroniques dans l'UV et dans le VUV (80 - 300 nm)

Il nous a donc semblé intéressant d'étudier des processus d'excitation VUV et de photodétachement des biomolécules en phase gazeuse pour comprendre leur réponse à l'irradiation et au stress oxydant. Notons également que des lasers VUV (193 et 157 nm) sont de plus en plus utilisés pour fragmenter les peptides et les protéines. Une meilleure connaissance des propriétés optiques dans le VUV de ces molécules est ainsi nécessaire.

Pour cela, nous avons utilisé le couplage entre le rayonnement synchrotron et la spectrométrie de masse qui nous a permis d'enregistrer des spectres d'action de protéines entières dans le VUV grâce à la possibilité d'obtenir des photons à haute énergie (>10 eV) et à fort flux. Nous avons également pu observer pour la première fois, le double détachement

d'électrons direct à partir d'une biomolécule. Ces expériences, réalisées sur l'insuline, seront détaillées dans les paragraphes suivants.

Dans l'UV, l'irradiation des protéines se traduit principalement par l'excitation ππ* des acides aminés aromatiques. Dans le VUV, les photons possèdent une énergie importante et d'autres transitions électroniques peuvent alors être observées. L'excitation des protéines conduit aux transitions ππ*, nπ* et aux transitions des orbitales n et π vers les orbitales de Rydberg. Après l'absorption d'un photon VUV (6 – 16 eV), les polyanions relaxent également principalement par détachement d'électrons [39-41]. Dans ce domaine de longueur d'onde, les photons incidents possèdent une haute énergie et l'irradiation d'une protéine multidéprotonnée peut provoquer la perte de plusieurs électrons, comme illustré sur la *Figure III.12* :

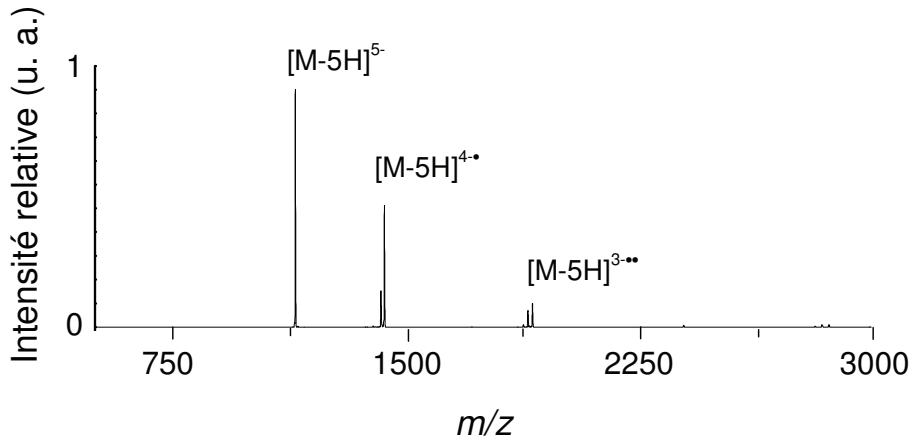


Figure III.12 Spectre EPD de l'insuline obtenu après 400 ms d'irradiation VUV à 14 eV. L'insuline a été injectée à 5 µl.min^{-1} à partir d'une solution à 12 µM (50 : 50 ACN/H_2O).

La *Figure III.12* représente le spectre de masse obtenu après 400 ms d'irradiation à 14 eV de l'insuline $[M\text{-}5H]^{5-}$. Cette petite protéine est constituée de deux chaines (la chaine A comporte 21 acides aminés, la B 30 acides aminés) reliées entre elle par deux ponts disulfures. La séquence est donnée dans la *Figure III.13* :

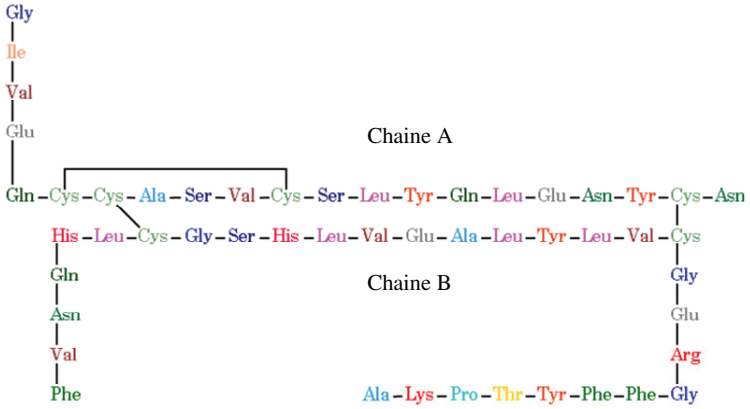


Figure III.13 Structure primaire de l'insuline.

Les ions fragments observés après irradiation VUV de l'espèce $[M-5H]^{5-}$ correspondent aux espèces radicalaires $[M-5H]^{4-\bullet}$ et $[M-5H]^{3-\bullet\bullet}$, issus de la simple et la double perte d'électrons. Dans le paragraphe suivant, nous allons étudier l'influence de l'état de charge de l'insuline sur les spectres de photodétachement ainsi que la dépendance du multiple détachement d'électrons de l'insuline 5- en fonction de l'énergie des photons dans le VUV.

III.4.2. INFLUENCE DE L'ETAT DE CHARGE DE L'INSULINE SUR L'EFFICACITE DU PHOTODETACHEMENT D'ELECTRON

Le taux de photodétachement d'électron en fonction de la longueur d'onde a été enregistré pour les états de charge 3-, 4- et 5- de l'insuline dans la gamme 6 – 16 eV (*Figure III.14*).

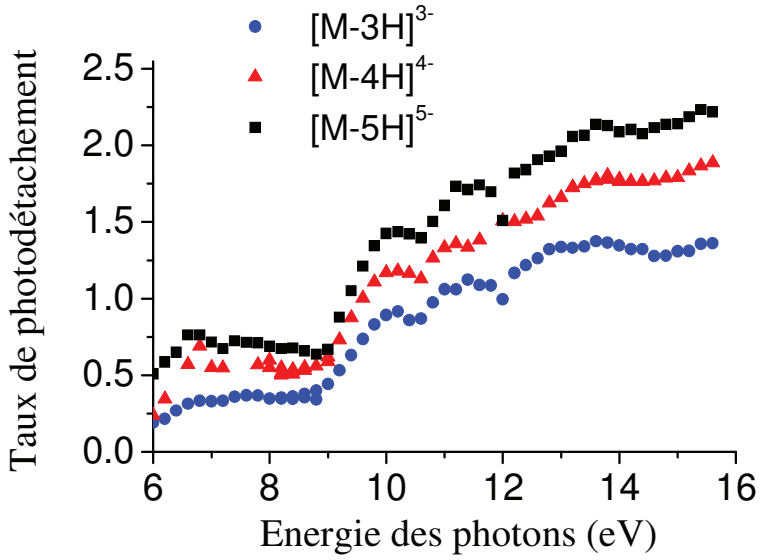


Figure III.14 Taux de photodétachement de l'insuline en fonction de l'énergie des photons pour trois différents états de charge $[M-3H]^{3-}$, $[M-4H]^{4-}$, $[M-5H]^{5-}$.

Les spectres d'action des différents états de charge possèdent une bande d'absorption similaire centrée à 7 eV, puis l'absorption croit de 9 à 16 eV (*Figure III.14*). Ces excitations sont dues aux transitions nπ* et ππ*, ainsi qu'aux transitions provenant des orbitales moléculaires n et π vers les orbitales de Rydberg, suivies d'une étape d'autoionisation [40, 41]. Dans la gamme de VUV, l'ionisation peut également se faire directement vers le continuum [42]. A 6 eV, le détachement ne peut que provenir des groupements négativement chargés. En mode positif, la photoionisation [43] et l'électroionisation [44] ont été observées pour des énergies supérieures à 12 eV. Plus précisément, l'ionisation du cytochrome c 8+ et 11+ menant à la formation des espèces radicalaires 9+ et 12+ se fait à 12.75 eV et 13.51 eV, respectivement [45]. Pour l'état de charge 3+ de la chaine B de l'insuline, l'énergie incidente doit être supérieure à 13.3 eV pour ioniser la molécule. Ceci explique l'allure de la courbe au-dessus de 12 eV. En effet, à ces énergies, le détachement d'électron peut être initié à partir d'autres orbitales que celles des groupes négatifs (carboxylates) portés par la protéine et notamment l'ionisation directe peut avoir lieu (*Figure III.3*a).

La *Figure III.14* montre que le taux de détachement dépend de l'état de charge de la protéine. Plus la protéine est chargée, plus le taux de photodétachement augmente. En effet, l'augmentation du nombre de charge sur la protéine est corrélée au nombre d'électrons qui peuvent en être détachés. De plus, comme nous l'avons vu précédemment, plus la protéine

est chargée, plus l'énergie de liaison des électrons décroît [46]. Ces deux paramètres expliquent l'augmentation du taux de détachement en fonction du nombre de charges portées par la protéine. Notons cependant que l'augmentation de la densité de charge influence uniquement le taux de photodétachement et conduit à la même structuration en bandes pour l'insuline.

III.4.3. DEPENDANCE DU MULTIPLE DETACHEMENT D'ELECTRON DE L'INSULINE EN FONCTION DE L'ENERGIE DES PHOTONS DANS LE VUV : DOUBLE DETACHEMENT DIRECT

Dans le domaine du VUV, l'irradiation d'une protéine multidéprotonnée peut provoquer la perte de plusieurs électrons, comme illustré sur la *Figure III.12* [39-41]. L'émission de deux électrons peut provenir de différents mécanismes [47, 48] :

- L'absorption d'un photon suivit d'une double ionisation de la couche de valence (excitation bi-électronique). Un seul photon peut alors exciter la molécule qui relaxe par l'émission de deux électrons corrélés.

$$[M^{n-}] \xrightarrow{h\nu} [M^{(n-2)-\bullet\bullet}] + 2e^{-} \qquad (2)$$

Le double détachement peut également se faire par excitation/ionisation à partir d'une couche interne par l'effet Auger (*Figure III.15*) qui émet un second électron :

$$[M^{n-}] \xrightarrow{h\nu} [M^{(n-1)-\bullet}] + e_1^{-} \xrightarrow{effet\ Auger} [M^{(n-2)-\bullet\bullet}] + e_2^{-} \qquad (3)$$

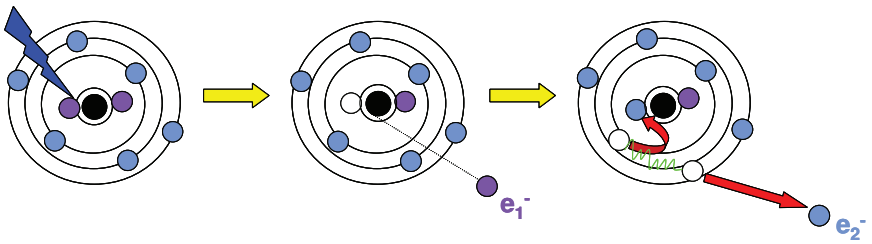


Figure III.15 Principe de l'effet Auger

Par exemple, dans le VUV, les études réalisées sur Li^- par faisceaux croisés au synchrotron ont montré que la formation de l'ion Li^+ par double détachement était principalement due à

l'éjection d'un électron de l'orbitale 1s suivie par l'émission d'un second électron par l'effet Auger [49]. Dès lors, des études théoriques et expérimentales sur le détachement d'électrons à partir des couches internes ont été réalisées sur des polyanions et sur des clusters négativement chargés [50, 51].

La double émission peut également provenir de l'émission séquentielle des électrons après l'absorption de deux photons indépendants par des processus linéaire ou non linéaire.

$$[M^{n-}] \xrightarrow{h\nu} [M^{(n-1)-\bullet}] + e^- \xrightarrow{h\nu} [M^{(n-2)-\bullet\bullet}] + e^- \xrightarrow{h\nu} [M^{(n-3)-\bullet\bullet\bullet}] + e^- \ldots \qquad (4)$$

Il est clair que lors de l'excitation de l'insuline avec un photon à 14 eV, le photodétachement peut provenir à la fois de façon directe et séquentielle

Nous avons étudié le mécanisme de photodétachement par spectroscopie optique de l'insuline négativement chargée dans la gamme du VUV. Comme décrit précédemment, la *Figure III.12* représente le spectre de masse obtenu après 400 ms d'irradiation à 15 eV de l'insuline $[M\text{-}5H]^{5-}$. L'ion fragment observé à 1431.6 Da correspond à l'espèce radicalaire $[M\text{-}5H]^{4-\bullet}$, issue du détachement d'un électron. Le pic observé à 1909 Da représente l'ion $[M\text{-}5H]^{3-\bullet\bullet}$ qui correspond à la perte de deux électrons à partir de l'ion parent $[M\text{-}5H]^{5-}$. Les sections efficaces relatives, normalisées par le flux de photons, sont illustrées dans la *Figure III.16.*

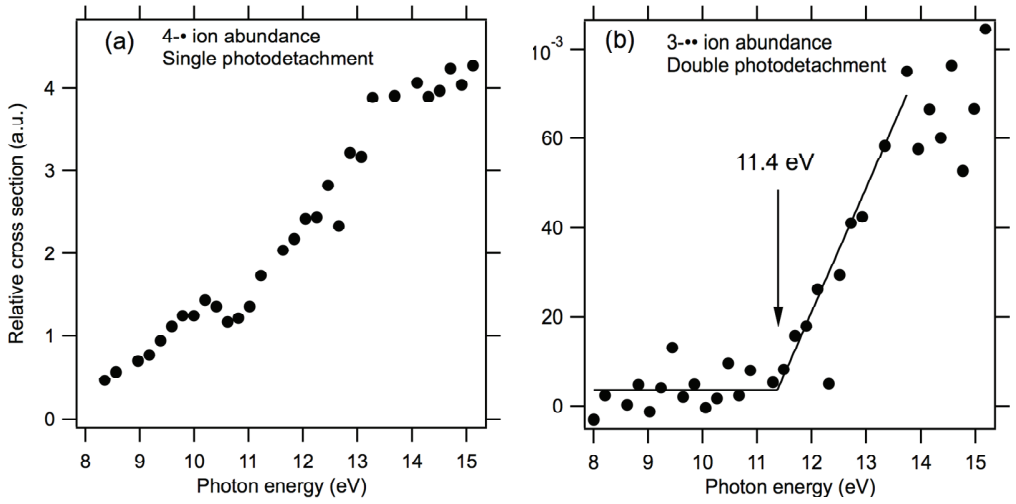


Figure III.16 Sections efficaces relatives pour a) le simple photodétachement et b) le double détachement obtenues dans la gamme 8 – 15.2 eV avec un temps d'irradiation de 90 ms.

La *Figure III.16* a) correspond à l'espèce $[M\text{-}5H]^{4-\bullet}$. Le photodétachement d'un électron est initié aux alentours de 4 eV, énergie qui correspond à l'absorption du résidu tyrosine [52]. Aux alentours de 10 eV, une légère bande est observée. Des études préalablement réalisées sur des peptides ont montré que cette bande peut correspondre aux états hautement excités du squelette peptidique [53].

La *Figure III.16* b) correspond à l'espèce $[M\text{-}5H]^{3-\bullet\bullet}$ obtenue par double détachement d'électron. Un palier est observé jusqu'à 11 eV puis une nette cassure qui correspond à l'énergie du double détachement apparaît à environ 11.4 eV. Bien que l'évolution de la section efficace relative suggère le double détachement direct, un autre mécanisme peut expliquer l'observation de l'espèce $[M\text{-}5H]^{3-\bullet\bullet}$. L'absorption d'un photon peut conduire à la formation de l'espèce $[M\text{-}5H]^{4-\bullet}$ qui, à son tour, peut réabsorber un photon pour donner l'espèce $[M\text{-}5H]^{3-\bullet\bullet}$. Pour vérifier cela, nous avons enregistré l'abondance de cet ion en fonction du temps d'irradiation à 8 et 15 eV (*Figure III.17*).

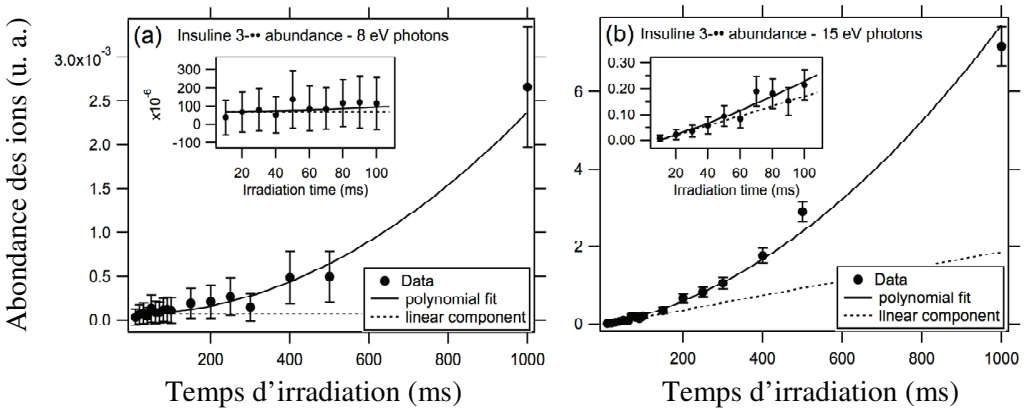


Figure III.17 Abondance de l'ion $[M\text{-}5H]^{3-\bullet\bullet}$ issu du double photodétachement de l'insuline $[M\text{-}5H]^{5-}$ à (a) 8 eV et (b) 15 eV, enregistré en fonction du temps d'irradiation entre 10 et 1000 ms. Les données ont été ajustées par un polynôme du 2nd degré : $a+bt+ct^2$, avec a, b et c comme coefficients et t, le temps d'irradiation. La ligne pointillée représente le composant linéaire a+ bt de la courbe d'ajustement.

L'augmentation de l'intensité de l'ion $[M\text{-}5H]^{3-\bullet\bullet}$ en fonction du temps d'activation à 8 et 15 eV montre que pour des forts temps d'activation (>90 ms), le double détachement est multiphotonique.

Les intensités des ions produits ont été ajustées pour chacune des énergies (légende *Figure III.17*). Lorsque l'énergie du photon est de 8 eV, la partie linéaire de la fonction est plate et possède une intensité proche de 0. Ceci démontre que l'observation d'un double détachement à cette énergie (et par extension aux énergies inférieures à 11.4 eV) provient d'un processus multiphotonique. Par contre, à 15 eV, pour des temps d'irradiation courts (< 100 ms), l'intensité de l'ion est ajustée par une fonction linéaire. Dans cette gamme de temps, le double détachement est donc issu d'un processus direct. Par contre, à plus haut temps d'irradiation, l'intensité de l'espèce oxydée sort du régime linéaire et le détachement séquentiel est favorisé. Ainsi, l'évolution de la section efficace observée sur la *Figure III.17* montre que la rupture de section efficace à 11.4 eV est uniquement dû à un processus de détachement direct.

III.4.4. CONCLUSION

Les expériences de spectroscopie optique réalisées sur l'insuline $[M\text{-}3H]^{3-}$, $[M\text{-}4H]^{4-}$, $[M\text{-}5H]^{5-}$ nous a permis d'observer l'influence de l'état de charge de la protéine sur l'efficacité de photodétachement d'électron dans le VUV. Plus la protéine est chargée, plus le processus est efficace. En effet, l'augmentation du nombre de charge implique une augmentation du nombre d'électrons susceptibles d'être détachés. De plus, les répulsions entre charges diminuent la barrière énergétique pour éjecter un électron.

Nous avons également observé, pour la première fois sur une protéine anionique, un double détachement d'électrons issu d'un processus direct. Un seuil à 11.4 eV est observé. L'absorption d'un photon suffit alors à exciter la molécule qui relaxe par l'émission de deux électrons.

$$[M^{n-}] \xrightarrow{h\nu} [M^{(n-2)-\bullet\bullet}] + 2e^-$$

Ce processus est en compétition avec le processus successif, qui devient ensuite majoritaire à long temps d'activation.

Une collaboration avec Denis Duflot de Lille a démarré pour mieux comprendre l'origine de ce double détachement direct (et notamment l'importance des excitations multiélectroniques).

III.5. SPECTROSCOPIE DE PHOTOELECTRON

III.5.1. INTRODUCTION

Jusqu'à présent nous avons utilisé la spectroscopie d'action pour analyser les processus d'excitation et de photodétachement des protéines en sondant leurs propriétés optiques.

La spectroscopie de photoélectron est une technique qui permet quant à elle d'analyser les propriétés de l'électron éjecté selon son énergie cinétique. En déterminant expérimentalement l'énergie cinétique des électrons, il est possible d'en extraire l'énergie de liaison de l'électron, la barrière de répulsion Coulombienne ainsi que l'affinité électronique. Cette technique, couplée à la mobilité ionique, va nous permettre de corréler l'énergétique de l'électron éjecté aux propriétés structurelles des protéines.

Les études préalables réalisées par Laure Joly à Karlsruhe, en collaboration avec l'équipe du professeur Kappes, et plus étroitement avec Oli T. Ehrler and Katerina Matheis ont porté sur l'étude de la gramicidine A. Il a ainsi été possible d'obtenir des informations sur la localisation des charges portées par ce peptide et sur l'énergie globale nécessaire à la perte d'un électron. Grace à la spectroscopie de photoélectron, elle a pu estimer la distance entre les charges en accédant à la barrière de répulsion coulombienne. Elle en a également déduit les différents processus d'émission lors du détachement d'électron à partir de la forme de la courbe du spectre de photoélectron. Elle a ainsi pu établir que pour les longueurs d'onde 266 et 355 nm, l'émission d'électron se fait en deux étapes tandis qu'à plus haute énergie du photon 5.82 eV (213 nm), la forme de la bande ainsi que les structures observées penchent vers une compétition entre l'émission directe et l'émission retardée [42].

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux spectres de photoélectron d'une protéine entière, le cytochrome c. Comme les protéines sont des systèmes flexibles, différents conformères existent pour chaque état de charge. La séparation préalable des différents conformères a été réalisée grâce à la mobilité ionique. Le couplage entre la PES et l'IMS permet d'étudier la stabilité et la structure électronique des différents isomères en fonction de leur état de charge et de leur conformation [54]. Le montage permet de déterminer l'énergie

cinétique de l'électron (EKE). L'énergie de liaison des électrons est déduite de la relation hν = EKE + BE. Enfin, en admettant que toutes les charges soient localisées sur les groupements carboxylates par un système de charges ponctuelles, la détermination de la barrière de répulsion coulombienne résulte de l'équation BE + RCB = 3.49 eV [3, 4, 55, 56] .

Nous allons étudier le comportement d'un système possédant un excès de charges négatives et donc de fortes répulsions électrostatiques en phase gazeuse. Nous nous intéresserons particulièrement à l'influence de la conformation de la protéine sur l'énergie de liaison des électrons, conformation qui dépend fortement des interactions électrostatiques. Des études ont montré que plus la conformation de la protéine est étendue, plus le nombre de charges portées par cette dernière peut être important. En effet, la distance entre les charges augmente ce qui diminue la force de répulsion coulombienne [57-59]. Ceci peut entraîner une fluctuation de la distribution d'énergie sur le spectre de photoélectron. Quand la répulsion coulombienne est plus forte que l'affinité électronique de l'électron, des polyanions métastables avec une EBE négative peuvent être observés. Ce phénomène a été observé sur des molécules possédant une très forte densité de charge [26].

III.5.2. IMS PES DU CYTOCHROME C

Cette étude décrit la première expérience de spectroscopie de photoélectrons sur les différents conformères du cytochrome c portant un grand nombre de charges négatives, variant de 5 à 12-. La solution de cytochrome c infusée est une solution à 250 µM (4 : 1 MeOH/H_2O). Selon les états de charge désirés, le pH a été ajusté avec du KOH. Pour chaque état de charge, la mobilité ionique a permis de séparer les différents conformères.

La *Figure III.18* illustre les temps d'arrivée des différents conformères séparés par IMS ainsi que les spectres de photoélectrons correspondant à chaque isomère.

Les spectres IMS montrent que pour les états de charge 6-, 7- et 8-, trois conformères coexistent en phase gazeuse. Plus les protéines ont une conformation dépliée, plus la friction avec le gaz tampon (hélium) contenu dans la cellule de dérive est importante et par conséquent, plus les temps d'arrivée seront longs. L'augmentation de l'énergie d'injection des ions (courbe orange sur la *Figure III.18*) favorise l'obtention du conformère avec la

conformation la plus étendue (conformère C). Comme illustré sur la Figure III.18, les spectres PES obtenus dépendent de la conformation de la protéine et de l'état de charge. L'énergie de liaison des électrons diminue lorsque l'état de charge augmente.

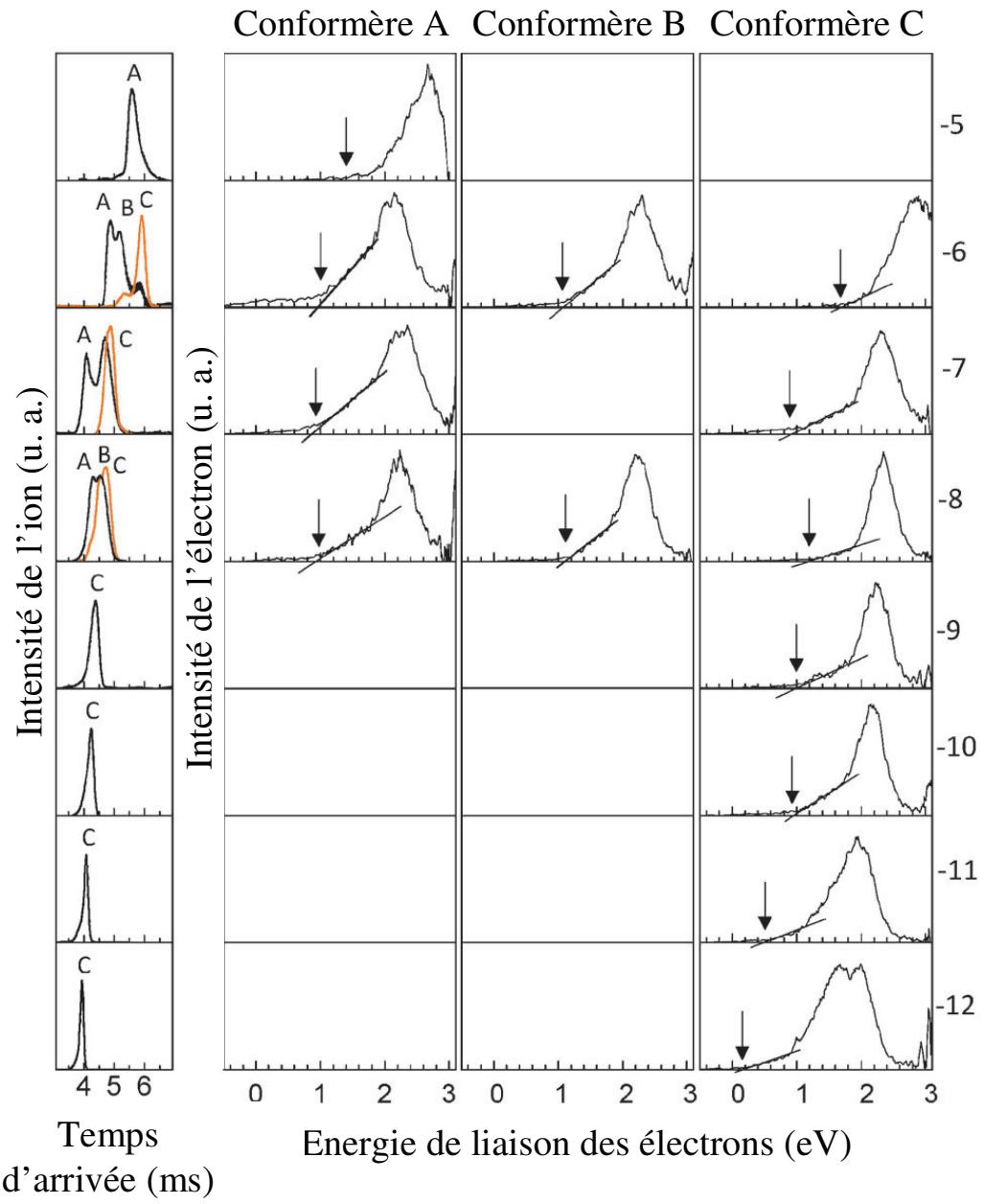


Figure III.18 La colonne de gauche représente la distribution des temps d'arrivée des différents conformères du cytochrome c pour des états de charge variant de $[M-5H]^{5-}$ à $[M-12H]^{12-}$ séparés par mobilité ionique. La courbe orange a été obtenue avec une énergie d'injection des ions plus importante. Les colonnes de gauche représentent le spectre de photoélectron obtenu expérimentalement à 266 nm pour chaque conformère. La flèche indique les affinités électroniques obtenues par extrapolation linéaire de l'énergie de liaison.

L'extrapolation linéaire des énergies de liaison pour chaque isomère reste positive même pour l'état de charge 12- (*Figure III.19*).

États de charge	Conformère	Section efficace de collision dans l'azote (hélium)/Å²	AEA/eV
5–	A	1497 (1226)	1.40 ± 0.2
6–	A	1554 (1267)	0.90 ± 0.2
	B	1637 (1328)	1.05 ± 0.2
	C	1913 (1529)	1.62 ± 0.2
7–	A	1706 (1378)	0.90 ± 0.2
	B	1991 (1586)	0.90 ± 0.2
8–	A	2087 (1657)	0.95 ± 0.2
	B	2239 (1767)	1.10 ± 0.2
	C	2368 (1862)	1.20 ± 0.2
9–	C	2573 (2011)	1.00 ± 0.2
10–	C	2761 (2149)	0.95 ± 0.2
11–	C	2935 (2276)	0.50 ± 0.2
12–	C	3071 (2375)	0.15 ± 0.2

Figure III.19 Sections efficaces de collision dans l'azote (et dans l'hélium) et affinités électroniques obtenues pour chaque conformère des 8 états de charge du cytochrome c.
La conversion des valeurs dans l'hélium a été réalisée en corrélant les sections efficaces de collision du cytochrome c obtenues dans l'hélium par Clemmer et al.[37] à celles obtenues dans l'azote lors de cette étude. $(\sigma(He) = 0.730 * \sigma(N_2)+133)$

Plus la protéine est chargée, plus les répulsions coulombiennes entre charges augmentent. Donc si BE_0 est l'affinité électronique pour une molécule neutre et RCE, l'énergie de répulsion coulombienne entre électrons d'une protéine multichargée, l'énergie de liaison d'un électron sur un polyanion est de :

$$BE = BE_0 - RCE \qquad (5)$$

Ainsi lorsque la RCE augmente, la BE diminue. Pour valider cette équation, il faut admettre que toutes les charges sont localisées sur les groupements carboxylates par un système de charges ponctuelles (RCE = RCB).
La valeur de RCE est alors donnée par :

$$RCE = \frac{1}{\varepsilon}\sum_{\substack{i=1 \\ i\neq j}}^{N}\frac{e^2}{R_{ij}} \qquad (6)$$

Avec R_{ij} la distance entre deux charges, e la charge élémentaire et ε, la constante diélectrique. Ainsi, plus la conformation est dépliée, plus les charges portées par la protéine sont espacées, plus la BE augmente et plus la RCE diminue.

Nous avons estimé les BE de deux conformations extrêmes du cytochrome c pour des états de charges variant de 5- à 12-, qui sont représentées dans la *Figure III.20*. En effet, les équations (4) et (5) permettent de déterminer les BE des électrons en excès en fonction des distances intramoléculaires des groupements carboxylates qui reflètent la conformation de la protéine. Pour ces calculs, nous prendrons BE_0 = 3.25 eV qui correspond au détachement d'un électron à partir d'un groupement CH_3COO^- monochargé [29]. Les charges négatives portées par une protéine se trouvent en effet sur les groupements au pKa le plus faible, autrement dit sur les fonctions carboxylates. Wang a démontré que l'énergie nécessaire pour détacher un électron des groupements carboxylates ne dépend, en première approximation, ni de la longueur de la chaine carbonée ni du nombre de charges présentes sur la molécule [3, 4, 55, 56].

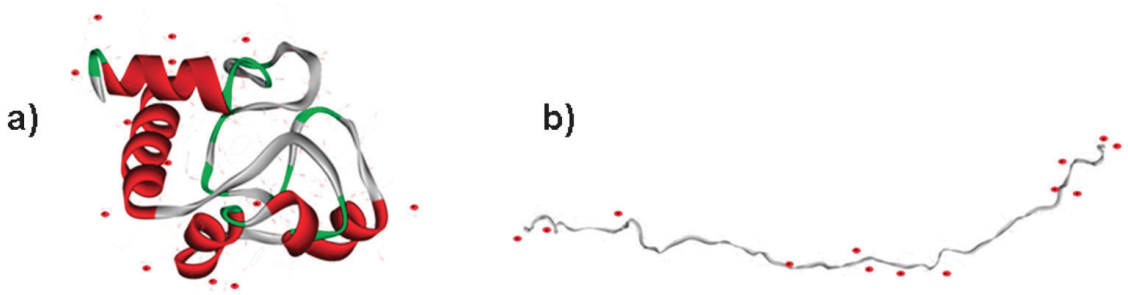


Figure III.20 a) Forme native du cytochrome c 13- tirée de data base pdb, basée sur une étude de diffraction par rayon X. b) Forme dépliée du cytochrome c 13-. Les liaisons peptidiques ont été étendues à 180° puis l'énergie a été minimisée grâce aux champs de force AMBER. Les charges ont été disposées de façon à minimiser la RCE.

L'affinité électronique adiabatique, qui est égale à la plus faible valeur de BE obtenue, est reportée dans la *Figure III.21* en fonction des états de charge des différents conformères de la protéine.

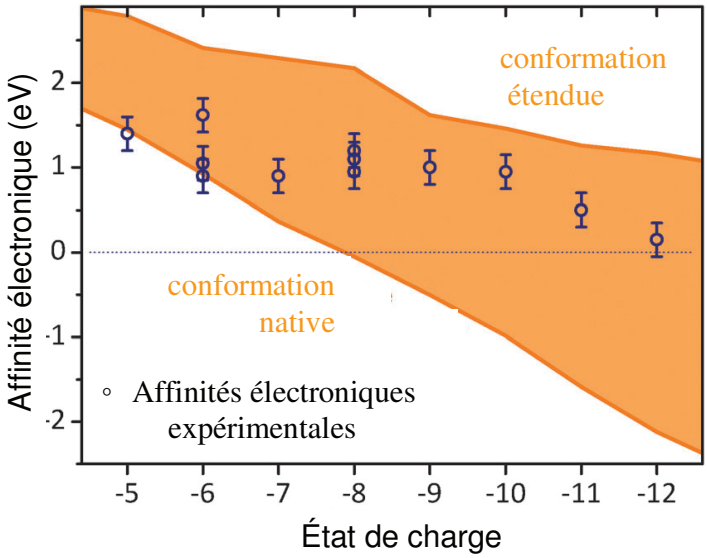


Figure III.21 Affinités électroniques adiabatiques obtenues expérimentalement en fonction de l'état de charge du cytochrome c. Affinités électroniques théoriques calculées par un modèle électrostatique grâce aux équations (4) et (5) pour la structure native et totalement dépliée (voir Figure III.20)

Comme prévu, pour un état de charge donné, la BE est plus forte pour la conformation la plus étendue car les répulsions entre charges diminuent. Pour la structure native PDB (*Figure III.20*.a), la *Figure III.21* montre que la BE calculée décroît d'environ 0.5 eV dès lors que le système porte une charge supplémentaire. Il est possible d'estimer qu'une BE négative serait obtenue pour l'état de charge 9- de la forme native du cytochrome c. Pour la structure dépliée, la diminution de la BE est plus faible et l'énergie de liaison reste positive, quelque soit l'état de charge étudié.

Ces résultats expérimentaux ainsi que les calculs théoriques montrent l'existence d'une transition de conformation entre la forme native et étendue quand le nombre de charges portées par la protéine augmente. Pour la structure native où N = 5, l'expérience s'accorde parfaitement à la théorie. Pour les plus hauts états de charge (N = 10 à 12), la *Figure III.21* montre que la protéine est dans une conformation dépliée. Les EAE expérimentales sont plus faibles que celles calculées pour une conformation de protéine totalement étendue. Cette différence s'explique par le fait que le cytochrome c est une holoprotéine et que les liaisons covalentes entre l'hème et le squelette peptidique imposent une certaine structure à la protéine, qui l'empêchent ainsi d'adopter la conformation la plus dépliée (non prise en compte par les calculs modèles). Pour les états de charges intermédiaires (N = 6 à 8), la EAE ne varie pas. C'est donc à ce niveau que les principaux changements de conformation ont lieu (il est toutefois important de noter qu'en mode positif, des études conformationnelles sur le

cytochrome c ont montré le repliement de la protéine à long temps d'isolation au sein de la trappe de Paul en phase gazeuse [60, 61]). Ces résultats confirment ceux obtenus par mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse. L'observation du dépliement de la protéine entre les états de charge 6- et 9- est en accord avec ceux préalablement obtenus par mobilité ionique en mode positif et négatif [37, 58, 62] et par mobilité ionique combinée à l'échange H/D en mode positif [63]. Ces études ont montré que le repliement de la protéine se faisait entre les états de charge 4- à 10-. Cependant, des différences dans les sections efficaces sont observées dans cet intermédiaire d'état de charge entre les polyanions et les polycations possédant la même charge nette [37]. Cette observation est en accord avec nos résultats expérimentaux puisque l'affinité électronique mesurée est comprise entre les valeurs théoriques attendues pour la forme native et la forme dépliée (*Figure III.21*). Il nous a donc semblé intéressant de comparer les sections efficaces de collision obtenues expérimentalement avec les valeurs de sections efficaces prédites pour les deux types de conformation : la structure repliée et la structure totalement étendue. Pour cela nous avons calculé la section efficace de collision moyenne pour les différents états de charge du cytochrome c pour ces deux conformations en utilisant le modèle « exact hard-sphere scattering » (EHSS) [64]. Ces sections efficaces théoriques sont illustrées dans la *Figure III.22* :

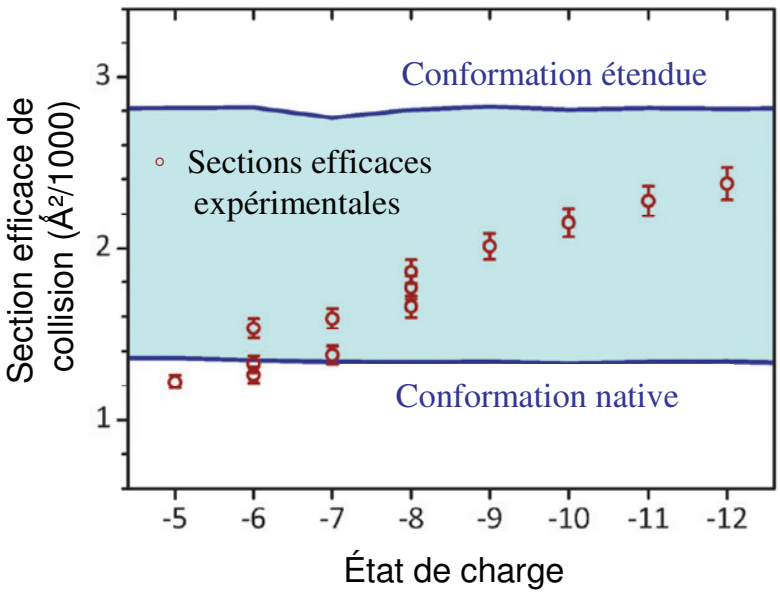


Figure III.22 Sections efficaces de collision (hélium) obtenues par mobilité ionique pour le cytochrome c négativement chargé (5- à 12-). Les lignes bleues correspondent les prédictions obtenues par le modèle EHSS pour la structure native (ligne inférieure) et la structure dépliée (figne supérieure)

Pour l'état de charge le plus faible, la conformation du cytochrome c semble être très proche de la structure native. L'état de charge 6- se distingue en 3 conformères, signe du début du dépliement. Ces résultats sont en accord avec ceux préalablement obtenus par Clemmer et Jarrold [37]. Pour des états de charge supérieurs à 9-, un seul conformère est observé par mobilité ionique. Cependant, la section efficace de collision continue d'augmenter avec l'état de charge. Ceci peut être interprété par le fait que la protéine ne se trouve toujours pas dans la conformation totalement dépliée. La même observation avait été décrite lors de l'analyse des affinités électroniques. En effet, les quatre liaisons covalentes entre l'hème et la protéine empêchent la protéine d'adopter une conformation totalement étendue.

III.5.3. CONCLUSION

Nous avons pu enregistrer les spectres de photoélectron des différents conformères de 8 états de charge du cytochrome c grâce à un couplage entre la mobilité ionique et la spectrométrie de photoélectron [54]. Quelque soit l'état de charge observé, l'énergie de liaison des électrons reste positive. En effet, le cytochrome c est un système flexible et le dépliement de la protéine lorsque l'état de charge augmente provoque une diminution des répulsions électrostatiques entre charges. Les charges en excès sont ainsi disposées sur la protéine de sorte à atteindre une structure d'énergie minimum par un équilibre subtil entre la conformation et les répulsions coulombiennes. Pour les hauts états de charge, ce sont principalement les forces électrostatiques qui déterminent la conformation. En phase gazeuse, ces forces sont particulièrement importantes, comparées à celles observables en solution où les interactions électrostatiques sont écrantées par la présence du solvant. La phase gazeuse permet ainsi de fournir une mesure directement liée à la minimisation de l'énergie. Nos résultats peuvent ainsi servir de point de repère pour les études de stabilité et de répartition des charges sur les protéines. C'est la première fois que ce type de phénomène est sondé pour les différents conformères d'une protéine.

Le couplage entre IMS et PES montrent que les AEA peuvent être utilisées comme sonde de dénaturation des protéines par l'évolution des RCB. Notons que lorsque plusieurs isomères sont présents, des propriétés de photoélectrons différentes sont obtenues, ce qui montre la

nécessité d'utiliser ce couplage pour une meilleure exploration des transitions forme native / forme dépliée dans une protéine.

III.6. CONCLUSION GENERALE

Dans ce chapitre nous avons vu que le photodétachement d'électron est fortement dépendant de la longueur d'onde d'excitation. C'est un processus en deux étapes dû à une première transition entre deux états liants, suivie d'une relaxation vers un état ionisant. Le taux de photodétachement en fonction de la longueur d'onde des photons incidents peut être directement comparé au spectre d'absorption en solution. Pour compléter les études de L. Joly réalisée dans l'UV, nous avons étudié les propriétés optiques de protéines dans le visible et dans le VUV.

L'étude de la bande Soret du cytochrome c dans le visible a permis de montrer l'importance de l'état de ligation du métal au centre de la porphyrine ainsi que la géométrie de l'hème et le nombre de charges environnantes pour restaurer les propriétés optiques de l'hème au sein de son environnement protéique.

La spectroscopie optique dans le VUV sur l'insuline nous a permis d'observer du double détachement d'électrons dans cette gamme de longueur d'onde. L'étude des sections efficaces relatives en fonction de la longueur d'onde nous a permis de confirmer ce phénomène qui est la première observation d'un double détachement issu d'un processus direct sur des protéines. Ce dernier résultat est très riche de perspectives car démontre qu'il serait possible d'utiliser des protéines comme source d'électrons corrélés avec des énergies de photon relativement faible (< 15 eV).

Finalement, la spectroscopie de photoélectron nous a permis de démontrer que cette technique peut être utilisée comme sonde performante de la dénaturation du cytochrome c. Cette technique permet d'étudier la stabilité de ses différents conformères par la mesure de l'énergie cinétique des électrons émis lors de l'irradiation UV de la protéine. Ces résultats fournissent ainsi un repère pour les études de stabilité et de répartition des charges sur les protéines.

I.7. BIBLIOGRAPHIE

1. Joly, L., *Couplage spectroscopique / spectrométrie de masse : Propriétés optiques et photofragmentation de biomolécules*, in *Physique*. 2009, Université Lyon 1: Lyon.
2. SOLEIL, *Proposal 20100187 - Ligne DESIRS.* 2010.
3. Wang, L.S. and X.B. Wang, *Probing free multiply charged anions using photodetachment photoelectron spectroscopy.* Journal of Physical Chemistry A, 2000. **104**(10): p. 1978-1990.
4. Wang, X.B., C.F. Ding, and L.S. Wang, *Electron tunneling through the repulsive Coulomb barrier in photodetachment of multiply charged anions.* Chemical Physics Letters, 1999. **307**(5-6): p. 391-396.
5. Antoine, R. and P. Dugourd, *Visible and ultraviolet spectroscopy of gas phase protein ions.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2011. **13**(37): p. 16494-16509.
6. Joly, L., et al., *Electron photodetachment from gas phase peptide dianions. Relation with optical absorption properties.* Journal of Physical Chemistry A, 2008. **112**(5): p. 898-903.
7. Wigner, E.P., *On the Behavior of Cross Sections near Thresholds.* Physical Review, 1948. **73**(9): p. 1002-1009.
8. Bellina, B., et al., *UV spectroscopy of entire proteins in the gas phase.* International Journal of Mass Spectrometry, 2011. **297**(1-3): p. 36-40.
9. Theorell, H. and A. Akesson, *Studies on cytochrome c. II. The optical properties of pure cytochrome c and some of its derivatives.* Journal of the American Chemical Society, 1941. **63**: p. 1812-1818.
10. Eaton, W.A. and Hochstra.Rm, *Electronic Spectrum of Single Crystals of Ferricytochrome-C.* Journal of Chemical Physics, 1967. **46**(7): p. 2533-&.
11. Hu, S.Z., et al., *Complete Assignment of Cytochrome-C Resonance Raman-Spectra Via Enzymatic Reconstitution with Isotopically Labeled Hemes.* Journal of the American Chemical Society, 1993. **115**(26): p. 12446-12458.
12. Andrade, A.A., et al., *Two-photon absorption investigation in reduced and oxidized cytochrome c solutions.* Chemical Physics Letters, 2004. **390**(4-6): p. 506-510.
13. Negrerie, M., et al., *Ultrafast heme dynamics in ferrous versus ferric cytochrome c studied by time-resolved resonance Raman and transient absorption spectroscopy.* Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(25): p. 12766-12781.
14. Latypov, R.F., et al., *Structural characterization of an equilibrium unfolding intermediate in cytochrome c.* Journal of Molecular Biology, 2006. **357**(3): p. 1009-1025.

15. Reynolds, M.F., et al., *Electronic absorption, EPR, and resonance raman spectroscopy of CooA, a CO-sensing transcription activator from R-rubrum, reveals a five-coordinate NO-heme.* Biochemistry, 2000. **39**(2): p. 388-396.

16. Wyer, J.A. and S.B. Nielsen, *Absorption in the Q-band region by isolated ferric heme(+) and heme(+)(histidine) in vacuo.* Journal of Chemical Physics, 2010. **133**(8).

17. Lykkegaard, M.K., et al., *A soret marker band for four-coordinate ferric heme proteins from absorption spectra of isolated Fe(III)-Heme(+) and Fe(III)-Heme(+)(His) ions in vacuo.* Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(36): p. 11856-11857.

18. Ha-Thi, M.-H., et al., *First observation in the gas phase of the ultrafast electronic relaxation pathways of the S(2) states of heme and hemin.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2010. **12**(45): p. 14985-14993.

19. Oomens, J., et al., *Charge-state resolved mid-infrared spectroscopy of a gas-phase protein.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2005. **7**(7): p. 1345-1348.

20. Edwards, L., et al., *Porphyrins .17. Vapor Absorption Spectra and Redox Reactions - Tetraphenylporphins and Porphin.* Journal of Molecular Spectroscopy, 1971. **38**(1): p. 16-&.

21. He, F., C.L. Hendrickson, and A.G. Marshall, *Unequivocal determination of metal atom oxidation state in naked heme proteins: Fe(III)myoglobin, Fe(III)cytochrome c, Fe(III)cytochrome b5, and Fe(III)cytochrome b5 L47R.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2000. **11**(2): p. 120-126.

22. Johnson, K.A., et al., *Chemical and on-line electrochemical reduction of metalloproteins with high-resolution electrospray ionization mass spectrometry detection.* Analytical Chemistry, 2001. **73**(4): p. 803-808.

23. Bram, O., et al., *Femtosecond UV Studies of the Electronic Relaxation Processes in Cytochrome c.* Journal of Physical Chemistry B, 2011. **115**(46): p. 13723-13730.

24. Khandelwal, S.C. and J.L. Roebber, *Photoelectron-Spectra of Tetraphenylporphine and Some Metallotetraphenylporphyrins.* Chemical Physics Letters, 1975. **34**(2): p. 355-359.

25. Liao, M.S. and S. Scheiner, *Electronic structure and bonding in unligated and ligated Fe-II porphyrins.* Journal of Chemical Physics, 2002. **116**(9): p. 3635-3645.

26. Wang, X.B. and L.S. Wang, *Observation of negative electron-binding energy in a molecule.* Nature, 1999. **400**(6741): p. 245-248.

27. Scheller, M.K., R.N. Compton, and L.S. Cederbaum, *Gas-Phase Multiply-Charged Anions.* Science, 1995. **270**(5239): p. 1160-1166.

28. Weber, J.M., et al., *Photoelectron spectroscopy of isolated multiply negatively charged oligonucleotides.* Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(27): p. 8585-8589.

29. Wang, X.B., et al., *Determination of the electron affinity of the acetyloxyl radical (CH3COO) by low-temperature anion photoelectron spectroscopy and ab initio calculations.* Journal of Physical Chemistry A, 2006. **110**(15): p. 5047-5050.

30. Vonderach, M., et al., *Probing electrostatic interactions and structural changes in highly charged protein polyanions by conformer-selective photoelectron spectroscopy.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2011. **13**(34): p. 15554-15558.

31. Chan, C.K., et al., *Submillisecond protein folding kinetics studied by ultrarapid mixing.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(5): p. 1779-1784.

32. Elove, G.A., et al., *Early Steps in Cytochrome-C Folding Probed by Time-Resolved Circular-Dichroism and Fluorescence Spectroscopy.* Biochemistry, 1992. **31**(30): p. 6876-6883.

33. Dipace, A., et al., *Protein Dynamics - Vibrational Coupling, Spectral Broadening Mechanisms, and Anharmonicity Effects in Carbonmonoxy Heme-Proteins Studied by the Temperature-Dependence of the Soret Band Lineshape.* Biophysical Journal, 1992. **63**(2): p. 475-484.

34. Prabhu, N.V., et al., *Optical spectra of Fe(II) cytochrome c interpreted using molecular dynamics simulations and quantum mechanical calculations.* Journal of Physical Chemistry B, 2002. **106**(21): p. 5561-5571.

35. Cupane, A., et al., *Dynamics of various metal-octaethylporphyrins in solution studied by resonance Raman and low-temperature optical absorption spectroscopies. Role of the central metal.* Journal of Physical Chemistry B, 1998. **102**(34): p. 6612-6620.

36. Clemmer, D.E., R.R. Hudgins, and M.F. Jarrold, *Naked Protein Conformations - Cytochrome-C in the Gas-Phase.* Journal of the American Chemical Society, 1995. **117**(40): p. 10141-10142.

37. Clemmer, D.E. and M.F. Jarrold, *Ion mobility measurements and their applications to clusters and biomolecules.* Journal of Mass Spectrometry, 1997. **32**(6): p. 577-592.

38. Jentzen, W., et al., *Ruffling in a Series of Nickel(Ii) Meso-Tetrasubstituted Porphyrins as a Model for the Conserved Ruffling of the Heme of Cytochromes-C.* Journal of the American Chemical Society, 1995. **117**(45): p. 11085-11097.

39. Brunet, C., et al., *Formation and fragmentation of radical peptide anions: insights from vacuum ultra violet spectroscopy.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2012. **23**(2): p. 274-81.

40. Dodonova, N.Y., *Vacuum Uv - Photophysics and Photochemistry of Biomolecules.* Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 1993. **18**(2-3): p. 111-121.

41. Robin, M.B., *Higher Excited States of Polyatomic Molecules.* Academic Press, Inc, Orlando, FL, 1985. **Vol. III**.

42. Matheis, K., et al., *Photoelectron Spectroscopy of Gramicidin Polyanions: Competition between Delayed and Direct Emission.* Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(47): p. 15903-15906.

43. Milosavljevic, A.R., et al., *Photoionization of a protein isolated in vacuo.* Physical Chemistry Chemical Physics. **13**(34): p. 15432-15436.

44. Budnik, B.A., et al., *Ionization energies of multiply protonated polypeptides obtained by tandem ionization in Fourier transform mass spectrometers.* Journal of Mass Spectrometry, 2002. **37**(11): p. 1141-1144.

45. Milosavljevic, A.R., et al., *Photoionization of a protein isolated in vacuo.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2011. **13**(34): p. 15432-15436.

46. Wang, X.B., J.B. Nicholas, and L.S. Wang, *Photoelectron spectroscopy and theoretical calculations of SO4- and HSO4-: Confirmation of high electron affinities of SO4 and HSO4.* Journal of Physical Chemistry A, 2000. **104**(3): p. 504-508.

47. Mathur, D., *Structure and dynamics of molecules in high charge states.* Physics Reports-Review Section of Physics Letters, 2004. **391**(1-2): p. 1-118.

48. Dorner, R., et al., *Double ionization by one and many photons.* Radiation Physics and Chemistry, 2004. **70**(1-3): p. 191-206.

49. Berrah, N., et al., *K-shell photodetachment of Li-: Experiment and theory.* Physical Review Letters, 2001. **87**(25).

50. Andersen, T., *Atomic negative ions: structure, dynamics and collisions.* Physics Reports-Review Section of Physics Letters, 2004. **394**(4-5): p. 157-313.

51. Gabelica, V., et al., *Base-dependent electron photodetachment from negatively charged DNA strands upon 260-nm laser irradiation.* Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(15): p. 4706-4713.

52. Joly, L., et al., *Ultraviolet spectroscopy of peptide and protein polyanions in vacuo: Signature of the ionization state of tyrosine.* Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(27): p. 8428-+.

53. Alkahali, M.S.N., et al., *3-Photon Excitation of the Lower O-U(+) Ion-Pair States of Cl-2 Via a Continuum Intermediate State.* Journal of Physical Chemistry, 1995. **99**(12): p. 3978-3983.

54. Vonderach, M., et al., *Combining Ion Mobility Spectrometry, Mass Spectrometry, and Photoelectron Spectroscopy in a High-Transmission Instrument.* Analytical Chemistry, 2011. **83**(3): p. 1108-1115.

55. Wang, L.S., et al., *Probing the potential barriers and intramolecular electrostatic interactions in free doubly charged anions.* Physical Review Letters, 1998. **81**(13): p. 2667-2670.

56. Anusiewicz, W., et al., *Charge loss in gas-phase multiply negatively charged oligonucleotides.* Journal of Physical Chemistry A, 2005. **109**(1): p. 240-249.

57. Schnier, P.D., D.S. Gross, and E.R. Williams, *Electrostatic Forces and Dielectric Polarizability of Multiply Protonated Gas-Phase Cytochrome-C Ions Probed by Ion/Molecule Chemistry.* Journal of the American Chemical Society, 1995. **117**(25): p. 6747-6757.

58. Shelimov, K.B., et al., *Protein structure in vacuo: Gas-phase confirmations of BPTI and cytochrome c.* Journal of the American Chemical Society, 1997. **119**(9): p. 2240-2248.

59. Suckau, D., et al., *Coexisting Stable Conformations of Gaseous Protein Ions.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993. **90**(3): p. 790-793.

60. Badman, E.R., S. Myung, and D.E. Clemmer, *Evidence for unfolding and refolding of gas-phase cytochrome c ions in a Paul trap.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2005. **16**(9): p. 1493-1497.

61. Horn, D.M., et al., *Kinetic intermediates in the folding of gaseous protein ions characterized by electron capture dissociation mass spectrometry.* Journal of the American Chemical Society, 2001. **123**(40): p. 9792-9799.

62. Clemmer, D.E., *Collision cross section database.* http://www.indiana.edu/~clemmer/Research/cross%20section%20database/Proteins/protein_cs.htm.

63. Valentine, S.J. and D.E. Clemmer, *Temperature-dependent H/D exchange of compact and elongated cytochrome c ions in the gas phase.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2002. **13**(5): p. 506-517.

64. Shvartsburg, A.A. and M.F. Jarrold, *An exact hard-spheres scattering model for the mobilities of polyatomic ions.* Chemical Physics Letters, 1996. **261**(1-2): p. 86-91.

CHAPITRE IV

SPECTROSCOPIE VUV DE PEPTIDES ET DE PROTEINES RADICALAIRES

IV.1. Introduction 135
IV.2. Spectroscopie de deux pentapeptides YVVVV et WVVVV radicalaires 136
IV.2.1. Introduction 136
IV.2.2. Formation et spectroscopie d'action de deux pentapeptides radicalaires : YVVVV et WVVVV. 136
IV.2.3. Conclusion 146
IV.3. Spectroscopie de l'insuline radicalaire 147
IV.3.1. Introduction 147
IV.3.2. Spectroscopie de l'insuline radicalaire 147
IV.3.3. Conclusion 149
IV.4. Conclusion 150
IV.5. Bibliographie 151

IV.1. INTRODUCTION

Les radicaux dans les peptides et protéines présentent un intérêt considérable pour deux raisons :

(i) Ils jouent des rôles critiques comme intermédiaires dans un grand nombre de processus biologiques à transfert d'électrons [1].

(ii) Ils sont présents dans de nombreux chemins de fragmentation relevant pour le séquençage des protéines [2]

La spectroscopie visible sur radicaux neutres [3] et chargés [4] de peptides en phase gazeuse a été initiée dans notre équipe. Pour compléter ce travail, nous avons entrepris des expériences à SOLEIL (sur la ligne DESIRS) pour enregistrer pour la première fois des spectres VUV de peptides et de protéines en phase gazeuse.

Pour compléter ces études spectroscopiques dans le VUV, nous avons mis en place un montage expérimental à deux couleurs permettant de sonder les propriétés optiques d'anions radicalaires. Un premier laser à 266 nm permet d'oxyder les peptides et les protéines par photodétachement d'électron. L'espèce radicalaire ainsi formée est stable et peut être isolée au sein du piège. Le rayonnement synchrotron permet ensuite de sonder les propriétés optiques et les différentes voies de fragmentation de ces espèces radicalaires sur la gamme de 5 à 16 eV. Ces études seront réalisées sur deux pentapeptides contenant un résidu tyrosine ou tryptophane et sur l'insuline. La tyrosine et le tryptophane sont les deux principales sources d'absorption dans l'UV et ont fait l'objet de nombreuses études spectroscopiques dans l'UV et dans le visible. Par contre, aucune étude n'a encore été réalisée sur l'effet du rayonnement VUV.

L'étude des propriétés spectroscopiques de différents états de charge de l'insuline radicalaire nous permettra de comparer ces résultats avec ceux préalablement obtenus sur les espèces non radicalaires $[M-3H]^{3-}$ et $[M-5H]^{5-}$ et de sonder ainsi l'influence de la présence d'un radical sur les propriétés optiques VUV d'une protéine.

IV.2. SPECTROSCOPIE DE DEUX PENTAPEPTIDES YVVVV ET WVVVV RADICALAIRES

IV.2.1. INTRODUCTION

Les radicaux tyrosines (Tyr, Y) et tryptophanes (Trp, W) sont omniprésents dans la biosphère. Dans les protéines, ils favorisent le transfert de charges [5-7] et la propagation des radicaux libres [8, 9], conduisant principalement à l'oxydation des protéines [10, 11]. Des études spectroscopiques de différents modèles contenant des Tyr et Trp radicalaires ont été réalisées afin d'observer l'effet de la lumière UV et Visible sur ces radicaux [12-20]. Par contre, aucune étude n'a encore montré l'effet que peut avoir le rayonnement VUV. En effet, il n'est pas aisé d'isoler et de caractériser par rayonnement VUV les radicaux sous forme solide ou liquide, où le solvant peut se trouver sous forme ionisé ou radicalaire, pouvant ainsi interagir avec la molécule, voire même écranter le rayonnement. La phase gazeuse permet de s'affranchir de ces interactions non désirées et il est ainsi possible d'étudier la protéine dans un état initial bien défini et de caractériser les éventuels produits de fragmentation ou d'ionisation [21]. Notons cependant que le solvant tient un rôle primordial dans le transfert de charge et que cet effet est alors diminué en phase gazeuse [22, 23]. Le rayonnement synchrotron (RS) avec notamment la ligne DESIRS, permet de fournir des photons VUV (5-16 eV) avec une bonne résolution en énergie, ce qui fait de lui un outil très adapté à ce type d'étude.

IV.2.2. FORMATION ET SPECTROSCOPIE D'ACTION DE DEUX PENTAPEPTIDES RADICALAIRES : YVVVV ET WVVVV.

Cette étude décrit la formation et la spectroscopie d'action par une expérience à deux couleurs (se référer aux procédés expérimentaux) de deux peptides qui contiennent un acide aminé Trp ou Tyr sous forme radicalaire ou non dont la structure est illustrée dans la *Figure IV.1* :

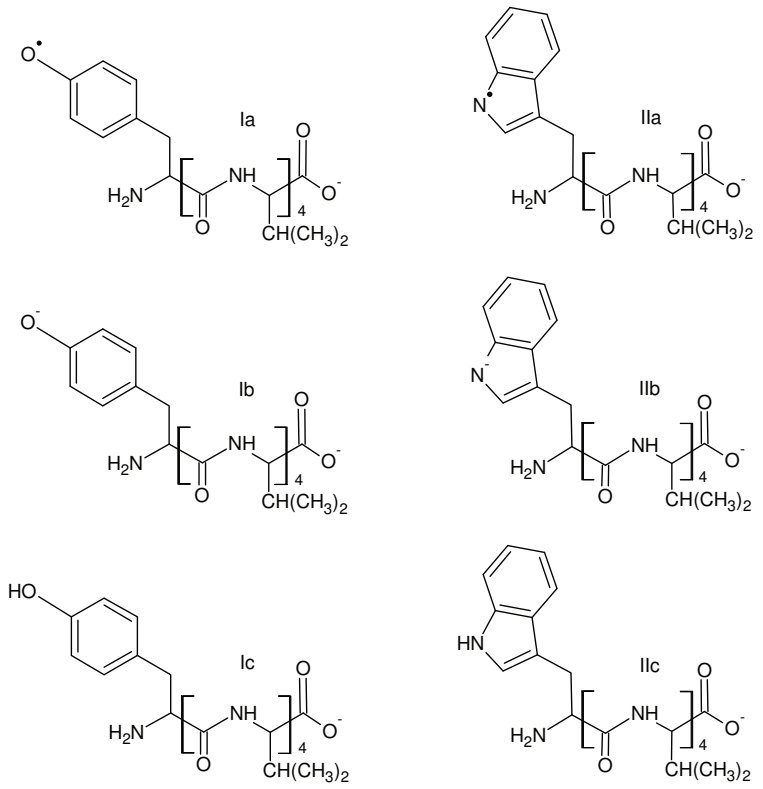


Figure IV.1 Structure des peptides YVVVV (colonne de gauche) et WVVVV (colonne de droite) a) radicalaire, b) dichargé, c) monochargé. Les charges ont été attribuées selon le pKa des groupements acides.

Le groupement acide carboxylique est un site de déprotonation (pKa = 3.5 - 4.3). Pour le peptide YVVVV, le groupe hydroxyle du phénol (pKa = 10.0 – 10.3) est plus acide que l'azote de la chaine peptidique (pKa > 13) et le second site de déprotonation est donc le groupement hydroxyle du chromophore [24, 25]. Des études réalisées sur le peptide WVVVV ont montré que la seconde charge est portée par le groupement indole [26].

Le spectre de masse obtenu après infusion de ces peptides (50 µM 1:1 H_2O/ACN pH 6) montre que l'espèce monochargée $[M-H]^-$ est largement majoritaire (*Figure IV.2. a et d*) L'ajustement du pH par NH_4OH permet d'augmenter légèrement le ratio $[M-2H]^{2-}$/ $[M-H]^-$ mais l'augmentation du courant ionique résultante provoque également l'instabilité du signal. C'est pourquoi le pH n'a finalement pas été ajusté.

L'irradiation des peptides dichargées $[M-2H]^{2-}$ par un laser UV à 260 nm permet de former les espèces radicalaires $[M-2H]^{-\bullet}$. Le faisceau synchrotron, aligné spatialement et temporellement au laser a été utilisé pour sonder le taux de photofragmentation des radicaux. Finalement, le principe de formation et de spectroscopie optique de ces peptides est schématisé ci-dessous.

$$\begin{aligned} &[M-2H]^{2-}(Ib\ ou\ IIb) + h\nu_1 \xrightarrow{266\ nm} [M-2H]^{-\bullet}(Ia\ ou\ IIa) + e^- \\ &[M-2H]^{-\bullet}(Ia\ ou\ IIa) + h\nu_2 \xrightarrow{VUV} Fragments \end{aligned} \qquad (1)$$

Dans le travail de thèse de L. Joly, il a été montré que pour les peptides contenant un résidu tryptophane, le radical était porté par les groupes aromatiques indoles.

La *Figure IV.2 c et f,* illustre le spectre de photofragmentation des espèces $[WVVVV-2H]^{\bullet-}$ et $[YVVVV-2H]^{\bullet-}$ après 600 ms d'irradiation VUV à 9.75 eV.

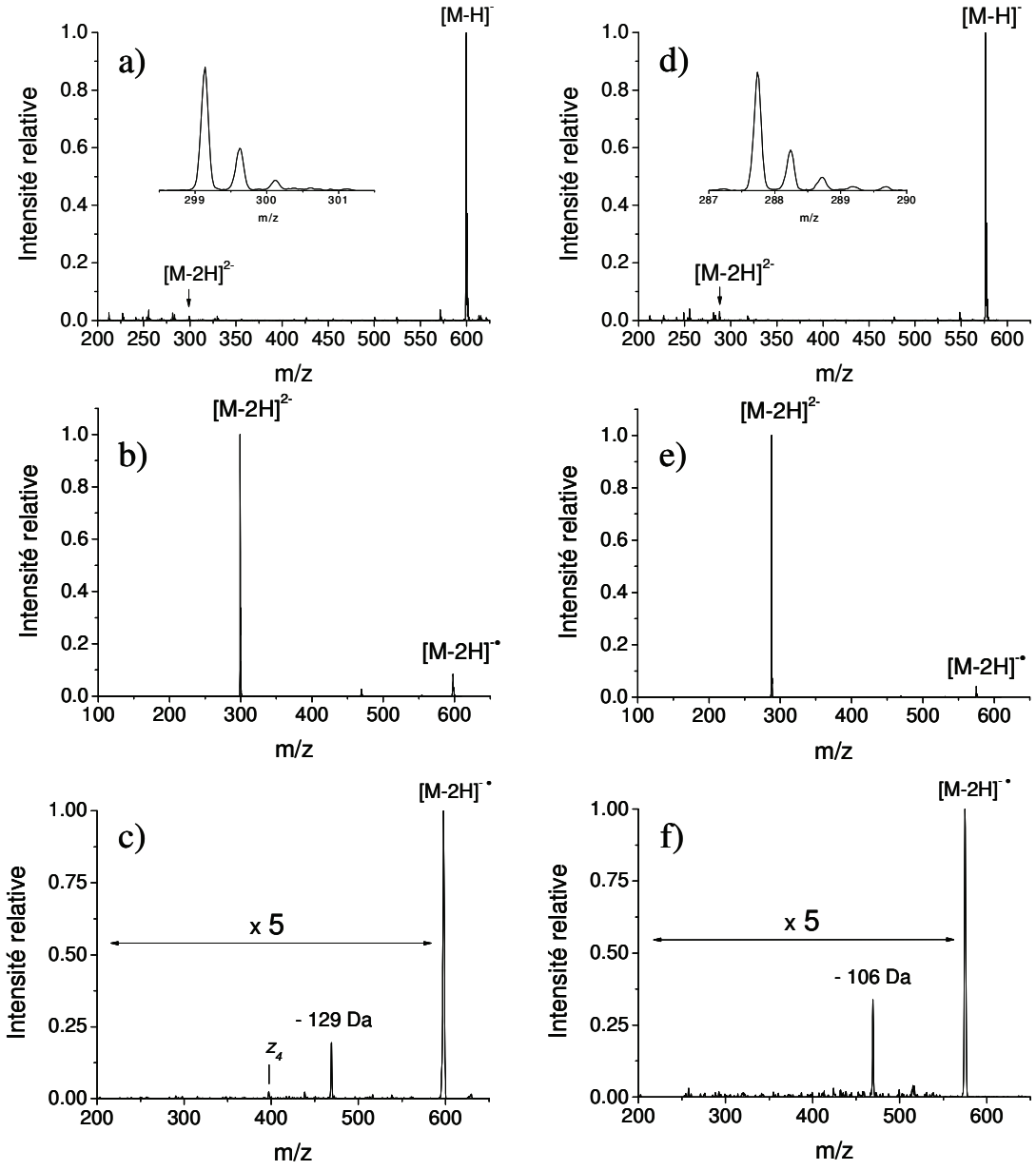


Figure IV.2 Spectre électrospray des peptides WVVVV (a) et YVVVV (d) avec la distribution isotopique de l'ion dichargé en insert. Spectre de photodétachement obtenu après 100 ms d'irradiation à 260 nm des espèces dichargées [WVVVV-2H]$^{2-}$(b) et [YVVVV-2H]$^{2-}$(e). Spectre de photofragmentation obtenu après 600 ms d'irradiation à 9.75 eV des espèces radicalaires [WVVVV-2H]$^{-\bullet}$ (b) et [YVVVV-2H]$^{-\bullet}$(e)

L'irradiation VUV des espèces radicalaires mène principalement aux pertes de neutres de 106 Da pour [YVVVV-2H]$^{\bullet-}$ et de 129 Da pour [WVVVV-2H]$^{\bullet-}$. Comme illustre dans la *Figure IV.3*, ces ions correspondent aux ruptures de la chaine latérale radicalaire de ces deux peptides et signent la présence de radicaux sur les chaines latérales des acides aminés aromatiques [27].

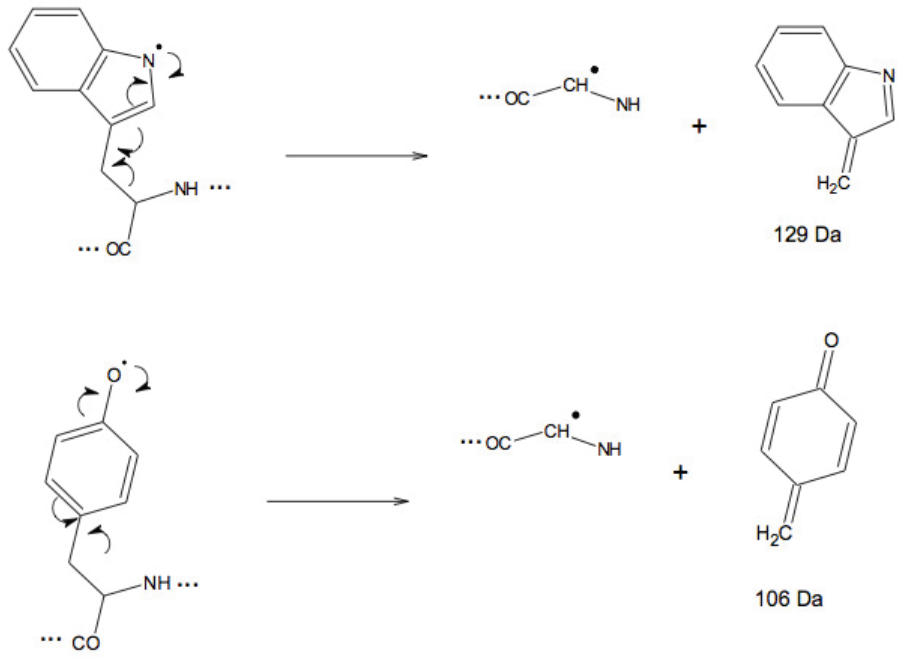


Figure IV.3 Mécanisme pour les pertes de 129 et 106 Da

L'ion $z_4^{\bullet}$, au voisinage de la Tyr (Trp) est également observé après irradiation VUV des deux pentapeptides radicalaires, mais en très faible quantité.

L'analyse des rapports de branchement ($Br_i = Frag_i/\Sigma frag_i$) montre que leur évolution est quasi indépendante de l'énergie des photons VUV incidents (*Figure IV.4* a et b). Ces résultats contrastent avec ce qui est observé pour les mêmes peptides non radicalaires (*Figure IV.4*, c et d).

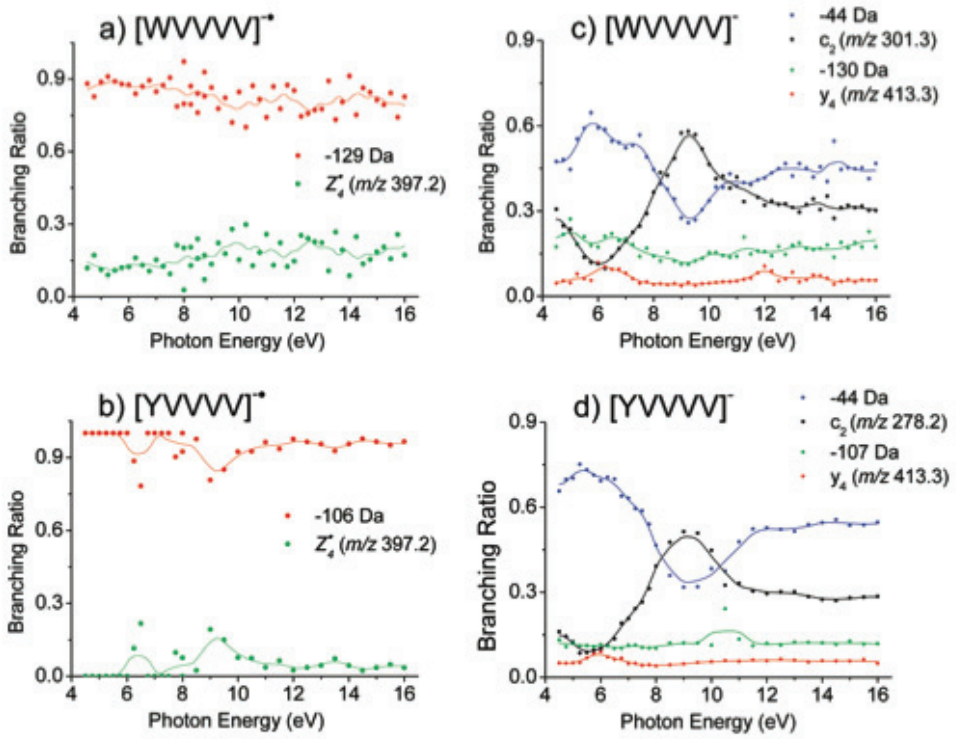


Figure IV.4 Rapport de branchement des différentes voies de fragmentation pour les espèces radicalaires a) [WVVVV-2H]•- et b) [YVVVV-2H]•- ainsi que pour les anions non radicalaires c) [WVVVV-H]- et d) [YVVVV-H]- en fonction de l'énergie du rayonnement synchrotron. Les rapports de branchement sont définis par : $Br_i = Frag_i/\Sigma frag_i$ avec $Frag_i$, l'intensité du fragment i.

L'irradiation VUV des peptides $[WVVVV-H]^-$ et $[YVVVV-H]^-$ mène aux pertes des chaines latérales non radicalaires (-130 et -107 respectivement). La perte de 44 Da correspond à la perte de CO_2 suite à l'excitation des électrons délocalisés se trouvant sur ce groupement CO_2.

La distribution de l'ion c_2 obtenu dépend fortement de l'énergie des photons avec un maximum à 9 eV. Dans le cas des peptides non radicalaires, l'excitation se ferait préférentiellement le long du squelette peptidique. Cependant, les ions c sont souvent observés lors des expériences de CID sur des peptides déprotonés [28-30] et le fragment c_2 peut en partie provenir de la fragmentation subséquente à la redistribution de l'énergie sur les modes de vibration (IVR).

Ces résultats contrastent avec l'irradiation VUV à 7.9 eV de ces mêmes peptides protonés qui mène principalement à la formation d'ions fragments x, y et v et w [31, 32]. En mode positif, la fragmentation serait issue de l'excitation vers les orbitales de Rydberg et/ou du

détachement d'électron par le rayonnement VUV, suivie de la fragmentation du squelette peptidique [33].

Les spectres de photofragmentation de ces peptides sont illustrés dans la Figure IV.5 :

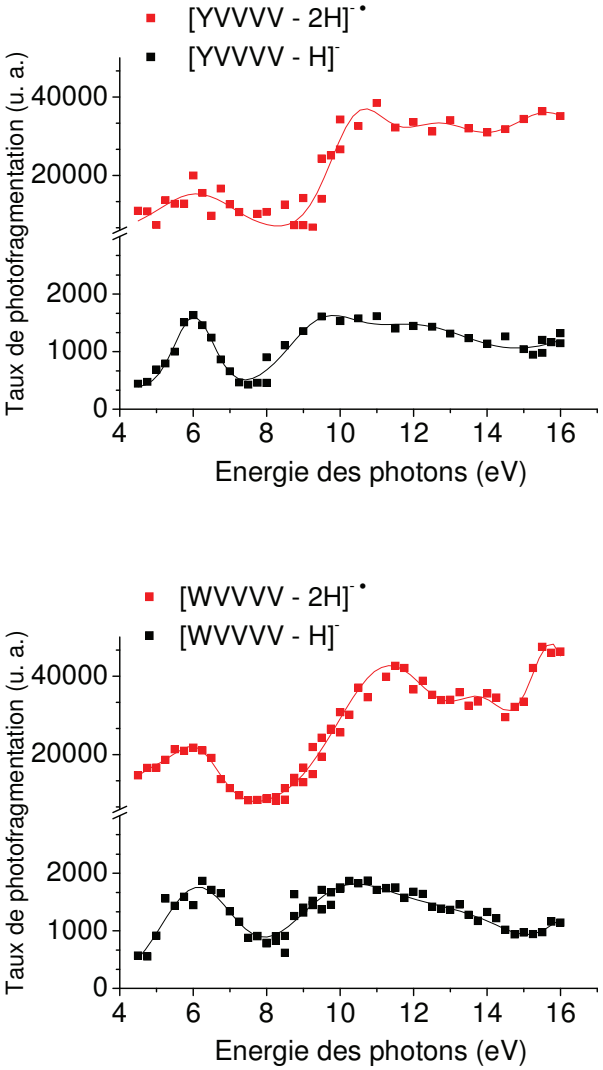


Figure IV.5 Taux de photofragmentation pour les espèces anioniques radicalaires (en rouge) et non radicalaires (en noir) des peptides YVVVV (en haut) et WVVVV (en bas). Les fragments et pertes de neutres pris en compte pour l'obtention de ces spectres sont ceux annotés dans la Figure IV.2

Comme illustré dans la *Figure IV.5*, les spectres de photofragmentation ont été enregistrés de 4.5 à 16 eV pour les espèces radicalaires $[WVVVV\text{-}2H]^{\bullet-}$ et $[YVVVV\text{-}2H]^{\bullet-}$ et non radicalaires $[WVVVV\text{-}H]^-$ et $[YVVVV\text{-}H]^-$. Les spectres des deux espèces radicalaires sont très similaires avec une bande centrée aux alentours de 6 eV et une augmentation du taux de

fragmentation vers 8 eV qui atteint un plateau entre 10 et 16 eV. Ces spectres ont été comparés à ceux des espèces monochargées non radicalaires. Pour ces espèces, le groupement carboxylique porte la charge négative et les chaines latérales du tryptophane et de la tyrosine ne sont pas sous forme radicalaire. La principale différence est observée dans le taux total de photofragmentation, qui est plus de dix fois inférieur dans le cas des peptides non radicalaires. De plus, ces résultats montrent également des divergences dans la position et la forme des bandes. A 6 eV, la bande est plus fine et légèrement décalée de celle observée pour les peptides radicalaires. Vers 14 eV, le taux de photofragmentation décroit. Ces résultats laissent envisager qu'une voie de fragmentation de plus basse énergie semble alors être ouverte pour les espèces radicalaires, facilitant ainsi la rupture des chaines latérales des acides aminés aromatiques. Le taux d'absorption est alors modifié.

Pour comprendre ce phénomène, nous avons comparé nos résultats expérimentaux avec des spectres d'absorption théoriques dans la gamme VUV par des calculs TDDFT (B3LYP). Cependant, le nombre d'états électroniques à calculer pour ces pentapeptides dans le VUV est trop important et hors de portée des calculs TDDFT. C'est pourquoi les calculs ont été réalisés sur des chromophores modèles de phénol et d'indole. Les calculs utilisant la fonctionnelle B3LYP n'ont pris en compte que les excitations monoélectroniques, ce qui peut avoir une influence dans les hautes énergies du spectre d'absorption. Les résultats sont illustrés dans la *Figure IV.6* :

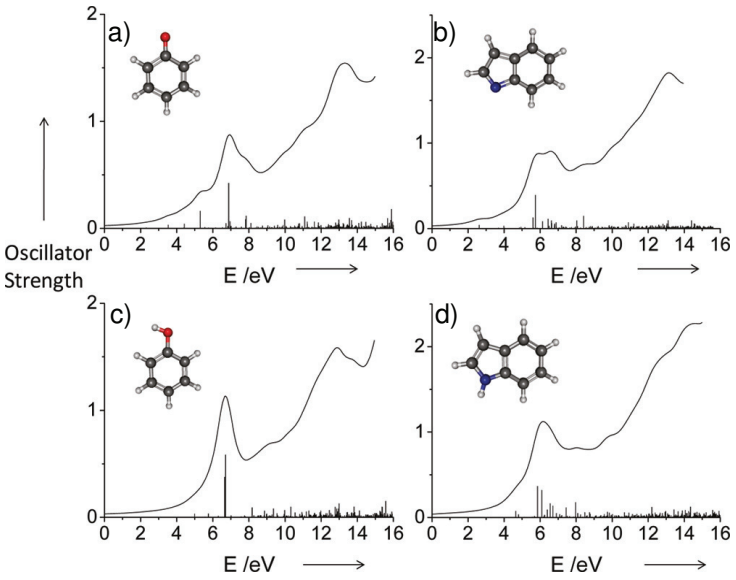
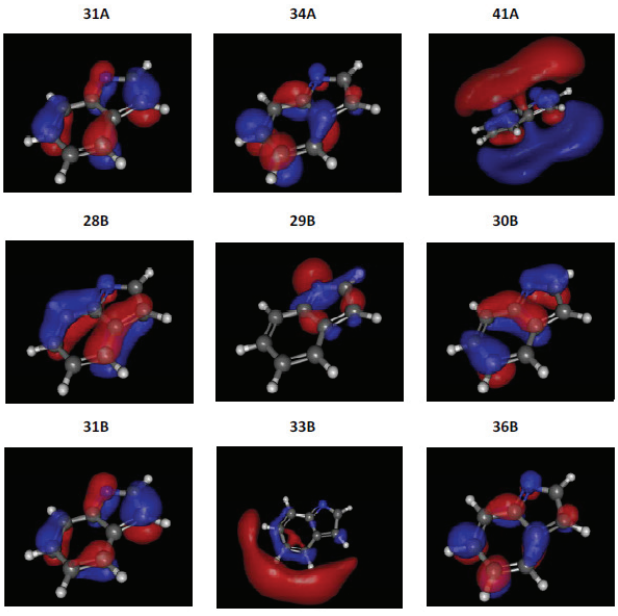


Figure IV.6 Spectre d'absorption théorique (TDDFT) pour le phénol et l'indole sous forme a) et b) radicalaire et c) et d), non radicalaire. La structure des composés est donnée en insert.

Pour le phénol et pour l'indole, les principales transitions ππ* attendues à 6.7 et 6.1 eV respectivement sont retrouvées expérimentalement.

Pour les espèces radicalaires, l'élargissement de la bande, observé aussi bien expérimentalement que théoriquement, est dû au fait que de nombreuses transitions entrent en compte entre 6 et 8 eV. Pour les chromophores modèles, les excitations électroniques correspondent principalement à des transitions à partir d'orbitales profondes π vers l'orbitale la plus basse inoccupée (LUMO) et vers d'autres orbitales plus énergétiques (*Figure IV.7*).



State	T_e (eV)	F_e	Configuration			Ci
1	5.74	0.389	30A	->	32A	-0.27851
			30A	->	39A	-0.14108
			31A	->	32A	-0.10290
			31A	->	34A	0.52544
			23B	->	31B	0.36873
			27B	->	31B	0.14950
			28B	->	32B	-0.28518
			28B	->	36B	-0.21513
			30B	->	32B	-0.35774
			30B	->	36B	0.15686
			30B	->	39B	0.11616
2	6.14	0.081	28A	->	32A	0.37485
			30A	->	34A	0.37914
			30A	->	39A	0.32107
			31A	->	39A	-0.34267
			23B	->	31B	0.33171
			28B	->	32B	-0.14286
			30B	->	32B	0.10854
			30B	->	36B	0.44210
			30B	->	39B	-0.23483
			30B	->	42B	-0.11046
3	6.44	0.111	28A	->	32A	-0.27305
			28A	->	34A	0.34481
			30A	->	32A	-0.10818
			30A	->	34A	-0.23339
			30A	->	39A	0.18972
			31A	->	39A	-0.31689
			31A	->	41A	-0.16299
			23B	->	31B	0.29904
			28B	->	32B	0.18456
			28B	->	36B	0.44735
			30B	->	36B	-0.29612
			30B	->	39B	-0.15862
			30B	->	42B	-0.11618

Figure IV.7 (A gauche) orbitales moléculaires du radical indole utilisées pour la description des excitations électroniques de la table (à droite) qui décrit la nature des transitions les plus intenses pour le radical indole à 6 eV.

Mis à part l'observation de cette bande aux alentours de 6 eV, les résultats obtenus par TDDFT ne coïncident pas avec ceux trouvés expérimentalement. En effet, les calculs théoriques ne traduisent ni l'augmentation du taux total de photofragmentation pour les espèces radicalaires, ni l'observation du plateau entre 10 et 16 eV. Notons que l'analyse de ces peptides en phase gazeuse permet d'enregistrer le taux de photofragmentation et non le taux d'absorption. L'efficacité de la fragmentation dépend donc à la fois de la section efficace de photoabsorption des espèces analysées et de leur probabilité de se fragmenter après excitation.

Selon les spectres d'absorption théoriques, aucune différence fondamentale n'est observée entre les formes radicalaires et non radicalaires. Les différences observées expérimentalement proviendraient alors de différentes dynamiques de relaxation des polyanions qui se traduiraient par la diminution des barrières d'activation menant à la fragmentation accrue par la formation de fragments neutres et stables (106 Da et 129 Da, comme illustré sur la *Figure IV.3*). L'observation de la perte de la chaine latérale des résidus aromatiques radicalaires serait alors favorisée. Ces résultats coïncident avec ceux obtenus par Laskin et *al.* qui ont montré que l'espèce radicalaire, instable, se fragmentent plus facilement que la même espèce protonée. Cette instabilité de l'espèce radicalaire est principalement déterminée par les cinétiques de dissociation [34].

Notons quand même que l'énergie du rayonnement VUV est élevée et que d'autres voies de fragmentation peuvent ainsi être ouvertes. De même, les anions peuvent simplement s'ioniser après interaction avec les photons VUV. Cette voie de fragmentation peut se faire par émission directe ou en deux étapes comme expliqué précédemment dans le chapitre III. La présence du radical sur les résidus aromatiques peut favoriser cette voie de fragmentation mais l'espèce résultante ne possède plus de charge nette et ne peut donc pas être détectée par spectrométrie de masse. Le tracé du courant ionique total (TIC) en fonction de l'énergie des photons peut nous permettre d'estimer l'efficacité du détachement d'électron. L'allure de ce tracé pour les peptides radicalaires et non radicalaires est similaire, comme illustré dans la *Figure IV.8* :

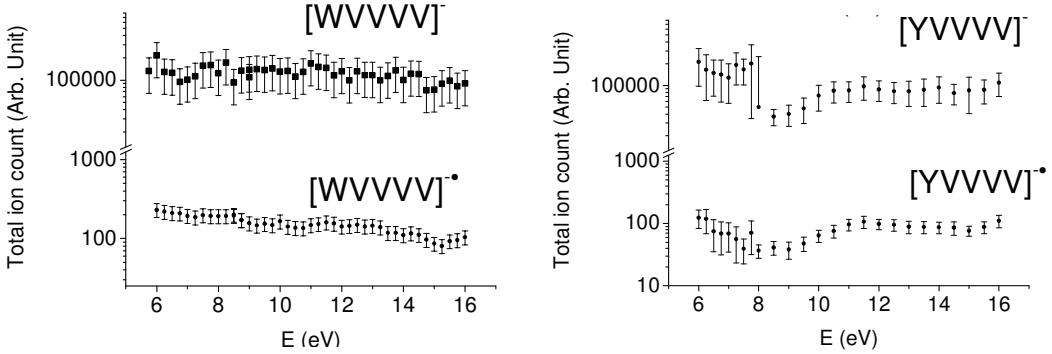


Figure IV.8 Courant ionique total (TIC) des peptides anioniques radicalaires ([YVVVV]$^{-\bullet}$ et [WVVVV]$^{-\bullet}$) et non-radicalaires ([YVVVV]$^{-}$ et [WVVVV]$^{-}$) exprimé en fonction de l'énergie des photons du rayonnement synchrotron.

Ces courbes montrent que l'évolution des TIC enregistrés en fonction de l'énergie des photons VUV pour les anions radicalaires et non-radicalaires est similaire. Ainsi, les différences entre les courbes de photofragmentation des espèces radicalaires et non radicalaires ne sont pas simplement liées à des différences dans l'efficacité d'ionisation. Ces résultats montrent également que l'évolution du TIC (en particulier pour les peptides contenant un résidu tryptophane), que ce soit pour les peptides radicalaires ou non-radicalaires, diminue légèrement en fonction de l'énergie des photons VUV. Le canal menant à la perte d'électron n'est donc pas fortement favorisé à haute énergie VUV, même si nous ne pouvons pas exclure cette voie. Notons que le TIC sans irradiation SR est similaire au TIC enregistré à 6 eV (pour tous les peptides). Un facteur d' ~ 1000 est observé entre le TIC des anions radicalaires et non-radicalaires car les anions radicalaires sont produits à partir du photodétachement d'électron de l'espèce $[M-2H]^{2-}$, tandis que les anions non radicalaires sont directement produits à partir de l'espèce $[M-H]^{1-}$, beaucoup plus abondante.

Un plateau est observé à partir de 10 eV. Ce résultat est surprenant puisque l'augmentation du taux de photoabsorption due à l'augmentation de la densité d'états devrait augmenter avec l'énergie des photons. Le tracé du courant ionique total des peptides radicalaires et non radicalaires décroit légèrement quand l'énergie du photon augmente. Le détachement d'électron n'est donc pas fortement favorisé à haute énergie, bien que nous ne puissions pas exclure cette voie de fragmentation.

IV.2.3. CONCLUSION

Nous avons pu générer des peptides radicalaires contenant un résidu Tyr ou Trp par photodétachement d'électron à partir des espèces dichargées. Nous avons ensuite enregistré le taux de photofragmentation de ces espèces radicalaires en fonction de l'énergie des photons VUV. Nous avons comparé ces résultats aux spectres obtenus pour les mêmes peptides non radicalaires et monochargés. La principale différence constatée est l'intensité du taux de photofragmentation, qui est dix fois supérieure pour les espèces radicalaires. D'autres différences telles que la position et la largeur des bandes ont également été observées.
L'augmentation de la fragmentation VUV par un nombre de grandeur due à la présence d'un radical Trp ou Tyr est un résultat important et pourrait ouvrir des perspectives en

radiobiologie, en particulier la combinaison des radiations VUV et des radicaux à longue durée de vie pourrait être utilisée comme cible en radiothérapie.
Ces résultats pourront également servir de références aux théoriciens pour la simulation de ces molécules dans des états hautement excités, afin de mieux comprendre les voies de désactivation complexe après absorption d'un photon VUV par une espèce radicalaire.

IV.3. SPECTROSCOPIE DE L'INSULINE RADICALAIRE

IV.3.1. INTRODUCTION

Cette partie étend l'approche du VUV sur des radicaux à des protéines entières et complète également l'étude réalisée sur l'insuline dans le chapitre précédent où nous avions vu que l'efficacité du photodétachement d'électron augmente avec le nombre de charges négatives portées par l'insuline. Grâce à ce montage à deux couleurs nous avons pu étudier la dépendance de l'efficacité du détachement dans le domaine du VUV en fonction de l'état d'oxydation du polyanion.

IV.3.2. SPECTROSCOPIE DE L'INSULINE RADICALAIRE

L'irradiation UV de l'insuline $[M-6H]^{6-}$ et $[M-4H]^{4-}$ mène principalement à la formation des espèces radicalaires $[M-6H]^{5-\bullet}$ et $[M-4H]^{3-\bullet}$. L'irradiation VUV subséquente de ces espèces a permis d'enregistrer leur spectre de photodétachement sur la gamme 6-16 eV.
Les spectres de photodétachement sont illustrés dans la *Figure IV.9* :

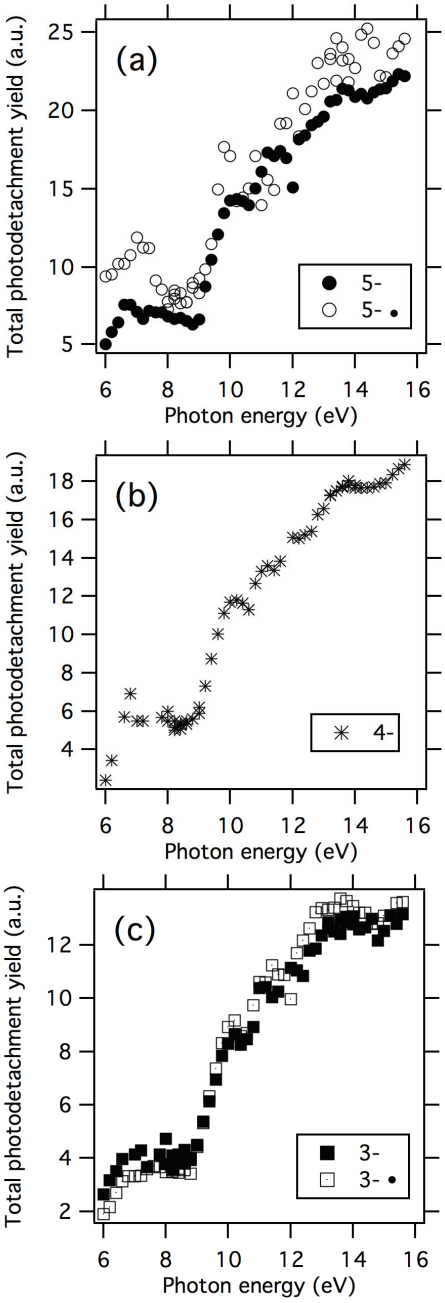


Figure IV.9 Taux de photodétachement d'électron en fonction de l'énergie des photons VUV pour a) $[M\text{-}6H]^{5-\bullet}$ et $[M\text{-}5H]^{5-}$, b) $[M\text{-}4H]^{4-}$ et c) $[M\text{-}4H]^{3-\bullet}$ et $[M\text{-}3H]^{3-}$. Ces spectres ont été obtenus en traçant ln((parent+Σfragments)/parent)/φ, avec φ le flux des photons, "parent" l'intensité du parent et "Σfragments" l'intensité de l'espèce oxydée.

Les taux de photodétachement obtenus pour les espèces $[M\text{-}4H]^{3-\bullet}$ et $[M\text{-}3H]^{3-}$ sont très similaires. Par contre, des différences notables sont observées pour les espèces radicalaire et non radicalaire $[M\text{-}6H]^{5-\bullet}$ et $[M\text{-}5H]^{5-}$, particulièrement entre 6 et 8 eV.

Entre 6 et 8 eV, l'espèce radicalaire $[M-6H]^{5-\bullet}$ a une réponse plus importante que l'espèce $[M-5H]^{5-}$. Ceci peut s'expliquer par la formation d'un radical sur l'une des tyrosines de l'insuline par photodétachement d'électron après irradiation UV de l'espèce $[M-6H]^{6-}$. En effet, une étude précédemment réalisée par L. Joly avait montré que les spectres d'action de l'insuline dans l'UV dépendaient de l'état de charge de la protéine [35]. Lorsque l'état d'ionisation du chromophore présent sur la tyrosine est modifié, un décalage du spectre optique est alors observé. Les quatre tyrosines présentes sur l'espèce $[M-4H]^{4-}$ sont neutres. L'espèce $[M-6H]^{6-}$ possède quant à elle, une tyrosine déprotonée, et une faible bande d'absorption est alors observée au delà de 300 nm. Cet effet bathochromique peut se traduire par l'augmentation de l'absorption du résidu Tyr lorsqu'il est sous forme radicalaire [35-37]. Ce phénomène avait également été observé dans le VUV lors des expériences de spectroscopie sur les pentapeptides contenant une tyrosine ou un tryptophane radicalaire [38]. La similarité des spectres d'action de $[M-4H]^{3-\bullet}$ et de $[M-3H]^{3-}$ soutient cette hypothèse puisque pour ces espèces, toutes les tyrosines sont sous forme neutre. Les espèces ne diffèrent que par la présence d'un radical sur un des groupements carboxyliques qui n'influe pas sur le taux de détachement dans le VUV.

IV.3.3. CONCLUSION

La comparaison des spectres optiques de l'insuline $[M-6H]^{5-\bullet}$ et $[M-5H]^{5-}$ montre l'influence de l'état d'oxydation de la tyrosine sur le spectre d'action. L'absorption de la tyrosine entre 6 et 8 eV est plus importante lorsque ce résidu est sous forme radicalaire. Les expériences de spectroscopie optique dans le VUV peuvent ainsi être utilisées comme signature de l'état d'oxydation de la tyrosine dans une protéine, comme cela avait déjà été démontré dans l'UV. Ce spectres sont également les premiers spectres d'action des protéines radicalaires dans le VUV et constituent donc des références pour les théoriciens.

IV.4. CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons étudié les propriétés optiques de peptides et protéines radicalaires dans le VUV.

Pour les pentapeptides contenant un résidu tyrosine ou tryptophane, l'intensité du taux de photofragmentation est dix fois supérieure lorsque l'espèce est sous forme radicalaire. Des simulations de ces molécules dans les états hautement excités sont nécessaires pour l'interprétation complète des spectres d'action.

Pour l'insuline qui est une petite protéine, les spectres d'action des espèces radicalaires et non radicalaires sont similaires lorsque toutes les charges sont portées par les groupements carboxyliques. Par contre, dès lors qu'une des tyrosines présente dans la séquence est sous forme radicalaire, des différences notables sont observées. Les expériences réalisées sur les espèces $[M\text{-}6H]^{5-\bullet}$ et $[M\text{-}5H]^{5-}$ illustrent ce phénomène avec une augmentation non négligeable du taux de photodétachement entre 6 et 8 eV lorsque la tyrosine est oxydée.

Les spectroscopies optiques UV et VUV peuvent donc être utilisées pour déterminer le degré d'oxydation des résidus aromatiques au sein des protéines.

IV.5. BIBLIOGRAPHIE

.

1. Stubbe, J. and W.A. van der Donk, *Protein radicals in enzyme catalysis.* Chemical Reviews, 1998. **98**(2): p. 705-762.
2. Kjeldsen, F., et al., *Dissociative capture of hot (3-13 eV) electrons by polypeptide polycations: an efficient process accompanied by secondary fragmentation.* Chemical Physics Letters, 2002. **356**(3-4): p. 201-206.
3. Joly, L., *Couplage spectroscopique / spectrométrie de masse : Propriétés optiques et photofragmentation de biomolécules*, in *Physique*. 2009, Université Lyon 1: Lyon.
4. Bellina, B., in *Physique*. 2012: Lyon.
5. Mishra, A.K., et al., *Long-Range Electron-Transfer in Peptides - Tyrosine Reduction of the Indolyl Radical - Reaction-Mechanism, Modulation of Reaction-Rate, and Physiological Considerations.* Journal of the American Chemical Society, 1994. **116**(4): p. 1414-1422.
6. Stubbe, J., et al., *Radical initiation in the class I ribonucleotide reductase: Long-range proton-coupled electron transfer?* Chemical Reviews, 2003. **103**(6): p. 2167-2201.
7. Giese, B., *Electron transfer in DNA.* Current Opinion in Chemical Biology, 2002. **6**(5): p. 612-618.
8. Dean, R.T., et al., *Free-Radical Damage to Proteins - the Influence of the Relative Localization of Radical Generation, Antioxidants, and Target Proteins.* Free Radical Biology and Medicine, 1991. **11**(2): p. 161-168.
9. Hawkins, C.L. and M.J. Davies, *Generation and propagation of radical reactions on proteins.* Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics, 2001. **1504**(2-3): p. 196-219.
10. Davies, M.J. and R.J.W. Truscott, *Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis.* Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 2001. **63**(1-3): p. 114-125.
11. Krisko, A. and M. Radman, *Protein damage and death by radiation in Escherichia coli and Deinococcus radiodurans.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(32): p. 14373-14377.
12. Berho, F. and R. Lesclaux, *The phenoxy radical: UV spectrum and kinetics of gas-phase reactions with itself and with oxygen.* Chemical Physics Letters, 1997. **279**(5-6): p. 289-296.
13. Sokolowski, A., et al., *Phenoxyl radical complexes of zinc(II).* Journal of the American Chemical Society, 1997. **119**(38): p. 8889-8900.
14. Aubert, C., et al., *Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase.* Nature, 2000. **405**(6786): p. 586-590.
15. Solar, S., et al., *Oxidation of Tryptophan and N-Methylindole by N3., Br2-, and (Scn)2- Radicals in Light-Water and Heavy-Water Solutions - a Pulse-Radiolysis Study.* Journal of Physical Chemistry, 1991. **95**(9): p. 3639-3643.
16. Radziszewski, J.G., et al., *Electronic states of the phenoxyl radical.* Journal of Chemical Physics, 2001. **115**(21): p. 9733-9738.
17. Baldwin, J., et al., *Mechanism of rapid electron transfer during oxygen activation in the R2 subunit of Escherichia coli ribonucleotide reductase. 1. Evidence for a*

transient tryptophan radical. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(49): p. 12195-12206.
18. Byrdin, M., et al., *Polarized transient absorption to resolve electron transfer between tryptophans in DNA photolyase.* Journal of Physical Chemistry B, 2008. **112**(22): p. 6866-6871.
19. Halfen, J.A., et al., *Synthetic models of the inactive copper(II)-tyrosinate and active copper(II)-tyrosyl radical forms of galactose and glyoxal oxidases.* Journal of the American Chemical Society, 1997. **119**(35): p. 8217-8227.
20. Shafaat, H.S., et al., *Spectroscopic Comparison of Photogenerated Tryptophan Radicals in Azurin: Effects of Local Environment and Structure.* Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(26): p. 9030-9039.
21. Schermann, J.P., *Spectroscopy and modeling oh biomolecular building blocks*. 2008, Amsterdam: Elsevier.
22. Butler, J., et al., *Charge-Transfer between Tryptophan and Tyrosine in Proteins.* Biochimica Et Biophysica Acta, 1982. **705**(2): p. 150-162.
23. Faraggi, M., M.R. Defelippis, and M.H. Klapper, *Long-Range Electron-Transfer between Tyrosine and Tryptophan in Peptides.* Journal of the American Chemical Society, 1989. **111**(14): p. 5141-5145.
24. Linstrom, P.J. and W.G. Mallard, *The NIST Chemistry WebBook: NIST Standard Reference Database Number 69*, ed. N.i.o.s.a. technology. 2011, Gaitherburgs.
25. Creighton, T.E., *Proteins*. 1993, New York: Freeman and Compagny.
26. Joly, L., et al., *Formation and spectroscopy of a tryptophan radical containing peptide in the gas phase.* Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(42): p. 13832-13833.
27. Anusiewicz, I., et al., *Backbone and side-chain cleavages in electron detachment dissociation (EDD).* Journal of Physical Chemistry A, 2005. **109**(49): p. 11332-11337.
28. Bowie, J.H., C.S. Brinkworth, and S. Dua, *Collision-induced fragmentations of the (M-H)(-) parent anions of underivatized peptides: An aid to structure determination and some unusual negative ion cleavages.* Mass Spectrometry Reviews, 2002. **21**(2): p. 87-107.
29. Ewing, N.P. and C.J. Cassady, *Dissociation of multiply charged negative ions for hirudin (54-65), fibrinopeptide B, and insulin A (oxidized).* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2001. **12**(1): p. 105-116.
30. Harrison, A.G., *Sequence-specific fragmentation of deprotonated peptides containing H or alkyl side chains.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2001. **12**(1): p. 1-13.
31. Reilly, J.P., *Ultraviolet Photofragmentation of Biomolecular Ions.* Mass Spectrometry Reviews, 2009. **28**(3): p. 425-447.
32. Thompson, M.S., W.D. Cui, and J.P. Reilly, *Fragmentation of singly charged peptide ions by photodissociation at lambda=157 nm.* Angewandte Chemie-International Edition, 2004. **43**(36): p. 4791-4794.
33. Parthasarathi, R., et al., *New Insights into the Vacuum UV Photodissociation of Peptides.* Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(5): p. 1606-1610.
34. Laskin, J., J.H. Futrell, and I.K. Chu, *Is dissociation of peptide radical cations an ergodic process?* Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(31): p. 9598-+.
35. Joly, L., et al., *Ultraviolet spectroscopy of peptide and protein polyanions in vacuo: Signature of the ionization state of tyrosine.* Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(27): p. 8428-+.

36. Laws, W.R. and J.D. Shore, *Spectral Evidence for Tyrosine Ionization Linked to a Conformational Change in Liver Alcohol-Dehydrogenase Ternary Complexes.* Journal of Biological Chemistry, 1979. **254**(8): p. 2582-2584.
37. Wetlaufer, D.B., J.T. Edsall, and B.R. Hollingworth, *Ultraviolet Difference Spectra of Tyrosine Groups in Proteins and Amino Acids.* Journal of Biological Chemistry, 1958. **233**(6): p. 1421-1428.
38. Brunet, C., et al., *Gas phase Photo-Formation and Vacuum UV Photofragmentation Spectroscopy of Tryptophan and Tyrosine Radical-Containing Peptides.* Journal of Physical Chemistry A, 2011. **115**(32): p. 8933-8939.

CHAPITRE V

COMPARAISON DES TECHNIQUES DE FRAGMENTATION D'A-EPD ET D'EDD

V.1. Introduction....155
V.2. a-EPD vs EDD de différents peptides modèles. 155
V.2.1. Substance P : RPKPQQFFGLM-OH 157
V.2.1.1. Pertes de neutres....158
V.2.1.2. Fragmentation 161
V.2.1.3. Conclusion 162
V.2.2. Caerulein : pEQDY(SO_3H)TGWMDF-NH_2 163
V.2.2.1. Pertes de neutres....164
V.2.2.2. Fragmentation 165
V.2.2.3. Conclusion 166
V.2.3. Les variants du M2TMP : 167
V.2.3.1. Pertes de neutres....168
V.2.3.2. Fragmentation 169
V.2.3.3. Conclusion 173
V.3. Conclusion générale 174
V.4. Bibliographie....175

V.1. INTRODUCTION

La spectrométrie de masse est devenue un outil incontournable pour l'étude de peptides et protéines. Nous avons énuméré précédemment plusieurs méthodes de fragmentation, dites en tandem, se différenciant par leur processus d'activation et le type de rayonnement incident. La dissociation suite au détachement d'électron d'un polyanion peut s'effectuer par des réactions de type ion-ion (niETD), ion-électron (EDD, nECD) et ion-photon (EPD). Il nous est apparu intéressant de comparer la distribution des fragments obtenus par ces différentes techniques. A ce titre, une collaboration avec Y. Tsybin a démarré, visant à comparer EDD et a-EPD sur des peptides de tailles variables : la substance P, la caerulein et des variants du M2TMP. Ce chapitre est ainsi consacré à la dissociation de peptides induite par EDD et a-EPD. La comparaison de ces deux techniques va nous permettre d'appréhender les différents mécanismes de fragmentation mis en jeu.

V.2. A-EPD VS EDD DE DIFFERENTS PEPTIDES MODELES.

La dissociation induite par détachement d'électron et la dissociation par photodétachement d'électrons sont deux techniques de fragmentation complémentaires, l'EDD faisant intervenir une réaction de type ion - électron tandis que l'a-EPD consiste en l'irradiation de la molécule par des photons UV. Dans les deux cas, un électron est éjecté du polyanion créant ainsi une espèce radicalaire plus ou moins énergétique. En a-EPD, l'irradiation UV à 266 nm (4.66 eV) permet l'excitation électronique des acides aminés aromatiques provoquant ainsi le départ d'un électron. L'excès d'énergie apportée par le photon correspond à l'énergie du photon initial (4.66 eV) moins l'énergie nécessaire au détachement d'électron du site aromatique de la molécule (~2.5-3.5eV). Cet excès d'énergie d'environ 1.5 eV est distribué entre l'énergie interne de l'espèce oxydée résultante et l'énergie cinétique de l'électron. L'excès d'énergie laissé dans l'espèce oxydée est donc faible. Le radical ainsi formé est relativement stable et une étape MS^3 d'activation collisionnelle est donc nécessaire pour induire sa fragmentation.

$$\begin{aligned} M^{n-} &\xrightarrow{h\nu} M^{(n-1)-\bullet} \\ M^{(n-1)-\bullet} &\xrightarrow{CID} F_1^{m-} + F_2^{k-\bullet} + N \end{aligned} \qquad (1)$$

Avec F^- les fragments anioniques, $F^{-\bullet}$ les fragments anioniques radicalaires et N les fragments neutres.

En EDD, des électrons énergétiques (>10 eV) sont bombardés sur la molécule provoquant ainsi le départ d'un électron. Le mécanisme proposé par Zubarev implique une ionisation de la chaine polypeptidique donnant lieu à une paire (+•) [1]. La recombinaison exothermique entre cette charge positive radicalaire et une des charges négatives portées par le polypeptide entraine une excitation électronique et la rupture des liaisons peptidiques sans nécessiter d'apport d'énergie supplémentaire. L'énergie de la recombinaison d'environ 5 eV correspond à la différence entre le potentiel d'ionisation du polypeptide (~8 eV) et l'affinité électronique du groupe portant la charge négative qui est généralement l'acide carboxylique (EA_{COO^-} = 3.5 eV).

$$\begin{aligned} {}^{-}XR{-}.....{-}RX^{-} + e_{fast}{}^{-} &\xrightarrow{>10eV} {}^{-}XR{-}..(+\bullet)...{-}RX^{-} + 2e^{-} \\ &\xrightarrow{\text{énergie en excès}} {}^{\bullet}XR{-}.....{-}RX^{-} \xrightarrow{\text{dissociation}} F_1^{m+} + F_2^{k+\bullet} \end{aligned} \qquad (2)$$

Avec X = COO^-, SO_3^- …

L'excitation électronique permet d'obtenir une fragmentation non statistique donnant principalement des ions *a* et *x* en EDD comme en a-EPD. Pour mieux comprendre la chimie des radicaux et les mécanismes de fragmentation de ces deux méthodes, nous avons choisi de comparer les techniques EDD et a-EPD. Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Y. Tsybin sur différents polypeptides dont les séquences en acides aminés ont été choisies dans le but d'explorer l'influence de l'état de charge, de la position de la charge et du radical sur le spectre de fragmentation. Nous avons travaillé avec différents peptides modèles : La substance P, la caerulein, et des variants du M2TMP dont les séquences seront données par la suite.

Les expériences d'a-EPD ont été réalisées au sein de notre laboratoire, avec le spectromètre de masse LTQ. Les expériences d'EDD ont été réalisées par l'équipe de Y. Tsybin, sur un FTICR MS (7 Teslas). Les spectres obtenus en EDD et en a-EPD n'ont donc pas été réalisés sur le même type d'appareil. Notons cependant que les spectres obtenus sous vide poussé de la cellule ICR par l'équipe de Tsybin sont semblables à ceux précédemment réalisés par l'équipe de Zubarev [2] lors des expériences de dissociation de la substance P dans un piège à ions quadripolaire.

V.2.1. SUBSTANCE P : RPKPQQFFGLM-OH

Ce peptide de 1346.5 Da ne contient aucun acide aminé acide, seul le groupe terminal carboxylique est susceptible d'être facilement déprotoné. Les spectres obtenus après EDD, a-EPD sur $[M-2H]^{2-}$ et CID sur $[M-H]^-$ sont présentés sur la *Figure V.1.*

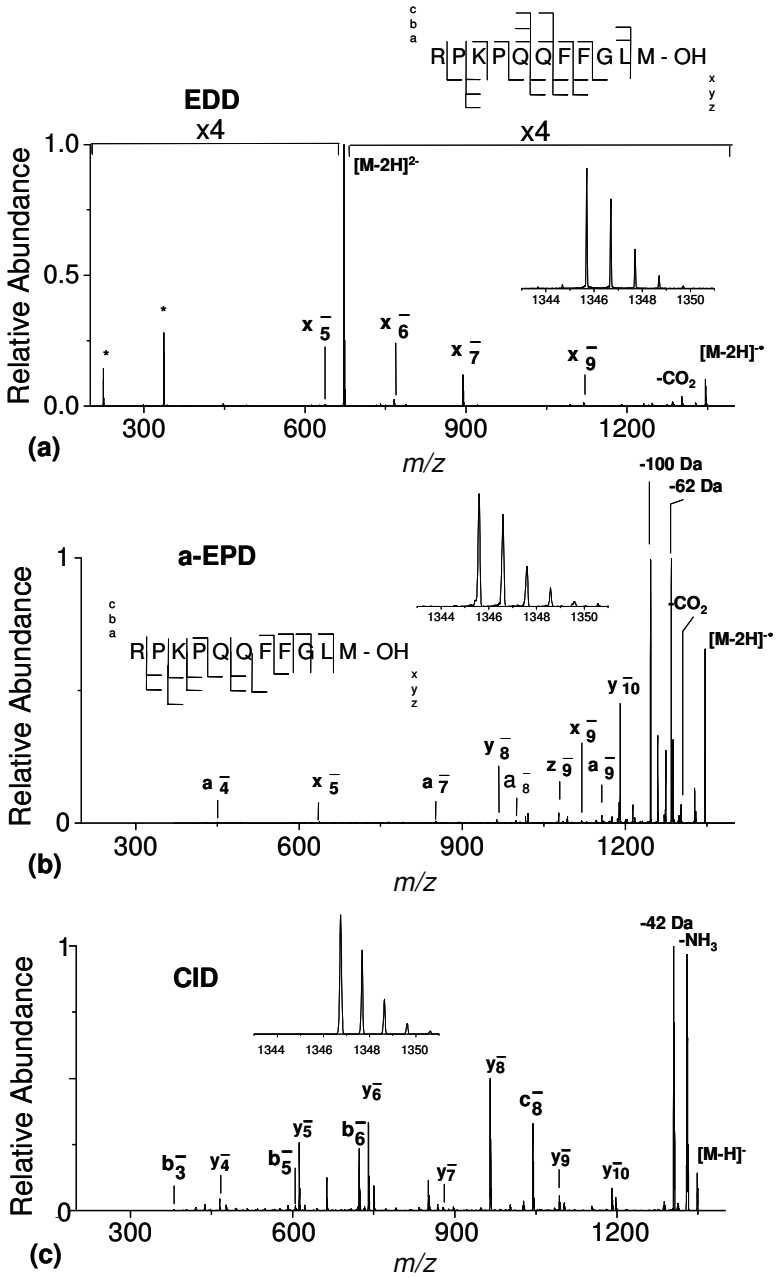


Figure V.1 Comparaison de la fragmentation de la substance P obtenue par (a) EDD (~10 eV) de l'espèce $[M-2H]^{2-}$, (b) a-EPD (266 nm) de $[M-2H]^{2-}$ (l'énergie de collision dans l'étape de CID est de 17%), (c) CID (19%) de $[M-H]^-$

V.2.1.1. PERTES DE NEUTRES

L'irradiation à 266 nm de la substance P $[M-2H]^{2-}$ provoque la formation de l'espèce oxydée $[M-2H]^{-\bullet}$. Après activation collisionnelle de cette espèce radicalaire, le spectre d'a-EPD montre d'intenses pertes de neutres de 44 Da, 62 Da, et 100 Da, correspondant respectivement aux pertes de CO2, de la chaine latérale de la méthionine et de l'arginine.

Les pertes de neutres de CO_2 et des chaines latérales des acides aminés aromatiques sont couramment observées lors des expériences de photodétachement d'électron (EPD) [3, 4]. Elles peuvent être issues d'un mécanisme monophotonique de dissociation rapide dû à l'excitation laser, ou bien provenir de l'absorption de deux photons. En a-EPD, ces pertes peuvent également être obtenues après fragmentation CID de l'espèce oxydée.

Les pertes de neutres par dissociation rapide peuvent provenir de la formation d'un état électronique non liant après éjection d'un électron, comme déjà observé sur des agrégats anioniques [5]. Peu observé dans l'UV-Vis, où l'espèce radicalaire possède une faible énergie interne, ce phénomène est favorisé lors des expériences dans le VUV, où l'énergie des photons incidents est plus importante [6]. Un autre mécanisme possible est l'excitation de la molécule avec des photons d'énergie supérieure à l'énergie nécessaire pour arracher un électron (BE). L'énergie en excès ne se transformerait alors pas totalement en énergie cinétique électronique et l'espèce oxydée ainsi formée possèderait ainsi une énergie interne suffisante pour dissocier. Il est toujours indispensable de vérifier la linéarité du taux de détachement en fonction de la puissance laser afin de confirmer que le détachement d'électron est bien un processus monophotonique. En général, ces dissociations rapides se traduisent en pertes de neutres de petite taille, accompagnées d'une réduction de charge et menant ainsi à la formation d'autres espèces que $[M-2H]^{-\bullet}$, telles que $[M-2H-CO_2]^{-\bullet}$ par exemple.

Pour comprendre l'origine de ces pertes de neutres en EPD, Antoine et al. ont étudié deux variants de l'angiotensine II, de séquences DRVYVHPF (1) et NRVYVHPF (2) par des expériences de photodétachement réalisées à 266 nm [7]. Les deux groupements carboxyliques présents dans la séquences du variant (1) porteront les charges négatives. L'acide aspartique du variant (1) a été remplacé par une asparagine dans la séquence du variant (2) et la seconde charge sera donc portée par le groupement phénolique de la tyrosine.

Dans les deux cas, une perte du groupement CO_2 est observée. L'étude de la linéarité de la formation de l'espèce radicalaire et de l'évolution de la perte de CO_2 en fonction de la puissance laser ont permis de montrer que cette perte est due à un processus monophotonique dans le cas du variant (1) et multiphotonique pour le variant (2). Cette différence est due à la position initiale du radicalaire. Le radical formé sur le variant (1) se trouve sur un groupement carboxylique et la recombinaison radicalaire menant à la perte de CO_2 peut avoir lieu sans migration radicalaire préalable. L'énergie interne de l'ion radicalaire est alors suffisante pour observer ce phénomène sans nécessité l'absorption d'un second photon. Pour le variant (2), l'irradiation à 266 nm semble initier le départ de l'électron à partir de l'oxygène du groupement phénolique de la tyrosine. La perte de CO_2 sous-entend alors la migration du radical présent sur cet oxygène vers le groupe carboxylate (*Figure V.2*). En effet, d'après les courbes de linéarité, l'absorption d'un second photon serait nécessaire pour franchir la barrière énergétique permettant la migration radicalaire. Dans ce cas, la perte de CO_2 est alors issue d'un processus multiphotonique.

Les pertes de neutres peuvent également être observées après isolation et activation de l'espèce oxydée par CID. En effet, comme l'irradiation UV-Vis de polyanions génère la formation d'une espèce radicalaire peu énergétique, une étape supplémentaire d'activation vibrationnelle par CID est requise pour obtenir la fragmentation peptidique. Nous noterons que la possibilité de former puis d'exciter le radical en deux temps distincts présente l'avantage de pouvoir contrôler précisément l'excitation radicalaire aussi bien lors de l'activation CID (pourcentage et temps d'excitation) ou lors d'expériences à deux couleurs (longueur d'onde, temps d'irradiation).

Dans le cas de la substance P, l'observation de la perte de CO_2 est observée en EDD et en a-EPD. Comme expliqué précédemment, cette perte traduirait la présence du radical sur le groupement carboxylate terminal. Il est probable que la perte de l'électron soit directement initiée à partir de la charge négative portée par le groupement carboxylate. Nous noterons cependant que cette perte est plus intense en a-EPD qu'en EDD. Seul un certain pourcentage de la population d'ions semble porter le radical sur le groupement C-terminal.

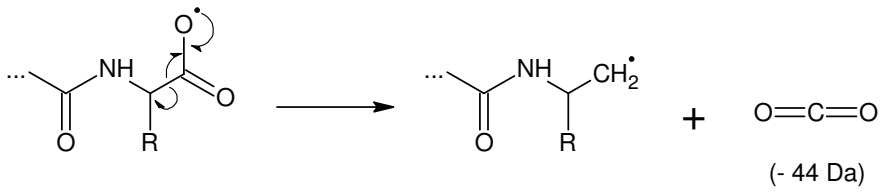


Figure V.2 Mécanisme proposé pour la perte de 44 Da

La perte de 100 Da correspond à la fragmentation de la chaine latérale de l'arginine (*Figure V.3*). Cette perte est de très faible intensité en EDD et semble être due à la formation d'un radical sur l'amine terminale, qui pourrait être un second site de déprotonation [8, 9].

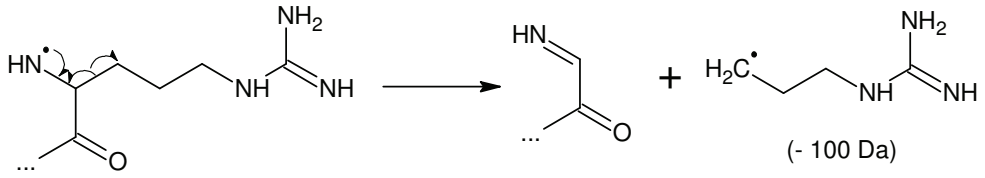


Figure V.3 Mécanisme proposé pour la perte de 100 Da

Pour confirmer cette hypothèse, la même expérience a été réalisée sur un autre peptide, le MRFA. Comme pour la substance P, ce peptide ne possède aucun acide aminé acide et les sites de déprotonation sont donc supposés être les mêmes. Ici, la méthionine se retrouve du coté N-terminal, tandis que l'arginine se retrouve en milieu de séquence. On ne s'attend donc pas à observer la perte de 100 Da (chaine latérale arginine) mais celle de 62 Da (chaine latérale méthionine). Après irradiation du $[MRFA\text{-}2H]^{2-}$ à 266 nm et fragmentation CID du $[MRFA\text{-}2H]^{-\bullet}$, une très faible perte de 100 Da est observée tandis que la perte de 62 Da domine sur le spectre de fragmentation. Ces observations appuient l'hypothèse que l'amine terminale est le second site de déprotonation d'où peut également s'arracher l'électron.

Les pertes de neutres observées en a-EPD diffèrent de celles observées en EDD, au moins dans leur intensité. Ces différences peuvent provenir de plusieurs facteurs. Premièrement, les expériences d'EDD ont été réalisées avec des électrons de 10 eV tandis ce que les expériences d'a-EPD ont été réalisées à 266 nm, soit avec des photons de 4.6 eV. L'excès d'énergie laissée dans l'espèce oxydée diffère selon le type d'activation du peptide. Elle est d'environ 1 eV lors des expériences d'a-EPD tandis qu'elle est de l'ordre de 5 eV en EDD. Ainsi, le détachement d'électron, qu'il soit initié par collision avec des électrons ou par collision avec

des photons, possède des énergétiques et des cinétiques différentes. La fragmentation subséquente ne suivra pas le même mécanisme. Le détachement n'a pas forcément lieu à partir du même groupement en a-EPD et en EDD et la formation de différents sites radicalaires selon les techniques, expliquerait les différents mécanismes de fragmentation observés. De plus, la faible énergie déposée dans l'espèce radicalaire en a-EPD rend l'étape de collision CID indispensable pour que le peptide se dissocie. La migration radicalaire est ainsi favorisée et peut influer sur la fragmentation subséquente.

V.2.1.2. FRAGMENTATION

La *Figure V.1* illustre le fait que les expériences d'a-EPD et l'EDD génèrent principalement des fragments de type *a*/*x*, qui correspondent à la rupture de la liaison C_α-C de la liaison peptidique. Les ions *a* observés en a-EPD sont majoritairement sous forme radicalaire $a^\bullet$. La proximité spatiale d'un groupement acide peut solvater le squelette peptidique et la formation des ions $a^\bullet$ peut être expliquée par la recombinaison radicalaire proposée dans la *Figure V.4* :

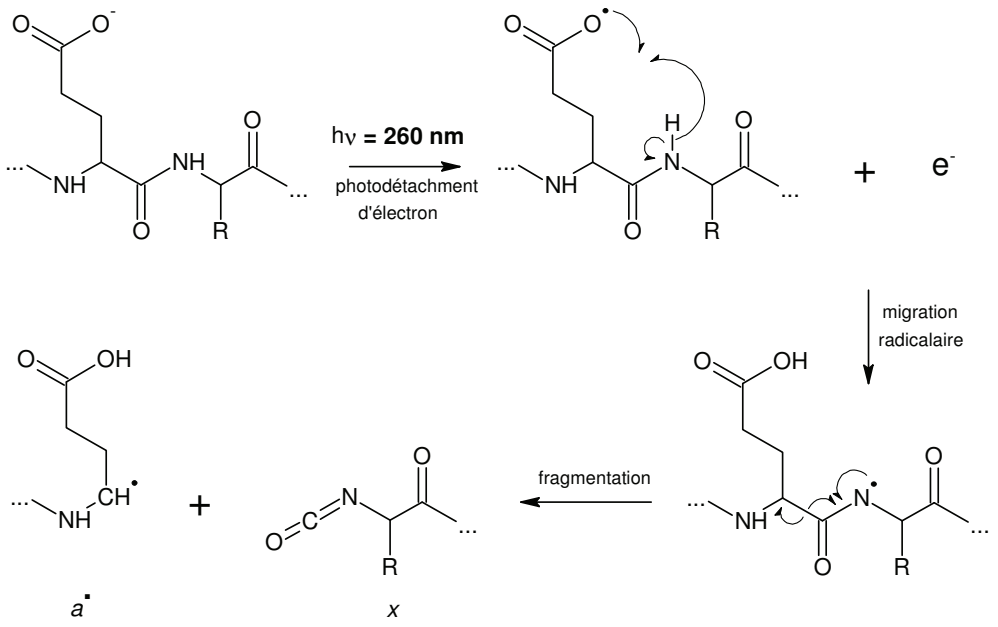


Figure V.4 Mécanisme proposé pour l'obtention des ions $a^\bullet$ et x

En EDD, les ions de la série *a* ont une intensité quasi négligeable et c'est une série d'ions *x* qui prédomine. Comme la substance P ne possède aucun acide aminé acide dans sa séquence, l'observation de cette série d'ions *x* en EDD indique que la charge est donc préférentiellement retenue sur l'acide carboxylique du coté C-terminal (pKa faible). En EDD, l'électron serait alors éjecté du second site de déprotonation, qui semblerait être le groupement amine terminal. Tandis qu'en a-EPD, le radical peut être indifféremment porté par le groupement N-terminal ou C-terminal.

Comme l'a-EPD et l'EDD font appel à des mécanismes d'activation aux énergétiques totalement différentes, l'absence des ions *a* et des pertes de neutres, pourtant favorisés en EPD par la proximité du radical N-terminal (-100 Da, ion y_{10}), n'exclue pas la possibilité que le radical soit quand même originellement formé sur l'amine terminale en EDD. En effet, si la cinétique de formation des ions *a/x* est plus rapide que celle permettant de former les ions à proximité du site radicalaire, l'absence de ces ions serait alors justifiée.

Lors des expériences d'a-EPD sur la substance P, le principal fragment observé est le fragment y_{10}. Il correspond à la rupture entre l'arginine$_1$ et la proline$_2$ au voisinage du groupement N-terminal. Ce fragment est également observé lors de la fragmentation EDD du $[M-2H]^{2-}$ et CID du $[M-H]^-$ mais avec une intensité beaucoup plus faible. La forte intensité de cet ion en a-EPD laisse ainsi penser que la rupture de la liaison entre la proline et arginine est favorisée par une recombinaison radicalaire à partir de l'amine terminale.

V.2.1.3. CONCLUSION

La substance P ne possède aucun acide aminé acide. En a-EPD, l'observation de l'ion majoritaire y_{10} montre que l'amine terminale est le second site de déprotonation. L'obtention de ce fragment ainsi que les pertes intenses de CO_2 et de la chaine latérale de l'arginine indiquent que la perte d'électrons peut se produire aussi bien à partir de l'acide carboxylique coté C-terminal qu'à partir du groupement de l'amine déprotonée coté N-terminal. Nos résultats ne nous permettent pas d'affirmer la localisation du site de départ de l'électron en EDD mais cependant, l'absence d'ions *a* en EDD suggèrent que la charge est préférentiellement retenue par groupement carboxylique.

V.2.2. CAERULEIN : PEQDY(SO$_3$H)TGWMDF-NH$_2$

Ce peptide de 1351.4 Da possède trois chromophores (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et un groupement sulfate sur la tyrosine. Du fait de ses nombreux chromophores, l'irradiation à 260 nm de ce polyanion $[M-2H]^{2-}$ conduit à un taux de détachement très élevé (*Figure V.5*). De plus, ce peptide contient trois acides aminés acides ce qui fait de lui un bon candidat à l'étude de la fragmentation peptidique en mode négatif.

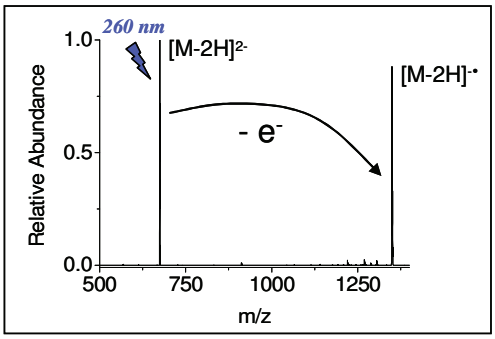


Figure V.5 Le spectre EPD de la caerulein $[M-2H]^{2-}$ à 260 nm (500ms activation) montre un taux de photodétachement de l'ordre de 90%

Les spectres obtenus après EDD, a-EPD sur $[M-2H]^{2-}$ et CID sur $[M-H]^-$ sont présentés dans la *Figure V.6*.

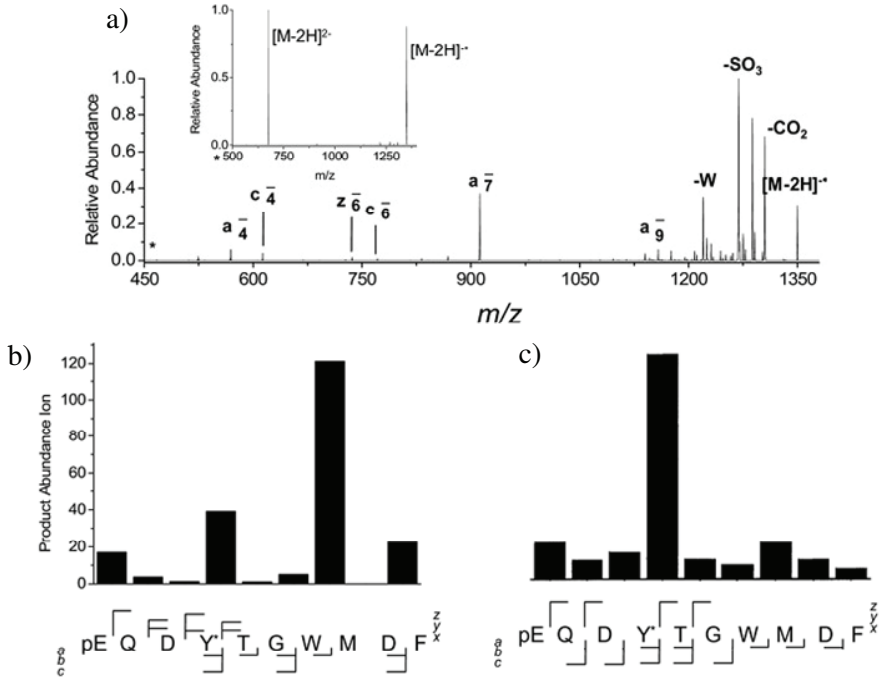


Figure V.6 a) Spectre d'a-EPD de la caerulein $[M-2H]^{2-}$. L'insert montre le spectre de photodétachement après 500 ms d'irradiation à 260 nm. Abondance des ions produits (PIA) de la caerulein en b) a-EPD et c) EDD

V.2.2.1. PERTES DE NEUTRES

Le spectre obtenu en a-EPD montre d'intenses pertes de SO_3 et de CO_2. Comme pour la substance P, ces pertes de neutres résultent respectivement de l'oxydation des groupements sulfates et carboxylates. Le pic à 1288 Da correspond à la perte de $[CO_2 + NH_3]$. La perte de NH_3 est souvent observée lorsque les peptides contiennent une glutamine dans leur séquence[10]. Ces pertes sont également observées en EDD.

Le pic à 1220 Da correspond à la perte de la chaine latérale du tryptophane (- 129 Da) et laisse envisager la formation momentanée d'un radical sur le groupement indole du tryptophane[11]. Le mécanisme de fragmentation est illustré ci-dessous. Le tryptophane joue un rôle particulier dans l'excitation des peptides puisque c'est celui qui possède la plus forte absorbance dans l'UV. Il est également connu pour stabiliser les radicaux. Une fragmentation particulièrement intense est observée au voisinage du tryptophane lors de la dissociation a-

EPD de peptides contenant ce résidu. On notera l'absence de ce pic lors des expériences d'EDD.

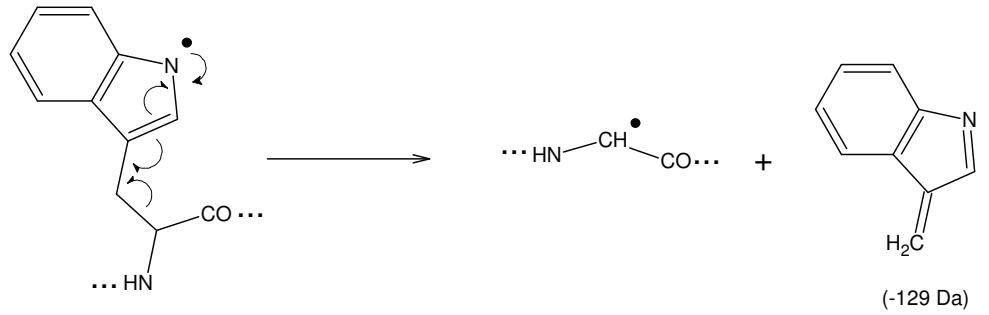


Figure V.7 Mécanisme proposé pour la perte de 129 Da

V.2.2.2. FRAGMENTATION

En a-EPD, le spectre contient des fragments *a* et *c*, mais également *y* et *z* en plus faible intensité, dus aux ruptures de liaisons du squelette peptidique. La plupart des fragments comportent la fonction sulfate, groupement qui n'aurait pu être identifié par les méthodes d'excitation vibrationnelle.

Bien que le fragment a_7 ne soit que très faiblement observé en EDD, c'est de loin le plus intense en a-EPD. Il correspond à la rupture de la liaison peptidique entre les résidus tryptophane et méthionine. Comme pour la perte de la chaine latérale du tryptophane, l'importante intensité de cet ion est signe de la formation d'un tryptophane radicalaire qui favoriserait ce type de fragmentation lors des expériences en a-EPD.

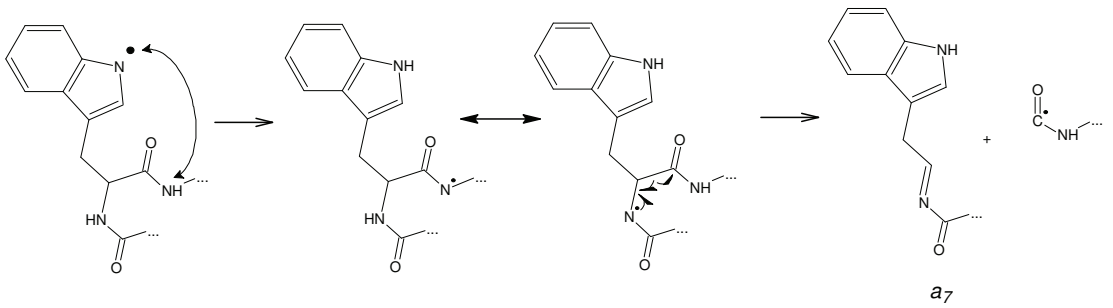


Figure V.8 Mécanisme proposé pour la formation de l'ion a_7

Comme illustré sur les PIA de la *Figure V.6*, la fragmentation EDD mène principalement aux séries d'ions *a*, *c* et *z*. Les fragments les plus intenses (a_4, c_4…) sont ceux qui correspondent à la rupture du squelette peptidique proche de la tyrosine qui contient le groupement sulfate, un des deux groupements les plus facilement déprotonables. Dans le cas de la caerulein, la charge peut être portée coté C-terminal et N-terminal puis ce que des résidus acides sont présents aux deux extrémités. Les fragments proches du tryptophane ne sont observés qu'avec une très faible intensité. Il n'y a pas de migration radicalaire vers le groupement indole du tryptophane.

V.2.2.3. CONCLUSION

En a-EPD, les pertes de CO_2, SO_3, 129 Da et la formation du fragment a_7 sont issues de l'autoionisation de CO_2^- et de SO_3^- suivie soit par la perte de CO_2 et SO_3 soit par migration du radical vers le tryptophane. En effet, l'obtention du fragment a_7 et de la perte de la chaine latérale du tryptophane semblent tous deux provenir de la formation d'un tryptophane radicalaire qui favoriserait l'obtention de ces ions. Il ne faut cependant pas exclure la possibilité que le tryptophane soit le second site de déprotonation et que le radical soit formé directement sur cet acide aminé par photoionisation ($Trp^- \rightarrow Trp^\bullet$). En effet, lors de l'irradiation UV de peptide à 260 nm, ce sont les chromophores des acides aminés aromatiques qui sont excités. Ainsi le couplage entre les états électroniquement excités du tryptophane et les états autoionisants menant au détachement d'électron à partir des groupements carboxylate et sulfonate doit être favorisé par la proximité du groupe indole avec les groupements portant les charges négatives.

En EDD par contre, la perte de 129 Da et la formation du fragment a_7 sont très peu abondants. Ces différences d'intensité entre les ions produits par a-EPD et par EDD indiquent que la migration et la stabilisation du radical vers le tryptophane sont favorisées en a-EPD lors de l'étape de collision, non présente en EDD.

V.2.3. LES VARIANTS DU M2TMP :

Pour élargir cette étude, nous avons choisi de réaliser ces expériences sur des peptides de plus grandes tailles pour lesquelles des variations d'acides aminés sur la séquence ont été réalisées. Nous étudierons quatre différents variants du M2 TMP :

M2 TMP: SSDPLV**V**AASII**G**IL**H**LILWILDRL, M = 2726.61 $g.mol^{-1}$

M2 TMP L13@G13 : SSDPLVVAASII**L**ILHLILWILDRL, M = 2782.68 $g.mol^{-1}$

La $Lysine_{13}$ remplace la $Glycine_{13}$ du M2 TMP

M2 TMP G7@V7 : SSDPLV**G**AASIIGILHLILWILDRL, M = 2684.57 $g.mol^{-1}$

La $Glycine_7$ remplace la $Valine_7$ du M2 TMP

M2 TMP G16@H16 : SSDPLVVAASIIGIL**G**LILWILDRL, M = 2646.58 $g.mol^{-1}$

La $Glycine_{16}$ remplace l'$Histidine_{16}$ du M2 TMP

Dans cette étude, les expériences ont été réalisées sur les variants du M2 TMP triplement déprotonés $[M-3H]^{3-}$.

Les spectres du variant G7@V7 obtenus en EDD, a-EPD du $[M-3H]^{3-}$ et en CID du $[M-2H]^{2-}$ sont illustrés sur la *Figure V.9*.

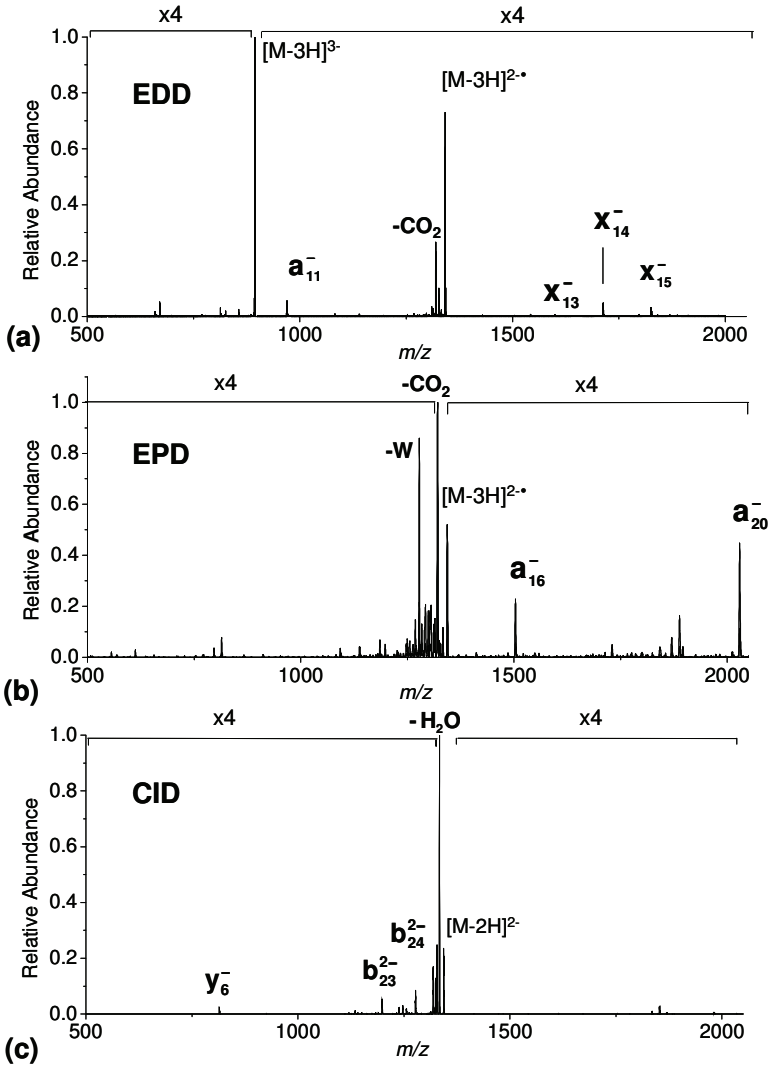


Figure V.9 Comparaison de la fragmentation du variant G7@V7du M2TMP obtenue par (a) EDD (~10 eV) de l'espèce $[M-3H]^{3-}$, (b) a-EPD (260 nm) de $[M-3H]^{3-}$ (l'énergie de collision dans l'étape de CID est de 17%), (c) CID (19%) de $[M-2H]^{2-}$

V.2.3.1. PERTES DE NEUTRES

Comme observé précédemment, les spectres EDD et a-EPD du variant G7@V7 montre une intense perte de CO_2. En a-EPD on observe également la perte de la chaine latérale du tryptophane (-129 Da) indiquant une fois de plus la formation d'un tryptophane radicalaire.

V.2.3.2. FRAGMENTATION

La fragmentation EDD issue de la rupture des liaisons peptidiques donne principalement des ions de type *a* et *x*. Contrairement à la substance P qui avait pour seul groupe acide le groupement carboxylique terminal, les variants du M2 TMP possèdent plusieurs résidus acides dans leur séquence, et la charge peut ainsi être portée du coté C-terminal comme du coté N-terminal. Ceci justifie l'observation des séries d'ions *a* et *x*. La fragmentation est particulièrement efficace vers le centre du peptide entre les résidus Ile_{11} et Ile_{12}. Les ions a_{11} et x_{14} sont majoritairement observés. En a-EPD, les séries d'ion *a*, *x* et *z* sont observées tout au long de la séquence et permettent d'obtenir une meilleure couverture de séquence qu'en EDD.

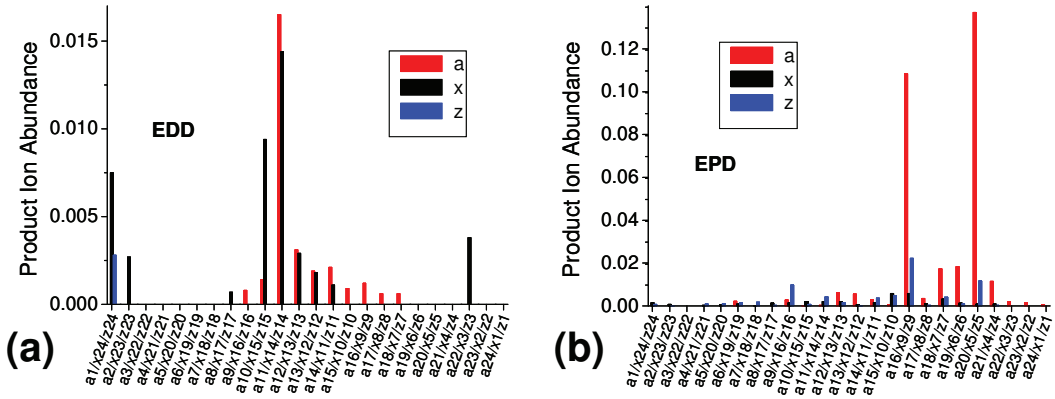


Figure V.10 Abondance des ions produits (PIA) (intensité des fragments a, x et z) obtenus en (a) EDD et en (b) a-EPD pour les variants du M2TMP G7@V7.

Cette série d'ions *z* observée en a-EPD n'est pas présente en EDD. Les deux fragments principaux z_5 et z_9 correspondent respectivement aux ruptures des liaisons coté C-terminal du tryptophane et de l'histidine. L'observation des ions *z* et de leurs équivalents (ions *c*) pourrait s'expliquer par la formation d'un cation radicalaire sur la chaine latérale du tryptophane (ou de l'histidine). Le fragment *z* au voisinage du tryptophane avait déjà été observé lors de l'étude de la melittine [4]. L'irradiation UV excite principalement le tryptophane à 260 nm. La relaxation résultante pourrait se traduire par l'ionisation du groupement indole permettant ainsi la formation du cation radical. La voie de relaxation, soit par détachement d'électron à partir d'une charge négative ou par photoionisation de la chaine latérale du tryptophane, semble dépendre de la conformation du peptide. Notons que l'IP de l'indole (~ 8eV) est bien

supérieur à l'énergie d'excitation du laser (4.66 eV) mais l'IP donnant lieu à l'éjection d'un électron directement à partir de l'indole peut fortement dépendre de l'environnement de la charge portée par le peptide. La compréhension du mécanisme donnant lieu à la création des ions z intenses au voisinage des chromophores nécessite de plus amples expériences complétées par une approche de chimie quantique.

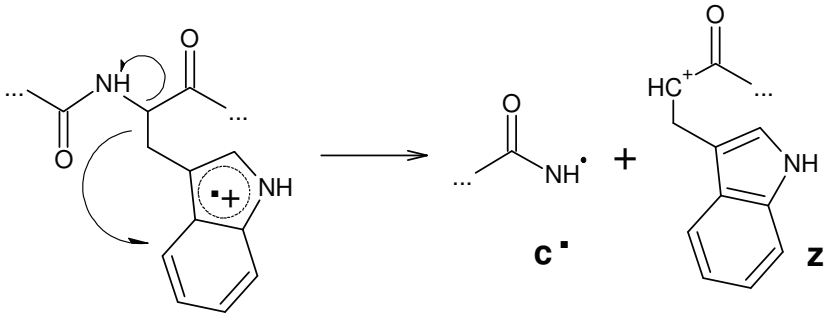


Figure V.11 Mécanisme proposé pour la formation des ions c• et z

L'analyse de la structure isotopique de ce fragment a montré un mélange entre les ions c et c•. Il n'est pas exclu qu'un mécanisme impliquant la formation d'un tryptophane neutre soit impliqué comme le propose K. Breuker lors d'expériences EDD [12].

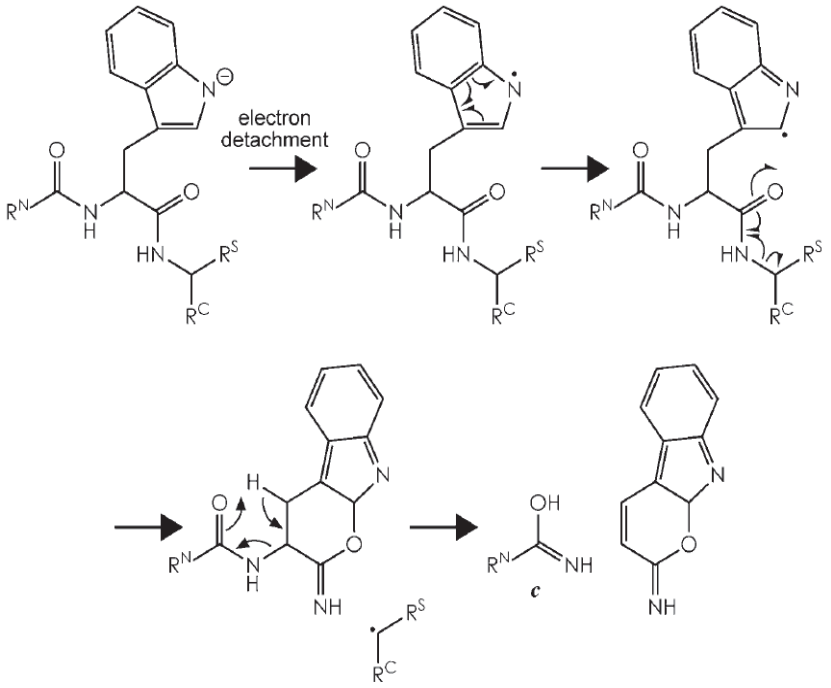


Figure V.12 Mécanisme proposé pour la formation des ions c et z•

Sur le spectre a-EPD, les ions a_{16} et a_{20} sont de loin les plus abondants. L'ion a_{20} correspond à la rupture de la liaison peptique du tryptophane, coté C-terminal. Comme expliqué pour la caerulein, l'intensité de ce fragment est due à la formation d'un tryptophane radicalaire (*Figure V.8*). L'ion a_{16}, quant à lui, correspond à la fragmentation de la chaine peptidique coté C-terminal de l'histidine. La forte intensité de cet ion suggère que le radical migre également sur la chaine latérale de ce résidu. Cette hypothèse est confirmée par l'absence de l'ion a_{16} lors des expériences d'a-EPD sur le variant G16@H16, où l'histidine a été remplacée par la glycine.

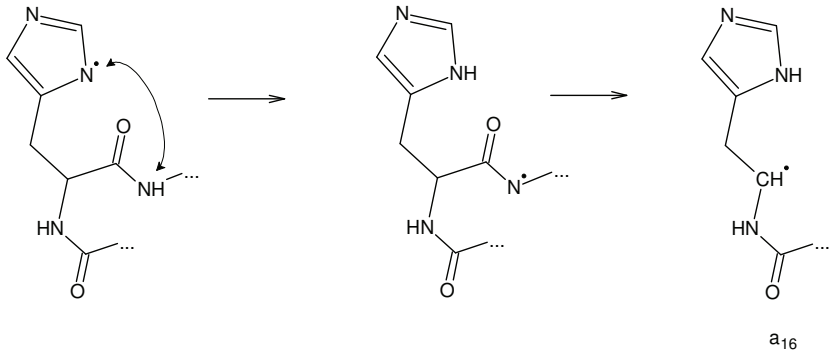


Figure V.13 Mécanisme proposé pour la formation de l'ion a_{16}

L'étude de la fragmentation des autres variants est résumée sur la *Figure V.14*. Les graphes représentant l'abondance des ions produits (PIA) des quatre variants obtenus en EDD et en a-EPD.

Ces graphes nous montrent que l'abondance des ions produits (PIA) obtenue en a-EPD est nettement différente de celle obtenue en EDD. En a-EPD, la fragmentation menant aux ions *a*, *x* et *z*, à lieu tout le long de la séquence peptidique tandis qu'en EDD, ces fragments sont principalement rassemblés au centre du peptide. En effet, en a-EPD, la formation du radical par irradiation UV est suivie d'une étape supplémentaire d'activation collisionnelle qui favorise la migration radicalaire due au temps d'activation de la CID (30 ms). En EDD, la relaxation par détachement d'électron successive à l'excitation électronique par collision avec un faisceau d'électrons est rapide. La probabilité de réarrangement radicalaire est alors plus faible qu'en a-EPD.

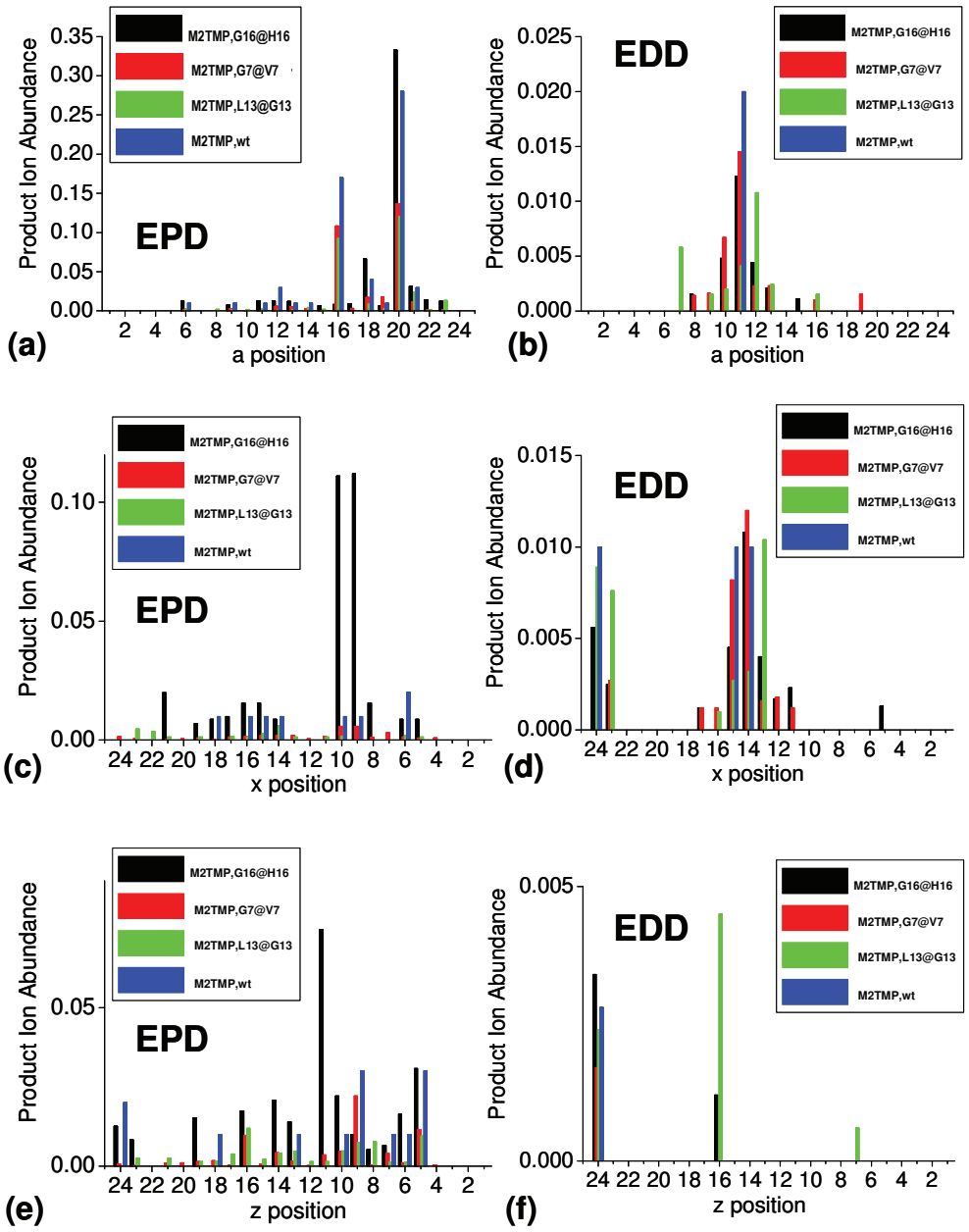


Figure V.14 Abondance des ions produits (PIA) obtenus en EDD et en a-EPD pour les variants du M2TMP. A gauche : PIA des ions a, x et z obtenus par a-EPD. A droite : PIA des ions a, x et z générés par EDD.

En a-EPD, le spectre du variant G16@H16 diffère de ceux des autres variants, où la fragmentation est particulièrement intense proche de ce résidu (x_9 et x_{10}). Cette observation illustre le fait que l'incorporation d'une glycine dans la séquence peptidique provoque un changement de conformation, modifiant ainsi la fragmentation peptidique en a-EPD. En effet, la glycine est connue pour être un acide aminé flexible qui serait à l'origine d'une

modification de la structure tertiaire par repliement du peptide au niveau de cet acide aminé [13]. Il est donc probable que les charges négatives localisées sur les groupements acides solvatent le groupement amide du squelette peptidique au voisinage de la glycine favorisant ainsi l'obtention de ces fragments. De plus, les fragments les plus intenses x_9, x_{10} et z_{11} sont issus de ruptures peptidiques au voisinage de la lysine, qui est reconnue pour apporter de la stabilité aux radicaux.

Quel que soit le variant étudié, le fragment a_{20} est toujours largement observé en a-EPD, ce qui confirme le rôle clé du tryptophane. De la même manière, le fragment a_{16} est observé sur tous les variants comportant un résidu histidine en seizième position. Lorsque cet acide aminé est remplacé par une glycine, ce qui est le cas pour le variant M2 TMP G16@H16, le fragment a_{16} n'est observé qu'avec une très faible intensité. L'histidine joue donc également un rôle prépondérant dans la stabilisation radicalaire et donc pour l'obtention de ce fragment.

En EDD, la relaxation par détachement d'électron est rapide et de ce fait, la distribution des fragments est beaucoup moins étendue qu'en a-EPD. La fragmentation EDD est particulièrement efficace vers le centre du peptide entre les résidus Ile_{11} et Ile_{12} avec les ions a_{11} et x_{14} majoritairement observés. Ces ions sont également issus d'une rupture de la chaine peptidique au voisinage de la Gly_{13}. Encore une fois nous pouvons penser que les charges négatives localisées sur les groupements N-terminal et C-terminal solvatent le groupement amide du squelette à proximité de ce résidu qui induit un coude dans la structure du M2TMP [13, 14]. En effet, la formation d'un radical sur cet azote diminuerait la barrière énergétique requise pour dissocier les liaisons voisines, ce qui justifierait l'observation de ces fragments.

V.2.3.3. CONCLUSION

En a-EPD, l'obtention des deux fragments principaux a_{16} et a_{20} illustre le fait que le radical migre non seulement vers le groupement indole du tryptophane mais également vers le groupement imidazole de l'histidine. L'observation des fragments z et c indique que l'excitation à 260 nm ne mène pas seulement au détachement d'électron à partir des charges négatives mais également à la photoionisation de la chaine latérale du tryptophane. La voie de désexcitation semble dépendre de la conformation du peptide. Ces expériences montrent également le rôle important de la glycine dans la conformation du peptide, en plus de la stabilisation radicalaire apportée par le tryptophane, l'histidine et la leucine.

V.3. CONCLUSION GENERALE

Ces méthodes impliquent le détachement d'électron et donc l'oxydation d'un polyanion. En EDD, l'excès d'énergie de l'espèce radicalaire formée par irradiation d'électrons est suffisant pour que la molécule se fragmente spontanément. En a-EPD, le radical obtenu par irradiation UV ne possède qu'un faible excès d'énergie et la fragmentation requière une étape supplémentaire d'activation collisionnelle. Les fragments obtenus sont principalement de type *a* et *x* mais des séries d'ions *c* et *z* sont également observées. Bien que ces deux méthodes impliquent la formation d'un intermédiaire radicalaire, la distribution des ions produits sur le spectre de fragmentation n'est pas le même selon la technique utilisée. En EDD, la fragmentation se fait principalement à proximité des charges négatives tandis qu'en a-EPD, les principaux fragments observés sont ceux au voisinage des résidus tryptophane, tyrosine ou histidine. Cette différence est due aux cinétiques des réactions d'EDD et d'a-EPD. Des expériences de dissociation par détachement d'électron par double résonnance ont été réalisées dans le but de sonder les temps de vie des fragments intermédiaires [15-17]. Ces études sont en faveur d'une migration radicalaire lors de l'étape d'activation collisionnelle en a-EPD. Ainsi, l'a-EPD permet de fragmenter le peptide tout au long de sa séquence peptidique, en particulier à proximité des acides aminés connus pour stabiliser le radical, et d'obtenir une meilleure couverture de séquence qu'en EDD. En EDD, le bombardement d'électron énergétique de l'ion précurseur mène à une dissociation rapide, diminuant ainsi le temps pour le réarrangement radicalaire. Ces résultats montrent également que la fragmentation dépend de la localisation initiale de la charge et du radical formé.

Les expériences d'a-EPD réalisées sur des protéines ont montré l'efficacité de la fragmentation mais malheureusement, la résolution du piège ionique LTQ est insuffisante pour que l'attribution des fragments se fasse sans ambigüité. Cependant, nous avons pu trouver une application directe à l'a-EPD en analysant des polymères, dont la principale difficulté est de déterminer les groupements terminaux. L'a-EPD s'est révélée être une technique particulièrement efficace pour la caractérisation des polymères, comme illustré dans l'annexe 1.

V.4. BIBLIOGRAPHIE

1. Budnik, B., K. Haselmann, and R. Zubarev, *Electron detachment dissociation of peptide di-anions: an electron-hole recombination phenomenon.* Chem. Phys. Lett., 2001. **342**: p. 299-302.
2. Misharin, A.S., et al., *Dissociation of peptide ions by fast atom bombardment in a quadrupole ion trap.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005. **19**(15): p. 2163-2171.
3. Antoine, R., et al., *Photo-induced formation of radical anion peptides. Electron photodetachment dissociation experiments.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007. **21**(2): p. 265-268.
4. Larraillet, V., et al., *Activated-Electron Photodetachment Dissociation for the Structural Characterization of Protein Polyanions.* Analytical Chemistry, 2009. **81**(20): p. 8410-8416.
5. Bowen, M.S., M. Becucci, and R.E. Continetti, *Dissociative photodetachment dynamics of solvated iodine cluster anions.* Journal of Physical Chemistry A, 2005. **109**(51): p. 11781-11792.
6. Ko, B.J. and J.S. Brodbelt, *193 nm Ultraviolet Photodissociation of Deprotonated Sialylated Oligosaccharides.* Analytical Chemistry, 2011. **83**(21): p. 8192-8200.
7. Antoine, R., et al., *Electron photodetachment of trapped doubly deprotonated angiotensin peptides. UV spectroscopy and radical recombination.* European Physical Journal D, 2009. **51**(1): p. 117-124.
8. Joly, L., et al., *Optical and Structural Properties of Copper-Oxytocin Dications in the Gas Phase.* Journal of Physical Chemistry B, 2009. **113**(32): p. 11293-11300.
9. Joly, L., et al., *Optical Properties of Isolated Hormone Oxytocin Dianions: Ionization, Reduction, and Copper Complexation Effects.* Journal of Physical Chemistry A, 2009. **113**(24): p. 6607-6611.
10. Bowie, J.H., C.S. Brinkworth, and S. Dua, *Collision-induced fragmentations of the (M-H)(-) parent anions of underivatized peptides: An aid to structure determination and some unusual negative ion cleavages.* Mass Spectrometry Reviews, 2002. **21**(2): p. 87-107.
11. Joly, L., et al., *Formation and spectroscopy of a tryptophan radical containing peptide in the gas phase.* Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(42): p. 13832-13833.
12. Ganisl, B., et al., *Electron Detachment Dissociation for Top-Down Mass Spectrometry of Acidic Proteins.* Chemistry-a European Journal. **17**(16): p. 4460-4469.

13. Yi, M., T.A. Cross, and H.X. Zhou, *Conformational heterogeneity of the M2 proton channel and a structural model for channel activation.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009. **106**: p. 13311.

14. Witter, R., et al., *Solid-state 19F NMR spectroscopy reveals that trp41 participates in the gating mechanism of the M2 proton channel of influenza 1 Virus.* J. Am. Chem. Soc, 2008. **130**: p. 918.

15. Xu, Y., et al., *Investigation of double-stranded DNA/drug interaction by ESI/FT ICR: orientation of dissociations relates to stabilizing salt bridges.* Journal of Mass Spectrometry, 2008. **43**(11): p. 1531-1544.

16. Lin, C., P.B. O'Connor, and J.J. Cournoyer, *Use of a double resonance electron capture dissociation experiment to probe fragment intermediate lifetimes.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2006. **17**(11): p. 1605-1615.

17. Pérot-Taillandier, M., Zirah S., Enjalbert, Q., Antoine R., Lemoine J., Dugourd P., Rebuffat, S., Tabet J.C. Afonso, C., *Prompt and activated electron detachment dissociation/photodissociation of 21-mer peptide.* Submitted, 2012.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le couplage entre un piège linéaire et un laser balayable en longueur d'onde a permis d'aller au-delà des peptides (jusqu'alors explorés) et de centrer nos activités sur les protéines. Mon travail de thèse a donc porté principalement sur le photodétachement d'électrons de polyanions de protéines. Ce mémoire de thèse a montré les aspects fondamentaux et analytiques qui pouvaient être obtenus avec cette sonde pertinente qu'est le photodétachement d'électrons pour une caractérisation structurelle des protéines.

Le couplage, entre un spectromètre de masse de type piège linéaire et différentes sources de lumières, peut être utilisé pour réaliser des expériences de spectroscopie d'action par photodétachement d'électron. L. Joly avait démontré l'efficacité de cette technique pour sonder les propriétés optiques de protéines entières dans l'UV. L'un des objectifs de cette thèse était d'élargir la gamme de longueur d'onde au visible et au VUV.

Une partie importante de ce travail et qui a représenté une forte contribution personnelle a été consacré à l'étude métalloprotéine contenant un groupe prosthétique porphyrine (hème), chromophore naturel dans le visible. Nous avons ainsi pu sonder l'influence de l'environnement protéique sur les propriétés optiques de ce chromophore, en étudiant le chromisme de la bande de Soret. Les résultats obtenus dans ce domaine de longueur d'onde montrent ainsi l'adaptabilité et l'efficacité de l'utilisation de la spectroscopie visible par photodétachement d'électron en phase gazeuse sur des métalloprotéines. Des expériences de spectroscopie optique couplée à la mobilité ionique pourraient constituer une belle ouverture pour mieux « caractériser » l'influence de l'état de charge sur les propriétés électroniques et structurelles de ces différents conformères.

Le rayonnement synchrotron nous a permis d'accéder à la gamme du VUV. Les expériences de spectroscopie d'action par photodétachement d'électron dans le VUV ont permis de fournir de véritables « références » aux théoriciens, sur l'absorption de protéines anioniques et d'espèces radicalaires, encore inexistants à l'heure actuelle dans cette gamme de longueur d'onde. Ces expériences ont pu également en avant l'extrême « fragilité » (taux de photofragmentation décuplé) des peptides radicalaires dans le VUV. Le couplage entre la

spectrométrie de masse et le rayonnement synchrotron a également permis d'observer pour la première fois sur une protéine anionique, un double détachement issus d'un processus direct. Ce résultat ouvre des perspectives intéressantes sur la création d'électrons de valence corrélés suite à l'irradiation de photons à partir de ~12 eV sur des protéines multi-déprotonées.

La spectroscopie de photoélectron (M. Kappes, Karlsruhe) avait permis de s'intéresser au mécanisme de détachement d'électron sur des polypeptides, en accédant à l'énergétique mise en jeu ainsi qu'au mode d'émission des électrons. Pour étendre cette approche aux protéines, des expériences de spectroscopie de photoélectron couplées à la mobilité ionique ont été réalisées, permettant ainsi d'étudier la stabilité et les changements de conformation d'un système fortement chargé, la protéine cytochrome c. Les résultats obtenus en phase gazeuse permettent d'obtenir une mesure directement liée à la minimisation de l'énergie et peuvent ainsi servir de point de repère pour des études de stabilité et de répartition de charges sur les protéines.

Le couplage entre la spectrométrie de masse et des lasers permet également de réaliser des expériences de dissociation par détachement d'électron. Des études préliminaires avaient montré sur des peptides et des petites protéines, que la fragmentation d'espèces radicalaires était spécifique et souvent plus informative que la CID. Un des objectifs de ma thèse était d'élargir cette technique de fragmentation aux protéines entières de grandes tailles, pour caractériser leur séquence en acide aminé par une approche top-down. Cependant, avec le spectromètre utilisé, seule une approche « mid-down » est possible où des polypeptides ou petites protéines de 5 à 10 kDa peuvent être «caractérisés » par dissociation par photodétachement d'électrons (a-EPD). La résolution du LTQ étant insuffisante, il n'a pas été possible d'attribuer les fragments sans ambigüité pour des protéines ayant des poids moléculaires supérieurs à 15 kDa. L'utilisation d'un spectromètre de masse offrant une meilleure résolution et la possibilité d'obtenir la masse exacte des composés permettraient d'étendre l'a-EPD à des approches « top-down ». En collaboration avec Jérôme Lemoine, nous avons récemment acquis un spectromètre de masse de type orbitrap, e.g. Q Exactive (Thermo), réunissant toutes ces qualités. Et l'injection d'un laser au sein du piège ionique est en cours d'implémentation pour rendre possible l'analyse top-down de protéines en a-EPD.

En parallèle de cette approche « mid-down » sur peptides et petites protéines (peu explorée durant ma thèse), nous nous sommes attachés à mieux comprendre les mécanismes de

fragmentation par a-EPD, en comparant cette technique à l'EDD. La fragmentation a-EPD dépend de la localisation initiale de la charge et du radical formé. Cette technique émergente offre une complémentarité à l'EDD et cette étude comparative a permis de mieux comprendre la réactivité des peptides radicalaires et notamment l'influence de la localisation et de la valeur initiale de l'énergie dans les fragmentations ExD sur polyanions.

Finalement, nous avons surtout élargi le champ d'application de l'a-EPD en analysant des polymères, dont la principale difficulté est de déterminer la nature des groupements terminaux. L'a-EPD s'est révélé être une technique particulièrement efficace pour caractériser ce type de composé.

Pour finir, ce couplage entre un piège linéaire et un laser balayable, du fait de sa très grande facilité d'utilisation, a permis d'ouvrir la spectroscopie d'action UV-Visible à de nombreuses collaborations durant ce travail de thèse. Je me suis particulièrement investie, lors du séjour professeur invité de Richard O'Hair (Université de Melbourne, Australie), a exploré la formation en phase gazeuse et la spectroscopie d'action de petites molécules organométalliques. Enfin, nous avons également montré l'efficacité de ce couplage pour l'étude de petites nanoparticules à base de gadolinium (de poids moléculaires ~10 kDa) en collaboration avec Olivier Tillement (LPCML).

ANNEXE A

Efficient Structural Characterization of Poly (Methacrylic Acid) by Activated-Electron Photodetachment Dissociation

Marion Girod [1,2] Claire Brunet [1,2,3] Rodolphe Antoine [1,2], Jérôme Lemoine [1,3], Philippe Dugourd[1,2], and Laurence Charles[4]

[1] Université de Lyon, 69622 Villeurbanne cedex, France

[2] CNRS and Université Lyon I, Laboratoire de Spectrométrie Ionique et Moléculaire, UMR 5579, 43 Bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France

[3] CNRS and Université Lyon I, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5380, 43 Bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France

[4] Laboratoire Chimie Provence, Spectrométries Appliquées à la Chimie Structurale, Aix-Marseille University – CNRS, UMR 6264, 13397 Marseille Cedex 20, France

© American Society for Mass Spectrometry, 2011

J. Am. Soc. Mass Spectrom. (2012) 23:7–11
DOI: 10.1007/s13361-011-0279-5

SHORT COMMUNICATION

Efficient Structural Characterization of Poly (Methacrylic Acid) by Activated-Electron Photodetachment Dissociation

Marion Girod,[1,2] Claire Brunet,[1,2,3] Rodolphe Antoine,[1,2] Jérôme Lemoine,[1,3] Philippe Dugourd,[1,2] Laurence Charles[4]

[1]Université de Lyon, 69622 Villeurbanne cedex, France
[2]CNRS and Université Lyon I, Laboratoire de Spectrométrie Ionique et Moléculaire, UMR 5579, 43 Bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France
[3]CNRS and Université Lyon I, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5380, 43 Bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France
[4]Laboratoire Chimie Provence, Spectrométries Appliquées à la Chimie Structurale, Aix-Marseille University – CNRS, UMR 6264, 13397 Marseille Cedex 20, France

Abstract

Characterization of end-groups in poly(methacrylic acid) (PMAA) was achieved using tandem mass spectrometry after activated-electron photodetachment dissociation (activated-EPD). In this technique, multiply deprotonated PMAA oligomers produced in the negative-ion mode of electrospray ionization were oxidized into radical anions upon electron photodetachment using a 220 nm laser wavelength, and further activated by collision. In contrast to conventional collision induced dissociation of negatively charged PMAA, which mainly consists of multiple dehydration steps, fragmentation of odd-electron species is shown to proceed via a radical-induced decarboxylation, followed by reactions involving backbone bond cleavages, giving rise to product ions containing one or the other oligomer termination. A single radical-induced mechanism accounts for the four main fragment series observed in MS/MS. The relative position of the radical and of the anionic center in distonic precursor ions determines the nature of the reaction products. Experiments performed using PMAA sodium salts allowed us to account for relative abundances of product ions in series obtained from PMAA, revealing that ion stability is ensured by hydrogen bonds within pairs of MAA units.

Key words: Synthetic polymer, End-group analysis, PMAA, MS/MS, Dissociation pathways, Electron photodetachment

Introduction

Polymer end-group analysis by mass spectrometry requires intact ionic adducts generated by soft ionization methods to be submitted to dissociation experiments, especially in case of unknown terminations. In most cases, major dissociation reactions of polymeric adducts involve backbone cleavages yielding product ions containing either the initiating or the terminating group. MS/MS data of polymer adducts, most commonly obtained in collision induced dissociation (CID) conditions, should then be analyzed with regards to fragmentation rules established for the targeted polymer family [1]. In some cases, however, collision activation of polymer adducts fails at providing

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s13361-011-0279-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Correspondence to: Laurence Charles; *e-mail:* laurence.charles@univ-provence.fr

Received: 29 June 2011
Revised: 4 October 2011
Accepted: 12 October 2011
Published online: 3 November 2011

useful structural information, as observed for poly(methacrylic acid) (PMAA). Performing electrospray ionization (ESI) either in the negative-ion mode to generate deprotonated molecules [2] or in the positive-ion mode to form alkali adducts [3], we found that CID of PMAA mainly consists of successive eliminations of water between two acidic pendant groups, the so-formed product ions still containing both terminations.

To address challenging cases as encountered for PMAA, the use of alternative ion excitation methods, involving the formation of odd-electron species from multiply charged molecules generated by ESI, might be valuable. Indeed, techniques such as electron transfer dissociation (ETD) [4, 5], electron capture dissociation (ECD) [6], or electron detachment dissociation (EDD) [7] are increasingly applied for biopolymers because they were found to promote cleavage of different bonds as compared to CID. Amongst the few studies reported in the field of synthetic polymers, ECD was found to be particularly useful in the case of poly (ethylene oxide)/poly(propylene oxide) copolymers because it minimized the formation of product ions via rearrangement reactions that often occur in CID and might be misleading for copolymer sequencing [8].

A new method, namely activated-electron photodetachment dissociation (activated-EPD), was recently developed for the gas-phase dissociation of peptide, DNA, and polysaccharide polyanions [9–11]. In this method, radical anions are obtained by electron photodetachment from a multiply deprotonated species. The presence of numerous carboxylic acid groups in PMAA allows both multiply charged oligomers to be easily produced in the negative-ion mode electrospray ionization and absorption capabilities in the 200–250 nm region [12], thus fulfilling conditions to observe efficient electron photodetachment.

Experimental

Chemicals

Poly(methacrylic acid) sodium salt with M_n=1270 gmol^{-1} and H atom as both end-groups (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) was dissolved in Milli-Q water (18.2 MΩ.cm), desalted with Amberlite mixed bed resin (Carl Roth, Lauterbourg, France), further diluted using Milli-Q water to a final 10 mg mL^{-1} concentration, and introduced in the ionization source at a 5 µL min^{-1} flow rate using a syringe pump. In the case of PMAA sodium salt, the sample was directly diluted to a final 10 mg mL^{-1} concentration without prior desalting.

Mass Spectrometry

The experimental setup has been described in details elsewhere [10] and is only briefly presented here. The mass spectrometer is a quadrupole linear ion trap (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA), with a quartz window fitted on the rear of the MS chamber to allow the introduction of the beam from a VIS/UV tunable laser OPO (Optical Parametric Oscillator). The laser is a nanosecond frequency-doubled tunable Panther EX OPO laser pumped by a Surelite II Nd:YAG laser (both from Continuum, Santa Clara, CA, USA). All EPD experiments were performed at λ=220 nm (output laser power: 4 mW, repetition rate: 10 Hz). The laser beam passes through two diaphragms (2 mm diameter), lenses and a mechanical shutter electronically synchronized with the mass spectrometer, after which it is injected on the axis of the linear trap. Laser irradiation was performed during 5 s. Collisional activation was performed with the same apparatus, at a normalized collision energy of 15%–50% for 30 ms and using helium gas. The activation *q* value was set to 0.25 for both CID and activated-EPD experiments. An *m/z* window of 5 Th was applied for ion precursor isolation for both methods.

Results and Discussion

Both singly and doubly deprotonated PMAA oligomers could be generated in the negative-ion mode ESI. When subjected to laser irradiation (50 laser shots) at 220 nm, doubly charged PMAA oligomers undergo charge reduction followed by elimination of CO_2. As exemplified for the case of $[M_{13} - 2H]^{2-}$ at *m/z* 559.4 in Figure S1, the oxidation product $[M_n - 2H]^{-\bullet}$ expected at *m/z* 1118.8 was hardly observed in EPD spectra and would instead readily decarboxylate to a radical quaternary carbon in the so-formed *m/z* 1074.3 ion. Activated-EPD experiments would thus consist of activating $[M - 2H - CO_2]^{-\bullet}$ via collisions.

As reference data, CID of $[M_{13} - H]^-$ at *m/z* 1119.4 is presented in Figure S2 and indicates that up to six successive dehydration steps have occurred, consistently with dissociation rules established for PMAA in the negative-ion mode [2]. In contrast to these poorly informative data, activated-EPD of doubly charged PMAA oligomers generates multiple abundant ions (Figure 1). Five product ion series (Table 1), in which consecutive ions are spaced by 86 Da, could be accounted for by considering different forms of the $[M_{13} - 2H - CO_2]^{-\bullet}$ precursor ion, based on relative positions of the radical carbon and the remaining deprotonated acidic group.

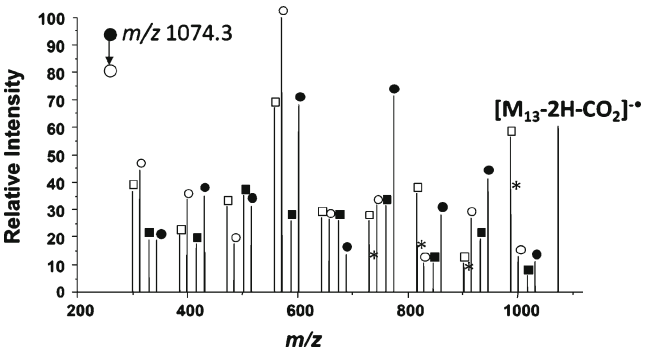
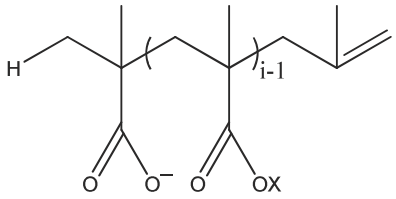
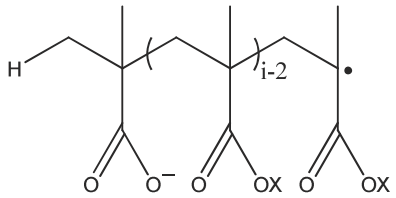
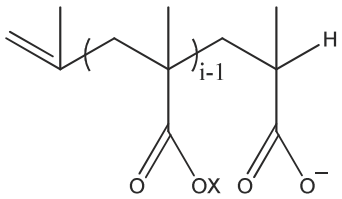
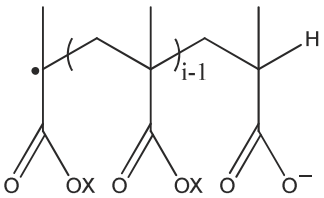
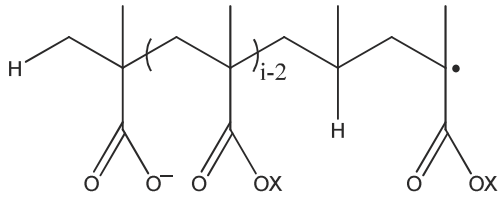


Figure 1. Activated-electron photodetachment dissociation spectrum of the $[M_{13} - 2H - CO_2]^{-\bullet}$ ion (*m/z* 1074.3) under a normalized CID collision energy of 25% for 30 ms, showing the formation of a_i^- (open circles), $b_i^{-\bullet}$ (filled circles), y_i^- (open squares), $z_i^{-\bullet}$ (filled squares), and $(b_i^{-\bullet})'$ (stars) product ions.

Table 1. Structure, Nomenclature and *m/z* Ratio of Product Ions Detected in MS/MS Upon Activated-EPD of PMAA (X=H) and Sodiated PMAA (X=Na). *In Figures 1 and 2

Label* / Nomenclature / Structure	Product ions
○ $\mathbf{a_i^-}$ 	- X = H in M_{13}, i = 3-11: *m/z* 313, 399, 485, 571, 657, 743, 829, 915, 1001 - X = Na in M'_{11}, i = 7-9: *m/z* 789, 897, 1005
● $\mathbf{b_i^{-\bullet}}$ 	- X = H in M_{13}, i = 4-12: *m/z* 344, 430, 516, 602, 688, 774, 860, 946, 1032 - X = Na in M'_{11}, i = 6-10: *m/z* 626, 734, 842, 950, 1058
□ $\mathbf{y_i^-}$ 	- X = H in M_{13}, i = 3-11: *m/z* 299, 385, 471, 557, 643, 729, 815, 901, 987 - X = Na in M'_{11}, i = 5-9: *m/z* 559, 667, 775, 883, 991
■ $\mathbf{z_i^{-\bullet}}$ 	- X = H in M_{13}, i = 3-11: *m/z* 330, 416, 502, 588, 674, 760, 846, 932, 1018 - X = Na in M'_{11}, i = 5-9: *m/z* 612, 720, 828, 936, 1044
✻ $\mathbf{(b_i^{-\bullet})'}$ 	- X = H in M_{13}, i = 8-11: *m/z* 730, 816, 902, 988 - X = Na in M'_{11}, i = 5-9: *m/z* 560, 668, 776, 884, 992

Two product ion series would arise from dissociation of those precursor ions with a radical carbon located between the deprotonated MAA unit and the ω end-group. When radical-induced C–C bond homolysis occurs in the right-hand part of the polymeric backbone (Scheme S1), a neutral containing the ω end-group would be formed together with a distonic radical anion containing the α initiating group (annotated with filled circles in Figure 1). According to Wesdemiotis et al.'s nomenclature [1], these product ions should be called $b_i^{-\bullet}$, with i the number of complete (neutral

or deprotonated) monomers they contain. This ion series includes all congeners from $b_4^{-\bullet}$ to $b_{12}^{-\bullet}$, which could either be formed directly from the *m/z* 1074.3 ion with different locations for the radical carbon, or according to a radical-induced depolymerization process of higher $b_i^{-\bullet}$ homologues (Scheme S1). Alternatively, the same mechanism could induce the homolysis of a C–C bond in the left-hand part of the polymeric skeleton (Scheme S1), generating a_i^- product ions, with *i*=3–11 and annotated by open circles in Figure 1, upon the release of radical species containing the ω end-group.

Similarly, the same radical-induced mechanism could account for two other product ion series, namely y_i^- and $z_i^{-\bullet}$, starting from *m/z* 1074.3 precursors where the radical carbon is located between the deprotonated MAA unit and the α end-group. When the cleaved C–C bond is at the left of the radical center, the y_i^- ion series would be formed, as observed with *i*=3–11 for peaks annotated by open squares in Figure 1. Alternatively, distonic radical anions $z_i^{-\bullet}$ (with *i*= 3–11 and annotated by filled squares in Figure 1) would arise from cleavage of the C–C bond at the right of the radical center, after elimination of a neutral containing the α end-group. Owing to the location of the radical, these $z_i^{-\bullet}$ ions could further experience a depolymerization process, accounting for all lower homologues in the series.

Finally, the last series of product ions measured at *m/z* 988.1, 902.1, 816.6, and 730.0 (annotated with stars in Figure 1) would be formed after the activated *m/z* 1074.3 ion has released one to four MAA units, respectively. This process would occur after migration of a terminal H to the radical carbon (Scheme S2) and would generate $(b_i^{-\bullet})'$ ions. Different transfers of $H^\bullet$ involving folding of the polymeric chain must be envisaged to allow radical migration to the chain end to initiate the depolymerization process, and such rearrangement might well limit the kinetics of the process, thus accounting for the limited number of congeners within this series (*i*=8–11).

Interestingly, the nature of major ion in all main series (i.e., a_6^-, y_6^-, $b_7^{-\bullet}$ and $z_5^{-\bullet}$) suggests a preferential location of the radical on the central monomer in the *m/z* 1074.3 activated ion. Considering conformation adopted by PMAA chains upon multiple charging [13], we conclude that the polymer chain must be large enough so that neutral monomers can efficiently "solvate" the first deprotonated MAA unit in order to stabilize the increase in Coulomb repulsions arising from inclusion of an additional charge. At least five MAA units should be involved in both the coordination sphere of one negative charge and the linking domain that spares the next "solvated" deprotonated monomer. As a result, the central monomer of the chain would reside in the linking domain but, as the studied PMAA oligomers are quite small, this central monomer would also be in close proximity of both COO^- groups. Once one carboxylate group has been oxidized upon laser irradiation, it is reasonable to assume that this proximity would allow the radical to migrate to the central unit, via different transfers of $H^\bullet$ from neutral COOH groups to the oxidized $COO^\bullet$ moiety.

It was also observed that distonic radical anion products containing an even number of neutral MAA were systematically more abundant than their adjoining congeners holding an odd number of pendant COOH groups. This effect was assigned to the ability of two consecutive neutral MAA to interact via hydrogen bonding, thus increasing the overall stability of the ion [2]. For example, $b_9^{-\bullet}$ at *m/z* 774.2 contains four MAA pairs in which pendant COOH moieties would be in strong interaction, and is more abundant than both $b_8^{-\bullet}$ at *m/z* 688.1 and $b_{10}^{-\bullet}$ at *m/z* 860.4, in which there is a lone neutral MAA monomer. Furthermore, $b_9^{-\bullet}$ would more readily eliminate a neutral consisting of two hydrogen-bonded MAA monomers than release a single MAA unit. This would account for the higher abundance measured for $b_7^{-\bullet}$ at *m/z* 602.1 compared with $b_8^{-\bullet}$ (Figure 1). Similar conclusions could be reached for $z_i^{-\bullet}$ product ions. To probe this hydrogen-bond stabilization assumption, the same EPD experiments were conducted on a PMAA sodium salt (further called M').

The mass spectrum obtained after UV excitation of the doubly desodiated 11-mer is shown in the inset of Figure 2. $[M'_{11} - 2Na]^{-\bullet}$ could be isolated for further activation, which mainly led to the formation of $[M'_{11} - 2Na - CO_2]^{-\bullet}$. In contrast to the case of deprotonated PMAA, EPD performed on di-anions of PMAA sodium salt provides an evidence that decarboxylation may be prompted by prior electron loss on the charged carboxylic group, as already observed for peptides [10, 14]. Collisional activation of $[M'_{11} - 2Na - CO_2]^{-\bullet}$ resulted in four main series of product ions spaced by 108 Da (Figure 2). Fragmentation rules previously established for activated EPD of $[M_n - 2H - CO_2]^{-\bullet}$ were found to also apply here, and assignments of product ion series are presented in Table 1. Two additional product ion series were observed but were found to be poorly informative as they were internal fragments (Schemes S3 and S4).

In contrast to MS/MS results obtained for PMAA (Figure 1), only the highest congeners were observed in

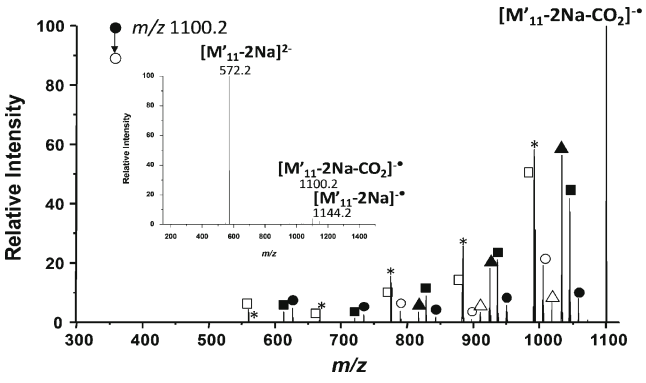


Figure 2. Activated-electron photodetachment dissociation spectrum of the $[M'_{11} - 2Na - CO_2]^{-\bullet}$ ion (*m/z* 1100.2) under a normalized CID collision energy of 20% for 30 ms, showing the formation of a_i^- (open circles), $b_i^{-\bullet}$ (filled circles), y_i^- (open squares), $z_i^{-\bullet}$ (filled squares), and $(b_i^{-\bullet})'$ (stars) product ions. Filled and open triangles designate internal fragments described in supplemental information. Inset: electron photodetachment spectrum of the doubly desodiated PMAA 11-mer (*m/z* 572.2) under 50 laser shots at 220 nm.

each major product-ion series ($a_{7\text{-}9}^{-}$, $b_{6\text{-}10}^{-\bullet}$, $y_{5\text{-}9}^{-}$, and $z_{5\text{-}9}^{-\bullet}$). In particular, $b_i^{-\bullet}$ and $z_i^{-\bullet}$ distonic radical anions do not display any particular stability as a function of the parity of their polymerization degree. This result would be in favor of the hydrogen bond assumption proposed to stabilize some product ions of $[M_n - 2H - CO_2]^{-\bullet}$. Moreover, no base peak indicating a preferential location of the radical on a central monomer in $[M'_{11} - 2Na - CO_2]^{-\bullet}$ was observed: migration of $Na^{\cdot}$ required to allow such a structure for the *m/z* 1100.2 precursor ion is indeed hard to envisage.

In summary, in contrast to CID of even-electron PMAA ionic species that are poorly informative, all dissociation processes observed upon activated-EPD of PMAA involve homolytic bond cleavages of the oligomer backbone, allowing a clear characterization of each end-group. While the mass of the α group can be obtained from the analysis of both a_i^{-} and $b_i^{-\bullet}$ product ions, the mass of the terminating ω moiety can be determined from *m/z* values measured for both y_i^{-} and $z_i^{-\bullet}$ fragments. An additional advantage of this approach is the production of abundant product ions throughout each series, allowing mass data sets to be obtained for each end-group from unambiguous *m/z* value measurements.

References

1. Wesdemiotis, C., Solak, N., Polce, M.J., Dabney, D.E., Chaicharoen, K., Katzenmeyer, B.C.: Fragmentation Pathways of Polymer Ions. *Mass Spectrom. Rev.* **30**, 523–559 (2011)
2. Giordanengo, R., Viel, S., Allard-Breton, B., Thevand, A., Charles, L.: Tandem Mass Spectrometry of Poly(Methacrylic Acid) Oligomers Produced by Negative Mode Electrospray Ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **20**, 25–33 (2009)
3. Giordanengo, R., Viel, S., Allard-Breton, B., Thevand, A., Charles, L.: Positive Mode Electrospray Tandem Mass Spectrometry of Poly (Methacrylic Acid) Oligomers. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **23**, 1557–1562 (2009)
4. Syka, J.E.P., Coon, J.J., Schroeder, M.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F.: Peptide and Protein Sequence Analysis by Electron Transfer Dissociation Mass Spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 9528–9533 (2004)
5. Pitteri, S.J., Chrisman, P.A., McLuckey, S.A.: Electron-Transfer Ion/Ion Reactions of Doubly Protonated Peptides: Effect of Elevated Bath Gas Temperature. *Anal. Chem.* **77**, 5662–5669 (2005)
6. Zubarev, R.A.: Reactions of Polypeptide Ions with Electrons in the Gas Phase. *Mass Spectrom. Rev.* **22**(1), 57–77 (2003)
7. Budnik, B.A., Haselmann, K.F., Zubarev, R.A.: Electron Detachment Dissociation of Peptide Dianions: An Electron-Hole Recombination Phenomenon. *Chem. Phys. Lett.* **342**, 299–302 (2001)
8. Cerda, B.A., Horn, D.M., Breuker, K., McLafferty, F.W.: Sequencing of Specific Copolymer Oligomers by Electron-Capture-Dissociation Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 9287–9291 (2002)
9. Gabelica, V., Tabarin, T., Antoine, R., Rosu, F., Compagnon, I., Broyer, M., De Pauw, E., Dugourd, P.: Electron Photodetachment Dissociation of DNA Polyanions in a Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* **78**, 6564–6572 (2006)
10. Larraillet, V., Antoine, R., Dugourd, P., Lemoine, J.: Activated-Electron Photodetachment Dissociation for the Structural Characterization of Protein Polyanions. *Anal. Chem.* **81**, 8410–8416 (2009)
11. Racaud, A., Antoine, R., Dugourd, P., Lemoine, J.: Photoinduced Dissociation of Heparin-Derived Oligosaccharides Controlled by Charge Location. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **21**, 2077–2084 (2010)
12. Szyper, M., Zuman, P.: Electronic Absorption of Carboxylic-Acids and Their Anions. *Anal. Chim. Acta* **85**, 357–373 (1976)
13. Trimpin, S., Plasencia, M., Isailovic, D., Clemmer, D.E.: Resolving Oligomers from Fully Grown Polymers with IMS-MS. *Anal. Chem.* **79**, 7965–7974 (2007)
14. Antoine, R., Joly, L., Tabarin, T., Broyer, M., Dugourd, P., Lemoine, J.: Photo-Induced Formation of Radical Anion Peptides. Electron Photodetachment Dissociation Experiments. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**, 265–268 (2007)