

Table des matières

1	Introduction	1
2	Contexte	7
2.1	Systèmes moléculaires d'intérêt biologique	8
2.1.1	Acides nucléiques	8
2.1.2	Acides aminés, peptides et protéines	9
2.1.3	Interactions non-covalentes	12
2.2	Techniques expérimentales de contrôle de molécules en phase gazeuse	14
2.2.1	Mise en phase gazeuse de molécules	14
2.2.1.1	Source à électronébulisation	15
2.2.1.2	Désorption laser assistée par matrice	16
2.2.1.3	Désorption laser de micro-gouttelettes	17
2.2.2	Sélection et transport d'ions	18
2.2.2.1	Funnel	18
2.2.2.2	Multipôles	19
2.2.3	Piégeage	20
2.2.3.1	Piège de Paul tridimensionnel	20
2.2.3.2	Piège linéaire	21
2.3	Techniques de caractérisation et d'analyse des propriétés physico-chimiques de biomolécules	22
2.3.1	Spectrométrie de masse	23
2.3.1.1	Spectromètre de masse à résonance cyclotronique ionique	23
2.3.1.2	Spectromètre de masse à temps de vol	24
2.3.2	Spectrométrie de mobilité ionique	27
2.3.3	Collisions sur gaz neutre	28
2.3.4	Collisions sur une surface	29
2.3.5	Collisions hors résonance	30
2.3.6	Ionisation par impact d'électron	31
2.3.7	Dissociation par capture d'électron	31

2.3.8	Dissociation par transfert d'électron	32
2.3.9	Irradiation par faisceaux de photons	33
2.3.9.1	Infra rouges	33
2.3.9.2	Ultraviolet	34
2.3.9.3	Vacuum Ultraviolet	35
2.3.9.4	Rayons-X	37
2.3.10	Irradiation par faisceaux d'ions atomiques	40
2.4	Le collagène, de la cellule à la phase gazeuse	43
2.4.1	La protéine de collagène	43
2.4.2	Peptide de collagène et peptide modèle de triple hélice	44
3	Caractérisation de la structure de peptides modèles du collagène par spectrométrie de mobilité ionique	47
3.1	Description du dispositif expérimental	48
3.2	Espèces produites par la source ESI	49
3.3	Mobilité ionique et mesures de section efficace de collisions	50
3.4	Activation par collision sur du gaz	53
3.5	Conclusion	58
4	Irradiation d'un modèle de la triple hélice du collagène	59
4.1	Dispositif expérimental et lignes de faisceaux	60
4.1.1	Grand Accélérateur National d'Ions Lourds	60
4.1.2	Synchrotron BESSY II	61
4.1.3	Spectromètre de masse Paultje	62
4.2	Étude de peptides modèles de la triple hélice du collagène sous irradiation	64
4.2.1	Peptides isolés	65
4.2.1.1	Photo-absorption VUV et X	66
4.2.1.2	Irradiation par un faisceau d'ions C ⁴⁺	72
4.2.2	Modèles de la triple hélice	74
4.2.2.1	Photo-absorption VUV et RX	74
4.2.2.2	Irradiation par un faisceau d'ions C ⁴⁺	80
4.2.3	Dimères de modèles de la triple hélice	82
4.2.4	Comparaison de l'énergie interne déposée après irradiations par photons X et C ⁴⁺	84
4.3	Conclusion et perspectives	87
5	Développement du dispositif expérimental PIBALE	89
5.1	Présentation du dispositif expérimental	90
5.1.1	Production, sélection et transport des ions moléculaires	92

5.1.2	Piégeage, extraction et détection	93
5.1.2.1	Piégeage et formation d'un paquet d'ion	94
5.1.2.2	Zone d'interaction et caractérisation du paquet d'ions	96
5.1.3	Faisceau d'ions projectiles	97
5.1.4	Spectromètre de masse à temps de vol	98
5.1.5	Cycle d'acquisition	100
5.2	Développement et optimisation d'un groupeur d'ions	101
5.2.1	Principe d'un groupeur d'ions	102
5.2.2	Mise en place des simulations	103
5.2.3	Comparaison des mesures expérimentales et des simulations	105
5.2.4	Influence de la charge d'espace sur l'utilisation du groupeur	108
5.3	Irradiation du peptide Leucine-Enképhaline protoné par un faisceau d'He ⁺ à 7 keV	109
5.3.1	Présentation du système moléculaire	109
5.3.2	Analyse des résultats de l'expérience	110
5.3.3	Mesure et estimation du taux de comptage	113
5.4	Mise en phase gazeuse et irradiation du peptide modèle de collagène	114
5.4.1	Étude des conditions de source sur le faisceau de molécules	115
5.4.2	Irradiation du peptide (PPG) ₁₀ doublement protoné par un faisceau d'ions He ⁺	116
5.4.3	CID des molécules dans le piège de Paul	118
5.5	Conclusion	121
6	Conclusion	123
	Bibliographie	129
A	Liste des fragments du peptide (PPG)₁₀	155
B	Liste des fragments du peptide (PHypG)₁₀	157
C	Distributions des temps d'arrivée des oligomères des peptides (PPG)₁₀ et (PHypG)₁₀	159
D	Spectres de masse des peptides (PPG)₁₀ et (PHypG)₁₀ après irradiation par photons VUV et X et par ions C⁴⁺	161

Introduction

1

L'interaction des rayonnements avec la matière est un domaine de premier plan de la recherche en physique. En plein essor au vingtième siècle, il reste aujourd'hui un sujet d'étude important sur de nombreux aspects, et touche non seulement la recherche fondamentale, mais aussi la recherche plus appliquée [1]. Nous pouvons par exemple citer l'astrophysique, où de nombreuses études s'intéressent aux rayons cosmiques et aux vents solaires, ou la physique des plasmas et de la fusion, afin notamment de déterminer l'effet des émissions de neutrons. Ce domaine est également présent en physique des matériaux, où de nombreux groupes de recherche soumettent des échantillons solides à des rayonnements afin de déterminer d'éventuelles modifications, ou réaliser de l'implémentation atomique. Nous pouvons aussi mentionner que ce domaine joue un rôle important dans la recherche biomédicale, d'un point de vue pratique pour mettre en place des traitements thérapeutiques, mais également d'un point de vue plus fondamental pour comprendre les causes des effets secondaires de ces rayonnements sur la matière biologique.

Ces rayonnements peuvent être des photons ou des particules chargées (électrons et ions), et leurs interactions avec les atomes du milieu se font avec les électrons, ou directement avec les noyaux. Ils sont également distingués par leur caractère ionisant ou non. Par définition un rayonnement ionisant peut arracher un ou plusieurs électrons aux atomes du milieu.

Les photons peuvent avoir plusieurs origines. Les rayons gamma proviennent de transitions nucléaires et possèdent une énergie supérieure à 100 keV, et les rayons-X sont issus de transitions électroniques pour des énergies inférieures à 100 keV, ou du rayonnement de freinage (Bremsstrahlung) d'une particule chargée. Ces photons peuvent interagir avec la matière selon différents processus :

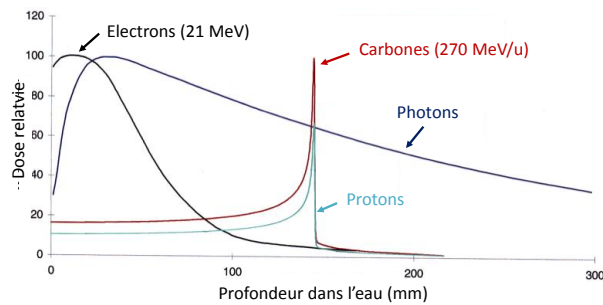
- L'effet photoélectrique désigne l'absorption d'un photon de basse énergie par un électron d'un matériau, qui est alors émis avec une énergie égale à la différence entre l'énergie du photon incident et son énergie de liaison. Les énergies photoélectriques dépendent directement des atomes cibles. Cet effet sera dominant pour des énergies de photon inférieures à 20 keV pour le carbone, 130 keV pour le cuivre et 600 keV pour le plomb.
- L'effet Compton se produit lorsque le photon incident est diffusé par un électron faiblement lié d'un atome. Celui-ci est alors éjecté du cortège électronique, tandis que le photon diffusé perd de l'énergie, sa longueur d'onde augmentant. L'effet Compton se

produit pour des énergies supérieures à l'effet photoélectrique, typiquement entre 0.1 et 10 MeV.

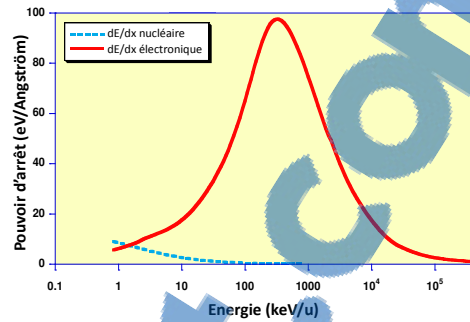
- La création de paires électron/positron se produit pour un photon possédant une haute énergie, supérieure au double de l'énergie de masse au repos d'un électron (1.022 MeV). En passant au voisinage du champ électrique très intense d'un noyau atomique, ce photon peut se matérialiser sous la forme d'un électron et d'un positron. Ce dernier est alors rapidement ralenti, puis s'annihile au contact d'un électron une fois au repos, produisant deux photons de 511 keV chacun et émis à 180° .

Comme ces processus se produisent pour différentes énergies du photon incident, la section efficace σ de collision d'un photon d'une énergie donnée sur un atome est donc la somme des sections efficaces de ces trois processus. Ainsi, lorsqu'un photon traverse une cible mince de densité atomique N et d'épaisseur dx , la probabilité qu'il interagisse est $\sigma \cdot N \cdot dx$. Donc, dans le cas d'une cible épaisse, le nombre de photons n'ayant pas encore interagi à une profondeur x correspond à $\Phi = \Phi_0 \cdot \exp(-\mu \cdot x)$, où Φ_0 est le flux de photons initial et $\mu \text{ (m}^{-1}\text{)} = \sigma \cdot N$ est le coefficient d'atténuation linéique, fonction de la densité électronique du matériau, mais également de l'énergie incidente des photons. Leur atténuation est donc exponentielle lorsque la distance augmente. Un photon qui possède une haute énergie incidente va donc subir des pertes par diffusion Compton jusqu'à ce que son énergie soit suffisamment basse pour qu'il soit absorbé par un électron lors d'un effet photoélectrique.

En traversant la matière, les photons vont déposer de l'énergie et mettre en mouvement des électrons secondaires. Ces derniers vont également déposer de l'énergie tout au long de leur parcours, via des interactions avec les électrons mais aussi avec les noyaux des atomes, jusqu'à finalement s'arrêter. Au niveau macroscopique, on parle alors de dépôt de dose, en $\text{J} \cdot \text{kg}^{-1}$. Nous pouvons également introduire la notion de pouvoir d'arrêt, qui correspond à la perte d'énergie par unité de distance. Par exemple dans l'eau, un électron d'énergie supérieure au MeV perd une quantité d'énergie avoisinant les 2 MeV par centimètre. Les électrons perdent donc leur énergie très rapidement et déposent une dose importante dès le début de leur parcours, comme nous pouvons le voir sur la figure 1.0.1a, qui représente la dose relative déposée par différents faisceaux projectiles en fonction de la profondeur parcourue dans l'eau. Dans le cas des photons, lorsque leur énergie est de l'ordre de 20 MeV, nous pouvons également observer qu'une dose maximale est déposée au début de leur parcours, puis diminue avec la distance parcourue (*cf.* figure 1.0.1a). En effet, en tout point de la matière, des électrons secondaires sont créés et d'autres sont arrêtés. Lorsque le nombre d'électrons créés est égal au nombre d'électrons arrêtés, l'équilibre électronique est atteint et la dose déposée est maximale. Or, nous avons vu que le flux de photons diminue exponentiellement avec la distance. Il en est donc de même pour le flux d'électrons secondaires créés, ce qui se traduit par une diminution de la dose au delà de ce maximum. La profondeur à laquelle l'équilibre électronique est atteint augmente avec l'énergie des photons incidents, car plus ils sont énergétiques, plus le parcours des électrons secondaires est grand. Par exemple, pour des photons de 6 MeV, le parcours des électrons est d'environ 1.5 cm, contre 3.5 cm pour des photons de 25 MeV.



(a)



(b)

Figure 1.0.1 : (a) : Graphique [2] de la dose déposée par différents projectiles en fonction de la profondeur dans l'eau. (b) : Pouvoirs d'arrêt électronique et nucléaire dans l'eau en fonction de l'énergie d'un faisceau d'ions carbonés.

Comme dans le cas des électrons, un ion atomique va céder toute, ou une partie de son énergie incidente par le biais de nombreuses interactions avec les atomes et molécules de la matière. Comme nous pouvons le voir sur la figure 1.0.1b, son pouvoir d'arrêt sera dit électronique lorsque le projectile subira des collisions inélastiques avec les électrons de la cible ($E_{\text{Projectile}} > 10 \text{ keV/u}$), et nucléaire pour des interactions élastiques avec ces atomes ($E_{\text{Projectile}} < 10 \text{ keV/u}$). Le pouvoir d'arrêt total d'un ion sera donc un mélange des contributions des deux processus pour des énergies inférieures à la centaine de keV/u. Pour une énergie cinétique incidente de l'ordre de 100 MeV, le pouvoir d'arrêt d'un projectile chargé est faible, donc la distance parcourue sera grande. Lorsque le projectile perd de l'énergie, le pouvoir d'arrêt augmente selon la formule de Bethe-Bloch, jusqu'à atteindre un maximum autour de quelques centaines de keV/u, puis diminue progressivement. En traversant la matière, les ions vont donc déposer une dose importante à la fin de leur parcours, nommé le pic de Bragg, et dont la position dépend de l'énergie initiale du projectile chargé. De plus, derrière le pic, la dose diminue très fortement car les ions sont très vite arrêtés. La figure 1.0.1a illustre ce dépôt de dose dans le cas de faisceaux de protons et d'ions carbonés.

C'est donc pour ces différentes propriétés que plusieurs domaines de la recherche en physique s'intéressent à l'interaction des rayonnements avec la matière. Une des plus importantes applications concerne le domaine médical pour des traitements thérapeutiques. En effet, chaque année en France, 380 000 nouveaux cas de cancers sont déclarés et plus de 50% d'entre eux sont traités par la radiothérapie dite conventionnelle. Ce type de traitement consiste à déposer la dose directement dans la zone tumorale à l'aide de faisceaux de rayons-X de 25 MeV maximum, qui vont principalement interagir par effet Compton et par création de paires. Pour comparaison, en radiographie, l'énergie maximale des rayons-X utilisés est de 140 keV (effets photo-électrique et Compton). Avec une énergie de 25 MeV, les photons X vont endommager des molécules d'acides nucléiques (ADN et ARN), afin d'empêcher les cellules tumorales de se réparer. La radiothérapie peut remplacer ou être couplée avec les autres types de traitements,

que sont la chirurgie et la chimio-thérapie. Elle permet ainsi de cibler efficacement la tumeur lorsqu'une chirurgie est compliquée à réaliser ou que la chimio-thérapie est inefficace. Cependant, comme nous l'avons vu, le faisceau de photons va interagir avec la matière biologique et faire un dépôt de dose tout au long de son parcours, principalement à son début. C'est donc dans les tissus sains situés sur la trajectoire du faisceau que le dépôt de dose est le plus important. Même si de multiples incidences permettent de limiter ce dépôt de dose indésirable, cet aspect peut s'avérer contraignant pour des tumeurs situées près d'organes à risques.

Ainsi, pour les tumeurs radio- et chimio-résistantes, et celles situées près d'organes vitaux, un nouveau type de traitement peut être utilisé. L'hadronthérapie possède une efficacité balistique supérieure aux méthodes conventionnelles. Elle consiste à remplacer les photons par un faisceau d'ions d'énergie cinétique de l'ordre de la centaine de MeV, principalement des protons mais aussi des carbones, ces derniers possédant une efficacité biologique plus importante. Bien que les protons soient déjà proposés dans certains centres de traitements, les ions carbones ne sont pas encore cliniquement utilisés en France, à cause du manque d'études de leurs effets secondaires. L'intérêt des traitements par irradiation de projectiles chargés s'explique par leur capacité à déposer une dose maximale à la fin de leur parcours : le pic de Bragg.

La figure 1.0.2 de gauche compare de nouveau le dépôt de dose des rayons-X et des ions carbones en fonction de la profondeur dans les tissus. Les distances d_1 et d_2 font référence à la figure de droite et correspondent aux zones parcourues par le faisceau dans le cas particulier de l'irradiation d'une tumeur de cartilage. Les courbes en rouge correspondent à différentes énergies cinétiques incidentes pour les ions carbones. La somme des doses de toutes ces contributions produit alors le pic modulé, présent en bleu sur la figure 1.0.2 de gauche, et permet un dépôt de dose équivalent dans tout le volume tumoral (zone d_1). Ainsi, lors de l'hadronthérapie, en ajustant l'énergie incidente des ions, il est possible de cibler de manière précise la zone à traiter, tout en induisant un dépôt de dose sur leur parcours (zone d_2) beaucoup plus faible que lors de l'utilisation des photons.

Cependant, même si la dose déposée dans les tissus sains situés avant et après la tumeur est réduite en comparaison des rayons-X, il est tout de même nécessaire de s'interroger sur l'impact des traitements sur ces tissus. En effet, l'irradiation peut induire des effets directs sur la trajectoire du faisceau (d_2), mais également des effets indirects pouvant avoir lieu plusieurs millimètres autour de la zone irradiée (d_1), lorsque l'irradiation induit l'émission de petites molécules, qui peuvent elles-mêmes interagir avec d'autres cellules. Nous pouvons par exemple mentionner le cas de l'effet Bystander [4, 5], où ces molécules peuvent agir comme messagers de stress pour les cellules saines voisines.

Cette problématique concerne particulièrement le cartilage articulaire, qui est le type de cartilage le plus répandu du corps humain et peut donc souvent se trouver sur le trajet du faisceau d'ions. Situé à l'extrémité des os, il permet un mouvement sans friction ni choc. Sa capacité à absorber ces chocs est due aux propriétés mécaniques de ce tissu particulier, puisqu'il est composé à 98% de matrice extra-cellulaire et de 2% de cellules, les chondrocytes. La matrice est ainsi particulièrement dense, et majoritairement composée de fibres de collagène,

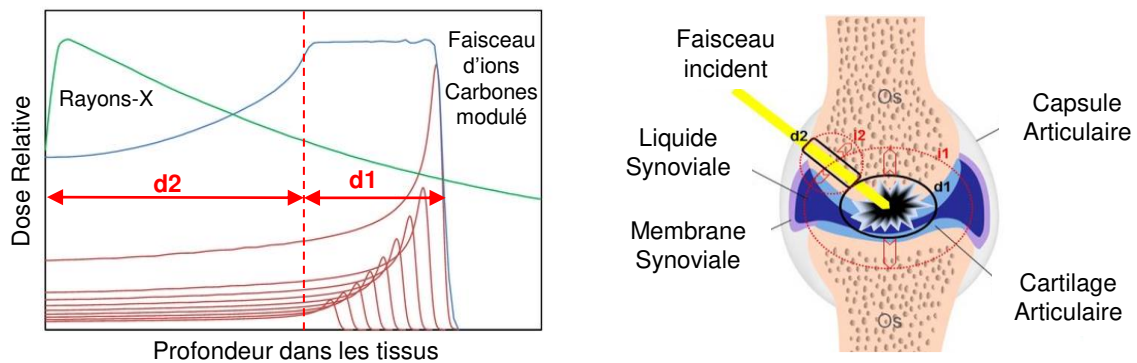


Figure 1.0.2 : A gauche : graphique [3] de la dose relative déposée en fonction de la profondeur dans les tissus par des rayons-X (en vert) et des faisceaux de carbones de différentes énergies (en rouge). La somme de toutes les contributions des ions carbones est présentée en bleu. Les zones d1 et d2 font références aux différentes régions exposées sur la figure de droite, respectivement la zone tumorale et la zone saine, traversées par le faisceau incident. A droite : schéma de l'irradiation d'un chondrosarcome par des rayonnements ionisants (photons ou ions).

la protéine la plus abondante du corps humain, qui représente près de 95% de la composition du cartilage. Ces fibres de collagène sont à l'origine de l'élasticité et de la robustesse du cartilage. Les chondrocytes et la matrice extra-cellulaire ont des activités biologiques liées. Alors que les chondrocytes régulent la matrice extra-cellulaire en produisant ses composants, ces derniers régissent l'activité métabolique du cartilage [6].

Le chondrosarcome est une tumeur propre au cartilage et représente 20% des tumeurs primaires des os chez l'adulte, principalement chez les hommes de plus de 40 ans. Sa faible teneur en oxygène (hypoxie) la rend particulièrement radio- et chimio résistante. L'utilisation de nouvelles techniques, telle que l'hadronthérapie s'avère alors intéressante pour traiter ce type de tumeurs. Mais des effets secondaires, comme le stress cellulaire, peuvent avoir lieu plusieurs millimètres autour de la zone irradiée [4, 5, 7]. Ce stress cellulaire pourrait induire de nouvelles dégradations du cartilage de manière radio-induite par modification du métabolisme cellulaire [8]. C'est par exemple le cas de l'arthrose articulaire, qui est une séquelle connue de la radiothérapie conventionnelle. L'étude des modifications radio-induites de la matrice extra-cellulaire s'avère donc nécessaire pour la compréhension les effets indirects que ces modifications peuvent engendrer sur la survie cellulaire.

C'est dans ce cadre thématique que s'est développé une collaboration interne entre trois équipes du laboratoire. Les radio-biologistes de l'équipe LARIA étudient depuis plusieurs années la radio-biologie du cartilage. Ils s'intéressent notamment aux effets Bystander induits par radio- et hadronthérapie, ainsi qu'à de possibles modifications structurales et à la fragmentation éventuelle de la matrice extracellulaire, afin de caractériser la survie et la mort cellulaire, les séquelles et les effets secondaires de ces irradiations. Les chercheurs de l'équipe MADIR sont quant à eux spécialisés dans la radiochimie et l'étude du comportement de la matière condensée sous rayon-

nements ionisants. Dans le cadre de ce projet, ils se sont intéressés aux facteurs de stress émis suite à l'irradiation et à la réorganisation structurale de polymères de la matrice extracellulaire. Pour finir, dans l'équipe AMA nous étudions l'ionisation et la fragmentation de molécules et d'agrégats en phase gazeuse suite à des transferts de charges et d'énergie après interaction avec des rayonnements ionisants, tels des ions, des photons ou des électrons. L'irradiation en phase gazeuse, en parallèle à la phase condensée, peut alors fournir des informations sur les processus fondamentaux induits par des radiations ionisantes, et constitue un axe de recherche majeur depuis de nombreuses années. Ces études, initialement basées sur des systèmes atomiques ou moléculaires simples, se sont progressivement tournées vers des assemblages de tailles de plus en plus conséquentes. Deux grandes familles de systèmes moléculaires sont alors fréquemment caractérisées : d'une part la matière carbonée (polymères, hydrocarbures, ...) et d'autre part la matière du vivant (acides nucléiques, protéines et peptides, lipides, ...). La connaissance des propriétés intrinsèques de ces systèmes est de première importance pour comprendre leur comportement lorsqu'ils sont environnés. C'est par exemple le cas de la matière biologique au sein des cellules.

En s'affranchissant des effets liés au solvant, la phase gazeuse permet d'atteindre ces propriétés intrinsèques. Il est ainsi possible d'obtenir des informations sur la stabilité de ces systèmes en étudiant leur relaxation, après les avoir perturbés de manière contrôlée à l'aide de rayonnements ionisants (photons, ions, électrons). La compréhension des mécanismes en jeu nécessite alors une analyse détaillée des processus de relaxation, tels que l'ionisation, la fragmentation ou les transferts de charges.

L'objectif de cette thèse est de caractériser les réponses des constituants de la matrice extracellulaire du cartilage en phase gazeuse lors d'irradiations par des rayonnements ionisants, afin de déterminer les potentiels facteurs de stress pouvant être libérés par dégradation radio-induite. Suite au prochain chapitre, axé sur le contexte scientifique des systèmes moléculaires d'intérêt biologique et des techniques de contrôle et de caractérisation de molécules en phase gazeuse, une étude structurale des systèmes moléculaires utilisés pendant cette thèse sera détaillée. Nous verrons ensuite les réponses de ces systèmes à différents types de rayonnements ionisants en phase gazeuse, puis nous finirons en décrivant le développement d'un dispositif expérimental dédié aux collisions ions-biomolécules en faisceaux croisés et les premiers résultats obtenus.

2.1	Systèmes moléculaires d'intérêt biologique	8
2.1.1	Acides nucléiques	8
2.1.2	Acides aminés, peptides et protéines	9
2.1.3	Interactions non-covalentes	12
2.2	Techniques expérimentales de contrôle de molécules en phase gazeuse	14
2.2.1	Mise en phase gazeuse de molécules	14
2.2.1.1	Source à électronébulisation	15
2.2.1.2	Désorption laser assistée par matrice	16
2.2.1.3	Désorption laser de micro-gouttelettes	17
2.2.2	Sélection et transport d'ions	18
2.2.2.1	Funnel	18
2.2.2.2	Multipôles	19
2.2.3	Piégeage	20
2.2.3.1	Piège de Paul tridimensionnel	20
2.2.3.2	Piège linéaire	21
2.3	Techniques de caractérisation et d'analyse des propriétés physico-chimiques de biomolécules	22
2.3.1	Spectrométrie de masse	23
2.3.1.1	Spectromètre de masse à résonance cyclotronique ionique	23
2.3.1.2	Spectromètre de masse à temps de vol	24
2.3.2	Spectrométrie de mobilité ionique	27
2.3.3	Collisions sur gaz neutre	28
2.3.4	Collisions sur une surface	29
2.3.5	Collisions hors résonance	30
2.3.6	Ionisation par impact d'électron	31
2.3.7	Dissociation par capture d'électron	31
2.3.8	Dissociation par transfert d'électron	32
2.3.9	Irradiation par faisceaux de photons	33
2.3.9.1	Infra rouges	33

2.3.9.2	Ultraviolet	34
2.3.9.3	Vacuum Ultraviolet	35
2.3.9.4	Rayons-X	37
2.3.10	Irradiation par faisceaux d'ions atomiques	40
2.4	Le collagène, de la cellule à la phase gazeuse	43
2.4.1	La protéine de collagène	43
2.4.2	Peptide de collagène et peptide modèle de triple hélice	44

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser au contexte dans lequel se situent ces travaux de thèse. Nous verrons dans un premier temps différents systèmes moléculaires d'intérêt biologiques, afin de présenter les études qui ont permis leur caractérisation ainsi que la compréhension de leurs propriétés intrinsèques. Par la suite, les techniques expérimentales de contrôle de molécules en phase gazeuse seront détaillées, avant de présenter les outils et techniques d'analyse des processus physiques qui permettent la caractérisation de ces systèmes moléculaires. Nous finirons en présentant plus en détails la protéine de collagène, et notamment le peptide modèle de triple hélice, qui est au centre de ces travaux de thèse.

2.1 Systèmes moléculaires d'intérêt biologique

Une molécule d'intérêt biologique, plus communément appelée biomolécule, est une molécule présente, produite ou transformée au sein d'un organisme vivant. Les biomolécules participent au métabolisme de cet organisme en régulant l'ensemble des réactions chimiques qui permettent son développement et sa survie. Elles sont majoritairement composées d'atomes de carbone (C), d'azote (N), d'oxygène (O), de soufre (S), de phosphore (P) et d'hydrogène (H), et peuvent être présentes sous forme de petites molécules comme l'eau, de macromolécules telles les lipides, les protéines et les acides nucléiques, ou encore d'assemblages de plusieurs molécules.

Ces systèmes présentent un intérêt particulier dans le cadre de l'irradiation par rayonnements ionisants. En effet, lors de traitements thérapeutiques, ces biomolécules peuvent subir des dégâts radio-induits, comme par exemple leur destruction et/ou la modification de leurs propriétés physico-chimiques, ce qui peut avoir des conséquences directes sur l'activité métabolique et la survie des cellules. Il paraît donc intéressant d'étudier ces molécules d'un point de vue fondamental afin de connaître leurs caractéristiques propres lorsqu'elles sont soumises à des rayonnements ionisants.

2.1.1 Acides nucléiques

Les bases nucléiques, ou bases azotées, sont présentes sous cinq formes différentes, regroupées en deux catégories comme nous pouvons le voir sur la figure 2.1.1. Tout d'abord celles

dérivées de la purine : l'adénine et la guanine, et ensuite celles dérivées de la pyrimidine : la cytosine, la thymine et l'uracile. Elles sont les composants élémentaires de l'ADN et de l'ARN.

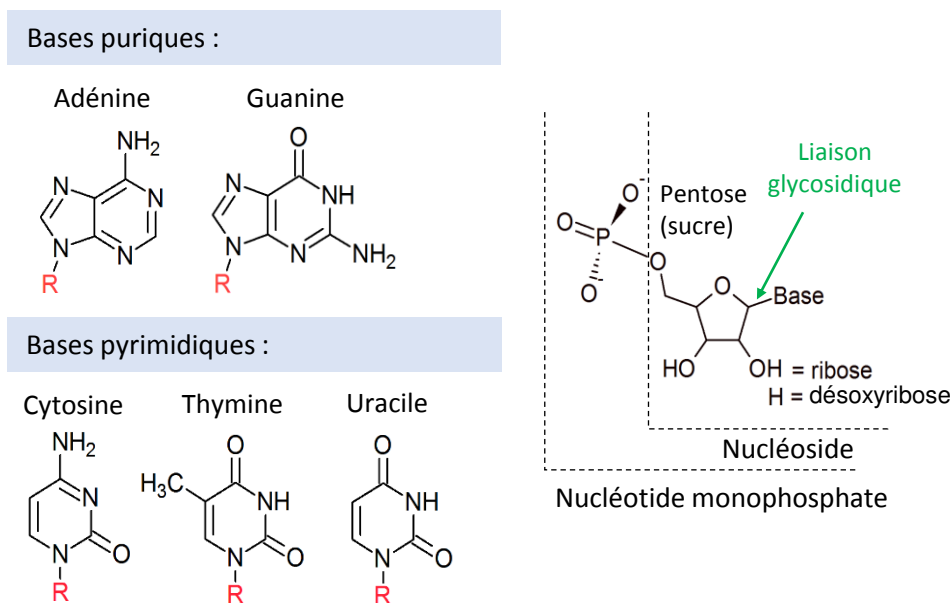


Figure 2.1.1 : A gauche : structure chimique des cinq bases nucléiques, où *R* représente la position du sucre dans le cas des nucléosides. A droite : schéma de la composition d'un nucléotide.

L'ADN (acide désoxyribonucléique) est un assemblage de deux longues molécules caractérisé par une structure en double hélice, qui contient toute l'information génétique des êtres vivants et dont chaque brin est un polymère de nucléotides. Ces derniers sont, dans le cas de l'ADN, composés d'un groupement phosphate et d'un nucléoside : l'ensemble d'un sucre et d'une des bases nucléiques, liés par une liaison glycosidique. Les bases qui la composent, toutes hormis l'uracile, permettent de lier les deux brins de sa double hélice. Ainsi, l'adénine et la thymine se lient par deux liaisons hydrogènes, et la guanine et la cytosine par trois.

L'ARN (acide ribonucléique) intervient quant à elle dans les réactions chimiques propres au métabolisme cellulaire. Les cellules l'utilisent entre autre pour transporter l'information génétique afin de réaliser la traduction, la synthèse des protéines. Mais contrairement à l'ADN, elle est uniquement composée d'un enchaînement linéaire de nucléotides, et plusieurs différences structurales sont notables : l'uracile remplace la thymine et le sucre du nucléoside est un ribose au lieu d'un désoxyribose.

2.1.2 Acides aminés, peptides et protéines

Les acides aminés sont de petites molécules qui possèdent entre une dizaine et une trentaine d'atomes et qui constituent les protéines. Ils sont composés d'un atome de carbone (noté C_α), d'un groupement amine (NH_2) et d'un acide carboxylique (CO_2H) organisés selon la structure chimique $H_2NC_\alpha(R)-CO_2H$, où (*R*) représente la chaîne latérale propre à chaque acide aminé.

2 Contexte

La figure 2.1.2 présente les 20 acides aminés les plus fréquemment observés dans les protéines. Nous pouvons observer que les acides aminés sont répertoriés dans trois catégories différentes, selon que leur chaîne latérale est polaire, apolaire ou chargée. Plus un acide aminé contient de liaisons polarisées sur sa chaîne latérale, telles que CO, NH ou NH₂, plus celle-ci sera polaire. Il devient ainsi hydrophile et peut établir des liaisons hydrogène avec l'eau. À l'inverse, un acide aminé sera hydrophobe si sa chaîne latérale ne comporte que des atomes de carbone et d'hydrogène. La dernière catégorie contient les acides aminés basiques ou acides, qui possèdent une chaîne latérale chargée positivement ou négativement à pH neutre, les rendant également hydrophiles.

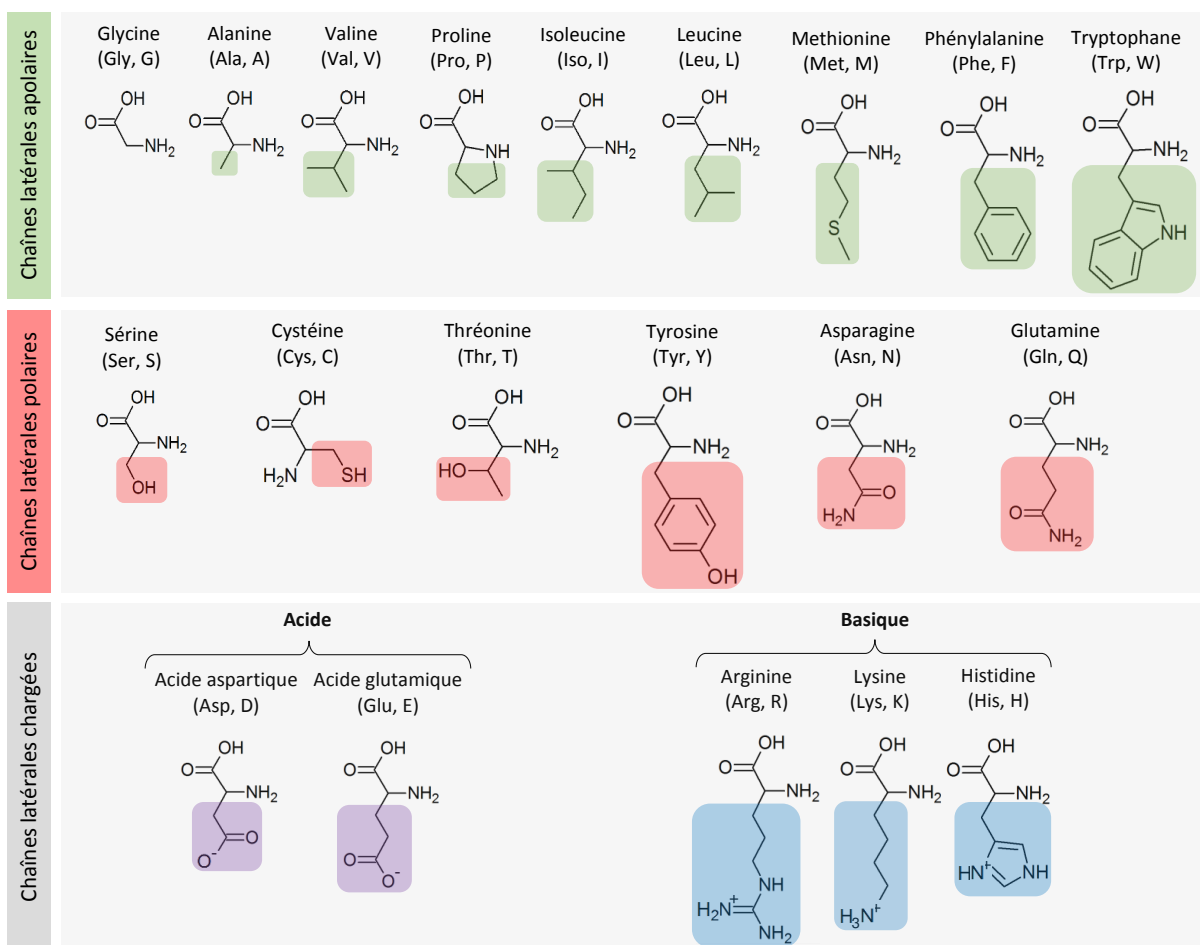


Figure 2.1.2 : Liste des 20 acides aminés protéinogènes. Les sections colorées soulignent les chaînes latérales des acides aminés.

Les protéines sont produites par une polymérisation d'acides aminés. Ces derniers sont liés de manière covalente entre l'acide carboxylique d'un premier et l'amine d'un second, créant ainsi une liaison dite peptidique. Le schéma de la figure 2.1.3 illustre la création de cette liaison entre deux acides aminés, dont les chaînes latérales sont nommées respectivement R₁ et R₂. Le premier acide aminé va subir la perte d'une molécule OH de son groupe carboxyle,

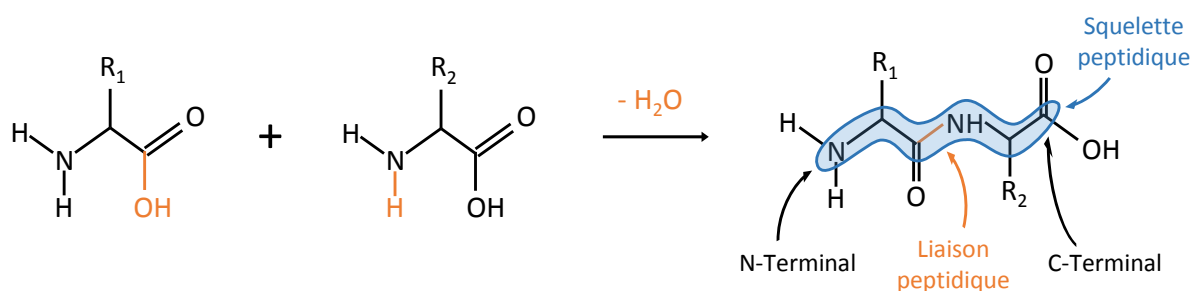


Figure 2.1.3 : *Processus de formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés dont les chaînes latérales sont respectivement notées R_1 et R_2 .*

alors que le second perdra uniquement un hydrogène de son groupe amine, libérant ainsi une molécule d'eau. Par convention, pour un assemblage de plusieurs acides aminés, l'azote du groupement amine n'ayant pas subi de modification est représenté sur la gauche du système et est appelé N-terminal. De la même manière, le carbone de l'acide carboxylique situé à l'opposé est nommé C-terminal. La suite d'atomes d'azote et de carbone qui lie ainsi le N-terminal au C-terminal est appelé le squelette peptidique. Toujours par convention, une protéine est un système comportant une centaine d'acides aminés ou plus. Pour un nombre d'acides aminés plus petit, le terme utilisé est celui de peptide.

Une nomenclature a été introduite dans la littérature pour attribuer des noms aux fragments créés le long du squelette peptidique en fonction de la liaison brisée [9–11]. Celle-ci est illustrée sur la figure 2.1.4 dans le cas d'un peptide composé de quatre acides aminés dont les chaînes latérales sont respectivement notées R_1 à R_4 , avec R_1 du côté du N-terminal.

Ces notations permettent une indexation des liaisons covalentes rompues. Ainsi, les ions a et x correspondent à la rupture de la liaison $C_{\alpha,i}-C$, les ions b et y à celle de la liaison peptidique C-N et enfin les ions c et z à celle de la liaison $N-C_{\alpha,i+1}$, où $C_{\alpha,i}$ correspond à l'atome de carbone lié à la chaîne latérale R_i .

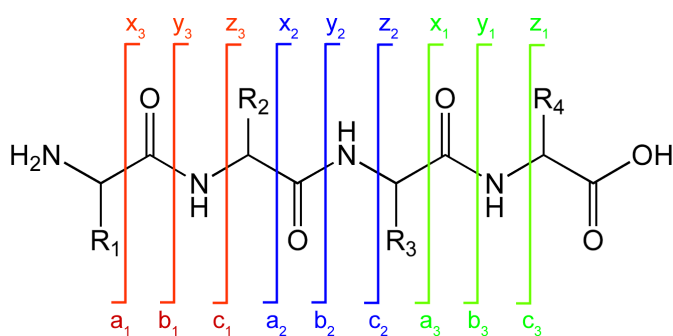


Figure 2.1.4 : *Schéma d'un peptide composé de quatre acides aminés avec indexation des noms des différents fragments produits selon la liaison covalente brisée. R_1 à R_4 représentent les chaînes latérales des acides aminés.*

Dans le cas d'un peptide monochargé, les fragments chargés produits dépendent de la localisation de la charge. Ainsi, les fragments a, b et c sont formés si elle est du côté du N-terminal, et à l'inverse les fragments x, y et z sont créés lorsqu'elle est sur le C-terminal. Pour un peptide multichargé, il est possible que les charges soient réparties de chaque côté de la liaison rompue, pouvant ainsi former des couples d'ions complémentaires. Dans le cas où plusieurs liaisons covalentes du squelette sont rompues, des fragments internes peuvent être observés.

La nature et l'activité biologique des protéines au sein d'un organisme vivant dépendent directement de sa constitution (structure primaire), mais également de la structure tridimensionnelle du système (structures secondaire, tertiaire et quaternaire). Cette structure primaire correspond à leur séquence d'acides aminés, sans référence à une configuration spatiale. De plus, dans les cellules, les protéines peuvent subir des transformations post-traductionnelles : ce sont des modifications chimiques, principalement causées par des enzymes, et qui peuvent faire varier leur fonction biologique ainsi que de leurs propriétés physico-chimiques. Nous pouvons par exemple citer le processus d'hydroxylation, qui ajoute un groupement OH sur la chaîne latérale de certains acides aminés, notamment la proline et la lysine.

La plupart de ces protéines possèdent une structure secondaire particulière, et peuvent présenter un repliement local de la chaîne d'acides aminés. Nous pouvons par exemple citer le cas de l'hélice α , structure caractéristique et répandue des protéines, formée par l'enroulement d'une chaîne polypeptidique sur elle-même. Il en est de même pour les feuillets β , formés par le repliement de la chaîne en segments parallèles entre eux. Ces structures sont stabilisées par de nombreuses liaisons H intramoléculaires.

Alors que la structure tertiaire décrit les interactions entre structures secondaires, la structure quaternaire caractérise quand à elle les ensembles de plusieurs structures tertiaires. Toutes ces interactions sont non-covalentes.

2.1.3 Interactions non-covalentes

Les systèmes moléculaires comme les protéines ou les peptides peuvent s'agréger : on parle alors de complexes non-covalents. Ils sont liés par des interactions qui se distinguent selon trois catégories : les interactions électrostatiques entre charges, les interactions dipolaires et les liaisons hydrogènes.

Interactions électrostatiques entre charges

Ces interactions ioniques sont les plus fortes des interactions non-covalentes. Elles sont dues à un potentiel coulombien entre deux sites chargés, et dans le cas d'une interaction attractive, l'énergie de la liaison peut être comparable à celle d'une liaison covalente, c'est-à-dire plusieurs eV. Comme l'énergie coulombienne dépend directement de la permittivité du milieu, cette interaction sera beaucoup plus importante dans le vide qu'elle ne l'est en phase conden-

sée, lorsque les molécules sont environnées de solvant. Les liaisons entre peptides impliquent majoritairement leurs groupements C- et N-terminaux, ainsi que les chaînes latérales de certains acides aminés, car ces sites peuvent être porteurs de charges dans le cas de molécules protonées ou déprotonées.

Interactions dipolaires

De manière générale, une molécule ou un groupement qui ne possède pas de charge nette peut également contribuer aux interactions non-covalentes par le biais de son moment dipolaire μ permanent ou induit. Un dipôle peut interagir avec son environnement électrostatique, notamment avec les ions ou d'autres dipôles, et la force de ces interactions dépend directement de la nature du second intervenant.

Dans le cas de l'interaction ion-dipôle, ce dernier va s'aligner en fonction de la charge de l'ion afin de créer une force attractive entre les deux espèces, comme nous pouvons le voir sur la figure 2.1.5 de gauche [12]. Même si elles sont moins fortes que les interactions entre deux ions, les interactions ion-dipôle ont un rôle important d'un point de vue structural pour une protéine. Elles sont également à l'origine d'une partie des interactions entre ces protéines et le solvant, à cause notamment du moment dipolaire permanent de l'eau.

Deux dipôles peuvent interagir selon deux configurations. Comme le présente la figure 2.1.5 de droite [12], ils vont soit s'aligner tête bêche, soit de manière colinéaire, de sorte à maximiser les interactions attractives.

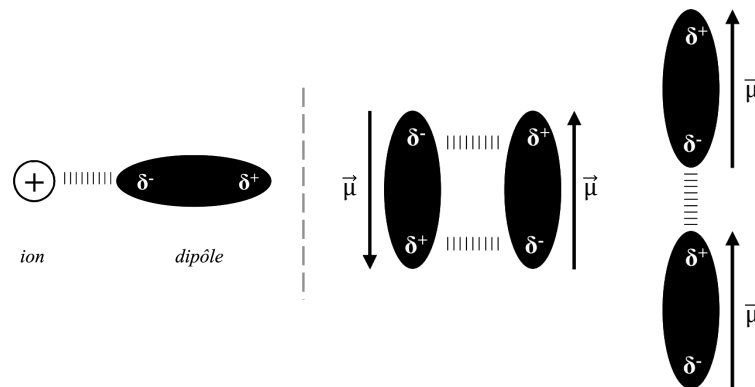


Figure 2.1.5 : A gauche, principe de l'interaction ion-dipôle, où ce dernier s'aligne sur l'ion afin de maximiser la force d'attraction. A droite, configurations tête bêche et colinéaire favorables lors de l'interaction entre deux dipôles.

Liaison hydrogène

Deux atomes électronégatifs peuvent "partager" un atome d'hydrogène afin de former ce type de liaison. Celle-ci peut s'assimiler à la liaison électrostatique charge-dipôle. La liaison

hydrogène est très présente dans la formation de complexes non-covalents de molécules biologiques et joue un rôle structural important. Dans le cas de protéines, ce type de liaison est par exemple présent dans les structures particulières de l'hélice α et du feuillet β .

Afin d'étudier les caractéristiques des systèmes moléculaires d'intérêt biologique que nous venons de détailler tout au long de cette partie, de nombreuses études ont été menées. La plupart d'entre elles ont été réalisées en phase condensée, lorsque ces molécules sont environnées de solvant, mais elles ont par la suite été orientées vers la phase gazeuse, où la caractérisation des molécules permet directement d'explorer les propriétés propres à ces systèmes. La mise en place de ces études a nécessité le développement de nouvelles techniques expérimentales afin de porter de tels systèmes moléculaires en phase gazeuse et de les contrôler.

2.2 Techniques expérimentales de contrôle de molécules en phase gazeuse

L'étude de molécules isolées en phase gazeuse permet de s'affranchir des effets de solvant et d'environnement afin de se consacrer aux propriétés intrinsèques du système d'intérêt. Ces expériences ont longtemps été menées sur des molécules neutres de relativement petite taille, comme les acides aminés, mais le développement de nouvelles techniques, comme les sources à électronébulisation ou à désorption laser, a permis la mise en phase gazeuse de molécules telles les peptides ou les protéines de taille plus conséquente, et plus fragiles thermiquement que les molécules neutres habituellement étudiées.

L'intérêt de ces nouvelles techniques réside également dans le fait que ces systèmes sont produits chargés. Il est alors possible de les guider et de les contrôler par le biais de techniques et d'outils expérimentaux utilisant des champs électrique et/ou magnétique. Nous allons donc voir dans cette partie les principes fondamentaux de ces techniques, présentes pour la plupart sur les différents dispositifs expérimentaux utilisés dans le cadre de cette thèse.

Dans un premier temps nous nous intéresserons aux techniques de mise en phase gazeuse de molécules chargées, puis nous verrons ensuite comment guider, piéger et mettre en forme un faisceau d'ions.

2.2.1 Mise en phase gazeuse de molécules

Comme nous venons de le mentionner, un gaz de molécules peut être créé par des techniques d'évaporation, à l'aide d'un four par exemple. Pour les systèmes plus fragiles thermiquement, c'est-à-dire qui se transforment chimiquement avant de s'évaporer, il est nécessaire d'utiliser des techniques plus douces. Les sources à électronébulisation ou à désorption laser répondent à cette contrainte.

2.2.1.1 Source à électronebulisation

Les sources à électronebulisation (ESI pour *ElectroSpray Ionization*) [13–18], dont le principe est schématisé sur la figure 2.2.1, permettent une ionisation "douce" des molécules. Ces dernières, initialement présentes sous forme de poudre, sont dissoutes dans une solution composée d'un ou plusieurs solvants (eau, méthanol, acétonitrile, ...). De l'acide ou une base peuvent également y être ajoutés à hauteur de quelques pourcents du volume total afin de favoriser la protonation (en mode positif), ou la déprotonation (en mode négatif) des molécules. A l'aide d'un pousse-seringue qui permet d'appliquer un débit de l'ordre de 0,1 à 0,5 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, la solution est amenée de manière continue jusqu'à une fine aiguille métallique. Cette dernière est généralement positionnée à quelques millimètres de l'entrée d'un capillaire métallique, et est légèrement désaxée pour limiter au maximum que des particules neutres y entrent. Nous pouvons rappeler ici que cette aiguille métallique est située dans un environnement où la pression est proche de la pression atmosphérique. Certaines sources ESI commerciales peuvent se trouver sous atmosphère contrôlée, où un gaz inerte chauffé facilitera la mise en phase gazeuse des molécules. Ainsi, le capillaire métallique situé en face de cette fine aiguille fait la liaison entre la pression atmosphérique et le dispositif expérimental sous vide. En effet, son faible diamètre (de l'ordre de quelques centaines de μm) et sa longueur avoisinant la dizaine de centimètres, assurent une faible conductance de l'air.

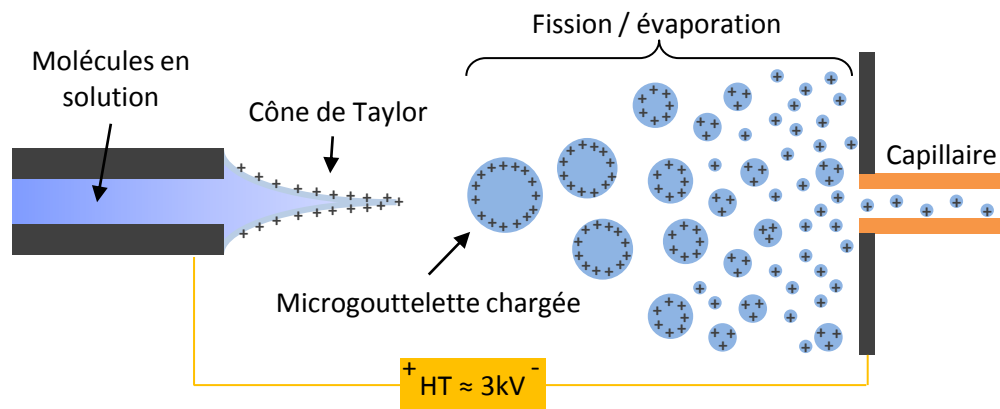


Figure 2.2.1 : Principe de fonctionnement de l'électrospray en mode positif.

Le flux imposé par le pousse-seringue forme une goutte de la solution à l'extrémité de l'aiguille. Le fait d'appliquer une différence de potentiel de quelques kilovolts entre celle-ci et le capillaire permet une accumulation de charges de la solution à l'extrémité de l'aiguille. La surface de la goutte va ainsi se déformer jusqu'à créer un cône, dit de Taylor [19].

Des gouttelettes de quelques μm de diamètre sont alors libérées de l'aiguille. Elle subissent ensuite des réductions suite à l'évaporation du solvant. Ceci provoque l'augmentation de la densité de charge sur leur surface jusqu'au seuil critique, nommé la limite de Rayleigh [19], où la répulsion électrostatique devient plus importante que la tension de surface de la gout-

telette. Cette dernière subit des fissions coulombiennes, produisant ainsi d'autres gouttelettes secondaires, de plus petite taille, elles-mêmes proches de la limite de Rayleigh, et pouvant également subir de nouvelles fissions. Ces gouttelettes traversent finalement le capillaire chauffé, où l'évaporation se poursuit.

Concernant la fin de la désolvatation des molécules, deux processus sont évoqués dans la littérature : d'un côté celui de l'évaporation ionique [20], de l'autre, celui de la charge résiduelle [17]. Le premier processus explique la désolvatation de la molécule par l'extraction de l'ion de la gouttelette lorsque cette dernière est suffisamment petite (diamètre < 20 nm). Le second processus propose que l'évaporation du solvant se poursuive jusqu'à la désolvatation complète de la molécule. Ces deux processus dépendent malgré tout de la nature, de la taille et de l'état de charge de la molécule étudiée.

Les sources ESI permettent finalement de porter en phase gazeuse des molécules de différentes tailles, allant des acides nucléiques jusqu'aux complexes non-covalents de protéines, tels que des virus [21, 22].

2.2.1.2 Désorption laser assistée par matrice

La seconde technique de mise en phase gazeuse de molécules que nous allons aborder ici, est nommée MALDI (pour *Matrix Assisted Laser Desorption - Ionization*), et nécessite cette fois l'utilisation d'un laser UV, visible ou IR pulsé à une fréquence de l'ordre de 10 Hz. Le principe de fonctionnement de cette technique est schématisé sur la figure 2.2.2. Le laser délivre des impulsions de l'ordre de la nanoseconde [23], qui vont atteindre une cible solide composée d'une matrice organique, à l'intérieur de laquelle sont contenues les molécules d'intérêt. Comme il n'est pas souhaitable que ces dernières absorbent des photons et fragmentent avant même leur mise en phase gazeuse, le choix de la longueur d'onde du laser et celui de la composition de la matrice sont primordiaux. Après absorption de photons, la matrice se trouve ionisée, et éjecte de la matière, formant ainsi une plume de désorption [24] qui contient de la matrice ionisée et les molécules à mettre en phase gazeuse. La matrice possède donc deux rôles cruciaux, elle doit absorber les photons, et également transférer des protons aux molécules. Une fois chargées, ces dernières sont guidées par une différence de potentiel appliquée entre la plaque qui porte la matrice et l'entrée du dispositif expérimental.

Cette méthode de mise en phase gazeuse est également douce, mais produit des ions dans des états de charge plus faibles qu'une source ESI. De plus, les ions moléculaires produits sont répartis selon une large distribution en vitesse [25, 26]. Pour pallier à cet aspect, certaines sources MALDI n'utilisent pas de champ électrique constant pour guider les ions, mais fonctionnent sur le principe d'une extraction retardée [27, 28]. Les ions sont créés dans une zone sans champ électrique, puis sont extraits par une impulsion électrique appliquée quelques centaines de nanosecondes après leur création.

Avec cette technique, de nombreuses protéines [29, 30], comme l'insuline, l'Ubiquitine ou le Cytochrome C, et même des complexes non-covalents [31, 32], ont pu être mis en phase

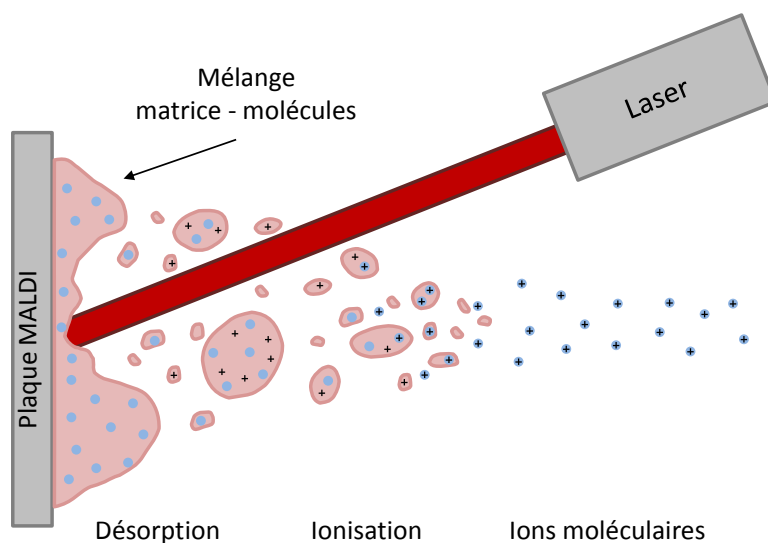


Figure 2.2.2 : Principe de fonctionnement de la source MALDI.

gazeuse. Certaines études se sont également axées sur la comparaison entre l'utilisation de photons IR et UV pour réaliser la désorption de la matrice. Les résultats obtenus, bien que très similaires, ont tout de même permis de mettre en avant que l'utilisation d'un laser IR laissait la molécule dans un état moins excité qu'un laser UV car moins de fragments sont observés [30].

Plus récemment, P. Ryumin *et co.* [33] ont montré qu'il est possible d'obtenir de multiples états de charges pour des molécules de masses comprises entre 60 et 140 Da, avec une source MALDI où la désorption d'une matrice liquide se fait à pression atmosphérique. Les liquides sont également utilisés pour la technique de désorption laser de micro-gouttelettes, comme nous allons maintenant le voir.

2.2.1.3 Désorption laser de micro-gouttelettes

La désorption laser de micro-gouttelettes est une méthode douce de mise en phase gazeuse de molécules par irradiation de gouttelettes par laser IR [34, 35] ou UV [36]. Cette technique est dérivée de la désorption laser sur liquide [37, 38], qui fonctionne selon le même principe mais induit une perte trop importante de biomolécules.

Chaque pulse du laser est synchronisé sur la chute d'une gouttelette et les molécules sont éjectées selon un mécanisme d'explosion coulombienne [39]. L'intensité du signal mesuré avec cette technique est d'autant plus importante que le volume de la gouttelette et sa concentration sont élevés. De plus, comme les gouttelettes sont initialement non chargées, cette technique d'ionisation permet de produire des états de charges relativement bas, contrairement aux sources ESI. La désorption de micro-gouttelettes permet ainsi de produire des molécules sur de larges gammes de taille pouvant aller jusqu'aux complexes non-covalent de protéines [34, 37, 38].

2.2.2 Sélection et transport d'ions

Comme nous venons de le voir, à ce stade, de nombreuses espèces sont présentes lorsque ces molécules sont mises en phase gazeuse. Ces techniques produisent ainsi des molécules neutres, mais surtout de nombreuses espèces chargées, de taille et d'état de charge différents. Il est donc nécessaire de mettre en forme et de guider ces ions pour en faire un faisceau. Il est également possible de sélectionner par la suite un type d'ion particulier en fonction de son rapport masse sur charge. Nous allons donc d'abord nous intéresser aux funnels, puis nous verrons ensuite les multipôles.

2.2.2.1 Funnel

Les funnels sont fréquemment couplés avec des sources ESI [40–42] car ils permettent le guidage et la focalisation d'un faisceau d'ions de faible énergie cinétique afin de maximiser son intensité. Leurs électrodes ont la particularité d'avoir une forme d'entonnoir pour favoriser la focalisation, comme nous pouvons le voir sur le schéma présenté sur la figure 2.2.3 [40]. La pression dans la chambre avoisine le millibar, et le libre parcours moyen d'une molécule est alors proche de $200 \mu\text{m}$.

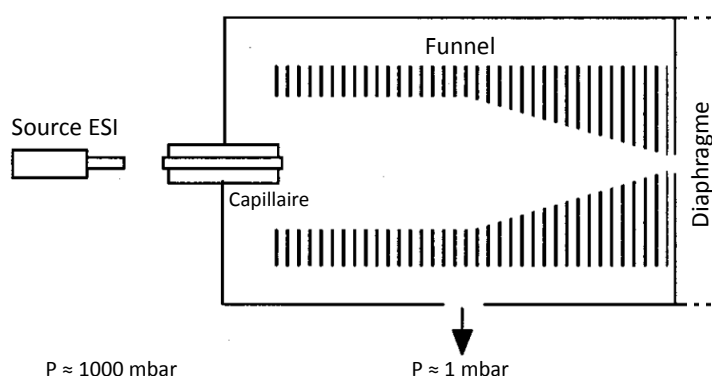


Figure 2.2.3 : Schéma d'un funnel [40], avec la source ESI sur la gauche. Le capillaire permet d'amener le faisceau de molécules issues de la source vers l'intérieur du dispositif, où il sera focalisé par le funnel, avant de traverser le diaphragme qui le mènera vers les étages suivants du dispositif.

En plus d'un champ électrique constant et homogène appliqué sur toute la longueur du funnel, chaque électrode est soumise à un potentiel électrique radio-fréquence. En alternant phase et opposition de phase, le champ électrique ainsi induit permet de compenser radialement les déviations de trajectoire aléatoires des ions, suite aux nombreuses collisions que ces derniers subissent sur le gaz résiduel. Lors de la réalisation d'un funnel, il est important de conserver une distance minimum entre deux électrodes égale à la moitié de leur rayon interne. En effet, dans le cas contraire, des électrodes de petit diamètre interne trop rapprochées peuvent induire des conditions de piégeage d'ions [40, 41], similaires à celles d'un piège linéaire [43].

Le diaphragme situé après les électrodes permet de réaliser un différentiel de pression en limitant l'écoulement du gaz résiduel dans l'axe du funnel. Dans ces gammes de pressions, la vitesse de cet écoulement est de l'ordre de la centaine de mètres par seconde [44], entraînant les ions vers les zones de plus basse pression.

2.2.2.2 Multipôles

Un multipôle est composé d'un ensemble d'électrodes cylindriques sur lesquelles est appliqué un potentiel électrique radio-fréquence de pulsation Ω , composé d'un potentiel oscillant d'amplitude V_0 , et d'un potentiel statique U_0 .

Comme nous l'avons dit précédemment, après la mise en phase gazeuse des molécules, de nombreuses espèces sont présentes. Il est donc nécessaire de trier ces ions afin de connaître et sélectionner avec précision la nature du faisceau de molécules d'étude. Pour ce faire, l'analyseur en masse quadripolaire (QMS pour *Quadrupole Mass Analyser*) a pour but de sélectionner les ions d'intérêt selon leur rapport masse/charge.

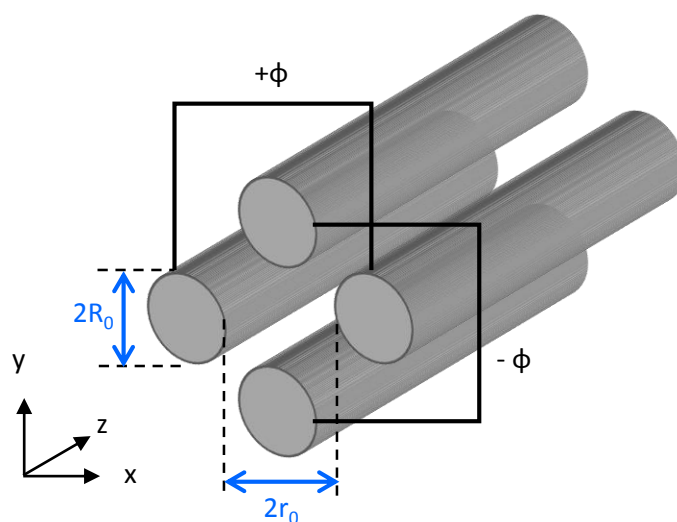


Figure 2.2.4 : Schéma de principe du QMS, avec R_0 le rayon des électrodes, et $2.r_0$, la distance séparant deux électrodes opposées. Des potentiels en opposition de phase sont appliqués sur les deux couples d'électrodes.

Comme l'illustre la figure 2.2.4, le potentiel oscillant d'une électrode donnée sera en opposition de phase avec ceux appliqués sur les deux électrodes qui lui sont adjacentes. Deux électrodes opposées l'une à l'autre et espacées par une distance $2.r_0$ auront des potentiels oscillant en phase. Le potentiel quadripolaire ainsi créé est de type :

$$\Phi(\vec{r}, t) = \Phi_0(t) \frac{x^2 - y^2}{2.r_0^2} \quad (2.2.1)$$

avec

$$\Phi_0(t) = U_0 - V_0 \cdot \cos(\Omega \cdot t) \quad (2.2.2)$$

De ces relations découlent les équations de Mathieu [45–47], qui régissent le mouvement des ions dans un champ quadripolaire. En fixant U_0 et V_0 seuls les ions correspondant à un rapport masse sur charge donné ont une trajectoire stable, oscillants dans le plan (xOy) avec une faible amplitude, et parviennent à traverser le QMS. Les autres espèces ioniques ont des trajectoires instables, dont l'amplitude d'oscillation augmente jusqu'à leur perte. En faisant évoluer U_0 et V_0 , tout en gardant un rapport constant, il est possible de scanner toutes les masses présentes initialement dans le faisceau à la sortie de la source. Dans le cas où la composante statique U_0 du champ est nulle, le QMS laisse passer tous les ions et agit comme un simple guide d'ions.

De manière plus générale, les multipôles sont fréquemment utilisés pour guider les faisceaux d'ions de basse énergie cinétique (~ 10 eV/charge) [46, 48, 49]. La composante oscillante du potentiel est alors fixée de sorte que la plus grande gamme de m/z traverse le multipôle.

2.2.3 Piégeage

Une fois la molécule d'intérêt sélectionnée et le faisceau purifié des espèces non désirées, il est possible d'accumuler les ions afin d'augmenter localement leur densité. Plusieurs types de pièges à ions existent afin de répondre à différentes problématiques. Nous allons uniquement voir ici deux d'entre eux : les pièges tridimensionnel et linéaire.

2.2.3.1 Piège de Paul tridimensionnel

Le piège de Paul [47, 50] est composé de trois électrodes de forme hyperbolique : un anneau central et deux électrodes, d'injection et d'extraction, comme nous pouvons le voir sur la figure 2.2.5a. Afin de pouvoir piéger des ions avec une telle géométrie, il est nécessaire que le rayon r_0 de l'anneau central et la distance z_0 entre le centre du piège et les électrodes d'injection et d'extraction respectent la condition $r_0^2 = 2 \cdot z_0^2$ afin d'obtenir un champ quadripolaire homogène en tout point du piège [45, 50].

Les électrodes d'injection et d'extraction sont soumises à un potentiel constant U_{bias} . Sur l'anneau central, un potentiel de la forme $U_{\text{bias}} + V_0 \cdot \cos(\Omega \cdot t)$ est appliqué dès l'injection des ions afin de les confiner au centre du piège. Comme pour le cas du QMS, la stabilité de la trajectoire des ions dans un piège de Paul est régie par les équations de Mathieu [45, 47, 50]. Cependant, lorsque ce type de potentiel oscillant confine les ions dans deux directions, le champ quadripolaire est déconfinant selon la troisième. Un choix judicieux du jeu de paramètres (V_0, Ω) , permet au potentiel sinusoïdal de confiner alternativement les ions dans des directions différentes et ainsi piéger les ions dans ce champ quadripolaire, comme l'illustre la figure 2.2.5b. Le piégeage des ions peut également être facilité par collisions sur du gaz tampon, typiquement de l'hélium.

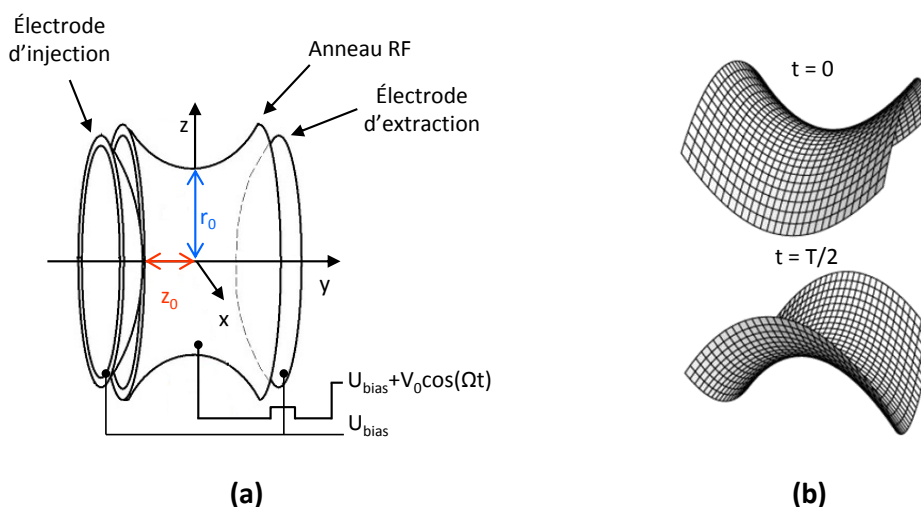


Figure 2.2.5 : (a) : schéma des électrodes du piège de Paul. Les potentiels appliqués lors du piégeage des ions sont également indiqués. (b) : surfaces équipotentielles oscillantes à une période T dans un piège de Paul.

Ce type de piège permet finalement d'accumuler et de regrouper des ions localement dans les trois dimensions de l'espace, en formant ainsi des paquets d'ions de quelques mm^3 et pour une densité pouvant avoisiner les 10^6 ions. mm^{-3} .

2.2.3.2 Piège linéaire

La géométrie d'un piège linéaire est dérivée de celle d'un analyseur en masse quadripolaire. Comme nous pouvons le voir sur la figure 2.2.6, ce type de piège est composé de quatre barres hyperboliques, mais également de deux lentilles, d'injection et d'extraction. Cette configuration permet aux ions d'avoir une trajectoire oscillante radialement, grâce à un puits de pseudo potentiel RF, tout en préservant une trajectoire stable selon leur axe de propagation, à l'aide d'un puits de potentiel continu formé par les tensions appliquées aux électrodes d'injection et d'extraction [45,51–54]. Du gaz tampon d'hélium peut également être utilisé afin de thermaliser les ions par collisions douces.

Finalement, avec cette géométrie, les ions ne sont confinés que radialement, à l'inverse des piège 3D. Des études ont montré que cette configuration présente plusieurs avantages sur les pièges tridimensionnels [55, 56], comme une plus grande capacité de piégeage, une meilleure efficacité, et une diminution de la charge d'espace, problème récurrent des pièges 3D comme nous le verrons par la suite. Il a également été montré que la capacité de charges dans un piège linéaire augmente avec le nombre de barres du multipôle [57]. Cet aspect permet alors une accumulation de systèmes multichargés. Ce type de piège trouve des applications en spectroscopie de photo-fragmentation de biomolécules, principalement des peptides [58],

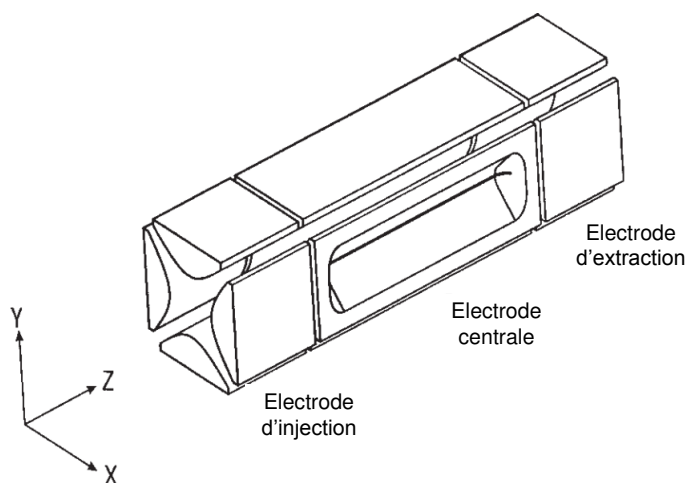


Figure 2.2.6 : Schéma d'un piège linéaire, composé des électrodes d'injection et d'extraction, et de l'électrode centrale.

mais également pour des réactions entre ions, ou par capture et transfert d'électrons sur des molécules [45].

Toutes les méthodes que nous venons de voir permettent le contrôle des molécules que nous souhaitons étudier. Que ce soit pour les piéger ou les diriger, ces outils expérimentaux permettent ainsi la mise en place de techniques de caractérisation et d'analyse de molécules en phase gazeuse, afin d'obtenir des informations sur leurs propriétés physico-chimiques.

2.3 Techniques de caractérisation et d'analyse des propriétés physico-chimiques de biomolécules

L'étude de molécules d'intérêt biologique nécessite l'utilisation de nombreuses techniques d'analyse, permettant notamment d'obtenir des informations sur la structure ou la stabilité du système que l'on souhaite étudier.

Il est possible d'obtenir des informations sur la stabilité d'un système en l'activant, c'est-à-dire en y déposant de l'énergie interne en modifiant la population des états vibrationnels et/ou électroniques, comme c'est par exemple le cas pour des collisions douces sur du gaz ou lors de désorptions par photons VUV. L'intérêt de l'utilisation des photons réside dans le fait qu'ils permettent d'apporter de l'énergie au système en sélectionnant le site d'absorption et ciblent ainsi plus précisément les caractéristiques que l'on souhaite observer.

Pour l'étude de leur structure, il est possible de faire fragmenter ces systèmes moléculaires, par exemple lors de collisions énergétiques sur du gaz, par capture d'électrons, ou lors d'interactions avec des ions atomiques, qui possèdent une haute efficacité grâce à leur grande section efficace. Ces différentes approches produisent ainsi des sites de ruptures différents, de

part l'interaction qui entre en jeu, et sont donc complémentaires.

Dans cette partie, nous allons ainsi voir un aperçu des différentes techniques pouvant être utilisées en spectrométrie afin d'étudier la stabilité ou la structure d'un système moléculaire. La plupart de ces techniques ont été utilisées dans le cadre de cette thèse, nous allons donc présenter leurs caractéristiques respectives.

2.3.1 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique expérimentale qui consiste à mesurer le rapport masse sur charge de particules chargées. Plusieurs méthodes d'analyse peuvent être utilisées, nous pouvons par exemple citer le quadripôle ou les pièges à ions radio-fréquences que nous avons déjà détaillés précédemment, mais nous pouvons également mentionner la résonance cyclotronique par transformée de Fourier et le spectromètre à temps de vol. Les spectromètres sont caractérisés par leur résolution $m/\Delta m$, c'est-à-dire leur capacité à distinguer deux ions dont les masses sont séparées de 1 Da. Lors de ces travaux de thèse, les spectromètres de masse ont été fréquemment utilisés pour analyser les résultats de caractérisation de systèmes moléculaires par les méthodes que nous allons présenter par la suite.

2.3.1.1 Spectromètre de masse à résonance cyclotronique ionique

Les spectromètres de masse à résonance cyclotronique ionique (FT-ICR pour *Fourier-transform ion cyclotron resonance*) sont des dispositifs de grande performance permettant une mesure de haute résolution des rapports masse sur charge de particules chargées [59, 60]. Leur principe repose sur le piégeage d'ions dans une cellule où est appliqué un champ magnétique constant (entre 7 et 9.5 T). Or, une particule chargée soumise à un champ magnétique uniforme aura un mouvement circulaire perpendiculaire à ce champ, induit par la force de Lorentz. Ce mouvement, dit cyclotronique, est caractérisé par une vitesse de rotation et une fréquence angulaire, indépendantes de la vitesse initiale des ions, mais directement liées au champ magnétique et inversement proportionnelles à leur rapport m/z . La mesure de cette fréquence cyclotronique permet de déterminer le rapport masse sur charge de l'ion considéré.

Ainsi, afin d'enregistrer un spectre de masse il est nécessaire de détecter les courants induits par le mouvement cyclotronique des ions à l'aide de plaques de détection. Cependant, les ions sont injectés dans la cellule selon de larges distributions en énergie et en temps de vols. Les particules chargées de rapport m/z donné ont ainsi un mouvement incohérent les uns envers les autres, et sont répartis sur des orbites de faibles rayons. Il n'est donc pas possible de détecter directement leur fréquence cyclotronique. L'application d'une onde RF permet d'apporter de l'énergie d'excitation aux ions d'un rapport m/z donné, comme l'illustre la figure 2.3.1 de gauche [59]. Ces derniers se trouvent accélérés et ralentis alternativement, lorsque l'onde est en phase ou en opposition de phase avec leur fréquence cyclotronique. Il est ainsi possible d'amener l'ensemble de ces ions d'un mouvement incohérent (déphasé) sur une orbite de faible

rayon, à un mouvement cohérent (en phase) sur une orbite de rayon supérieur (figure 2.3.1 de droite) [61, 62]. Dans cette configuration, les ions possédant un autre rapport m/z n'entrent pas en résonance et restent confinés au centre de la cellule.

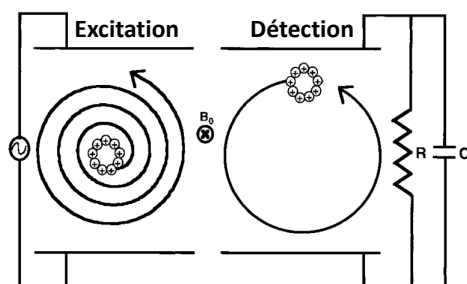


Figure 2.3.1 : Schéma du principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse FT-ICR. À gauche, l'onde RF excite les particules chargées de rapport m/z donné. Cette excitation donne un mouvement cohérent aux ions et augmente leur rayon de rotation. À droite, détection de la fréquence cyclotronique des ions en mesurant le courant induit.

Ces dispositifs sont généralement couplés avec des sources de types ESI ou MALDI situées en dehors du champ magnétique. Les espèces ioniques sont amenées dans la cellule par le biais de guides d'ions. Les FT-ICR permettent de réaliser des spectres de masse de haute résolution ($m/\Delta m > 10^6$ pour $m/z = 400$ [59]), notamment parce qu'il est possible de réaliser les mesures pendant un temps relativement long, pouvant aller jusqu'à la dizaine de secondes. Cette résolution reste malgré tout limitée par la valeur du champ magnétique et par le vide résiduel de la cellule. De plus, de part leur géométrie, leur gamme de rapport masse sur charge détectable est tout de même limitée, typiquement pour des $m/z < 2500$. En effet, plus le rapport m/z est élevé, plus le rayon de rotation des ions est grand. La gamme de m/z est donc limitée par le rayon de la cellule.

2.3.1.2 Spectromètre de masse à temps de vol

Les particules chargées, initialement localisées dans une zone d'extraction, sont soumises à un champ électrique uniforme appliqué à l'instant t_{start} , comme illustré sur la figure 2.3.2. Les ions sont accélérés dans la direction de ce champ, et traversent une zone de vol libre sans champ, avant d'être détectés. Leur détection à l'instant t_{stop} permet la construction d'un spectre de temps de vol. Or, pour une particule chargée de masse m et de charge q données, initialement au repos, et soumise à une différence de potentiel V , son temps de vol $T = t_{\text{stop}} - t_{\text{start}}$ est :

$$T \propto \sqrt{\frac{m}{q}} \quad (2.3.1)$$

Il est alors possible de faire une calibration à l'aide de cette relation pour transformer un spectre de temps de vol en spectre de masse.

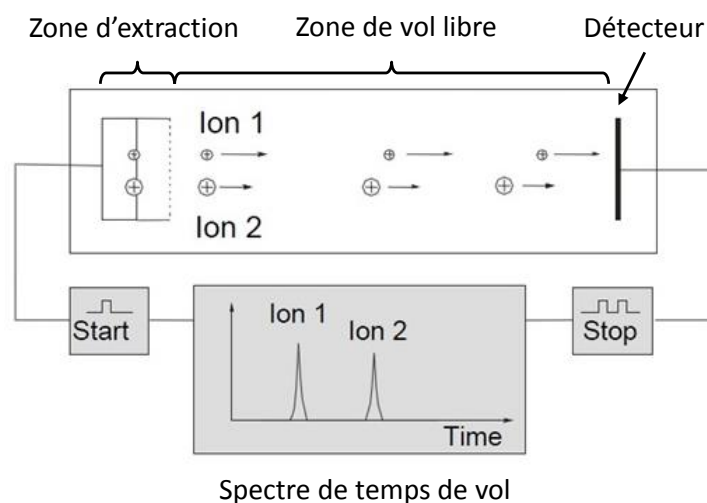


Figure 2.3.2 : Schéma du principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse à temps de vol. Les ions 1 et 2 sont accélérés par l'application d'une différence de potentiel (signal start), avant d'être séparés par leur rapport m/z , puis détectés (signaux stop). La différence entre les signaux stop et le signal start permet ainsi la construction d'un spectre de temps de vol. [63]

D'autre part, la relation 2.3.1 permet d'obtenir :

$$\frac{m}{q} \propto T^2 \quad (2.3.2)$$

Il est ainsi possible de définir la résolution en masse, $m/\Delta m$, d'un spectromètre comme étant sa capacité à séparer deux ions de charge q donnée et de masses m_1 et m_2 proches, avec $\Delta m = m_2 - m_1$:

$$\frac{m}{\Delta m} = \frac{1}{2} \cdot \frac{T}{\Delta T} \quad (2.3.3)$$

Où ΔT est la largeur mesurée de la distribution en temps de vol des ions de masse m .

La résolution d'un spectromètre de masse dépend directement de la longueur de la zone de vol libre : plus celle-ci sera longue, meilleure sera la résolution. Cependant, dans la pratique la longueur d'un spectromètre est comprise entre 1 et 3 m. Ce n'est généralement pas suffisant pour bien séparer des ions de masses rapprochées, et par conséquent la résolution d'un tel dispositif est limitée à quelques centaines. De plus, le paquet d'ions a initialement une dispersion en position selon l'axe de leur extraction. Ainsi, tous les ions d'un rapport m/z donné arriveront sur le détecteur avec une distribution en temps dont la largeur à mi-hauteur est directement proportionnelle à leur dispersion initiale. Cet aspect tend également à baisser la résolution en masse du dispositif. Ainsi, d'autres configurations de spectromètre permettent de corriger ces points afin d'améliorer la résolution en masse. Nous allons désormais détailler la configuration Wiley-McLaren, qui permet de compenser la position initiale des ions, mais également le réflectron, ou miroir électrostatique.

Configuration Wiley-McLaren

Dans une configuration Wiley-McLaren [64, 65], le spectromètre de masse est divisé en trois parties, comme nous pouvons l'observer sur la figure 2.3.3. Les ions sont initialement dans la première zone, dite d'extraction, avec une dispersion Δz_0 selon l'axe z du spectromètre. Un champ faible \vec{E}_1 les extrait vers la zone d'accélération, où ils seront soumis au champ \vec{E}_2 , d'intensité plus élevée. La séparation des ions selon leur rapport m/z se fait dans la troisième région, la zone de vol libre, où aucun champ électrique n'est appliqué. Les intensités des champs \vec{E}_1 et \vec{E}_2 sont ajustées pour focaliser les ions temporellement sur le détecteur. Ce type de spectromètre permet ainsi de compenser la dispersion initiale Δz_0 des ions et ainsi d'augmenter la résolution ($m/\Delta m = 2000$) par rapport à un simple spectromètre linéaire ($m/\Delta m \simeq 200$).

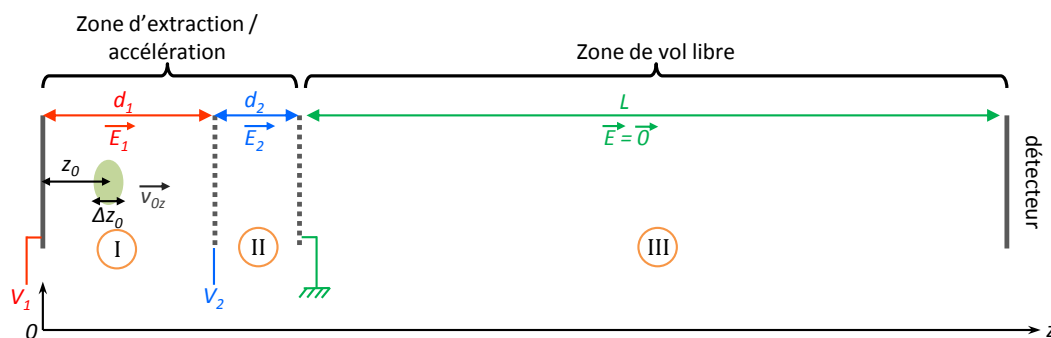


Figure 2.3.3 : Schéma du principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse en configuration Wiley-McLaren. [66]

Réfléctron

Comme nous l'avons déjà mentionné, la séparation des ions est d'autant meilleure que leur parcours en vol libre est long. C'est l'un des buts du spectromètre de masse réflectron [67–70] : il permet d'augmenter le trajet des ions grâce à l'utilisation d'un miroir électrostatique. Comme l'illustre la figure 2.3.4, après leur extraction les ions vont pénétrer dans une zone constituée de lentilles électrostatiques sur lesquelles un gradient de potentiel est appliqué. Ils vont alors être ralentis par le champ électrique, jusqu'à être réfléchis puis dirigés vers le détecteur avec une vitesse identique à leur vitesse après extraction, mais avec une direction opposée. Ainsi, plus les ions sont énergétiques, plus ils iront loin dans le miroir électrostatique. Le réflectron permet ainsi de compenser les variations d'énergies entre des ions d'un même rapport m/z , dues à leur position initiale dans la zone d'extraction, en augmentant ainsi la résolution.

De manière générale, la spectrométrie de masse permet d'étudier une large gamme de masse, des petites molécules aux protéines de plusieurs dizaines de kDa, avec de haut taux d'échantillonnage et une transmission pouvant être proche de 100%. De plus, comme nous allons le voir par la suite, c'est une méthode très fréquemment utilisée pour l'analyse de molécules

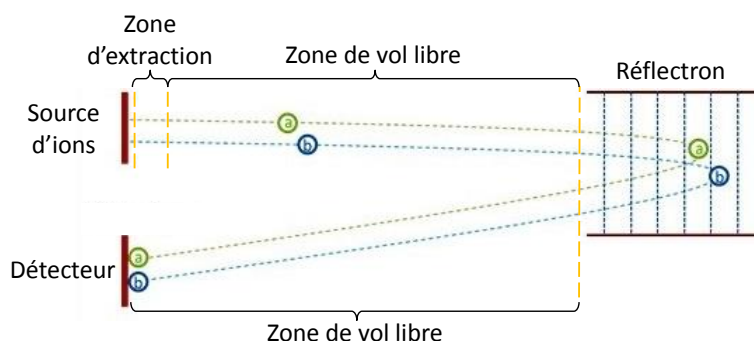


Figure 2.3.4 : Fonctionnement d'un spectromètre de masse réflectron. Les ions a et b, de même rapport masse/charge, sont focalisés sur le détecteur après avoir été réfléchis par le miroir électrostatique [63].

ayant été caractérisées par d'autres techniques, comme par exemple la spectrométrie de mobilité ionique.

2.3.2 Spectrométrie de mobilité ionique

La spectrométrie de mobilité ionique (IMS pour *Ion Mobility Spectrometry*) est une technique d'analyse qui permet de séparer deux ions moléculaires de même rapport masse sur charge, mais de conformations différentes. Plusieurs techniques existent, mais seule celle qui a été utilisée pour ce travail de thèse sera détaillée ici.

Les systèmes d'étude chargés sont injectés dans un tube, dit tube de dérive, rempli de gaz inerte, et où règne un champ électrique constant et homogène. Le temps mis par un ion donné pour traverser le tube est directement lié au nombre de collisions qu'il va subir avec ce gaz, et sa mesure permet de déterminer la mobilité de cet ion. La vitesse v_D de dérive de l'ion à l'intérieur du gaz est alors proportionnelle au champ électrique appliqué selon la relation [71] :

$$v_D = K.E \quad (2.3.4)$$

Le coefficient de proportionnalité K est la mobilité de l'ion et s'exprime en $\text{cm}^2.V^{-1}.s^{-1}$. Ainsi, le temps de dérive de cet ion est inversement proportionnel à v_D , et donc à K .

Cette mobilité ionique peut nous informer sur la structure tridimensionnelle des systèmes moléculaires que nous étudions. En effet, pour deux conformères donnés, de même m/z mais de structures différentes, le plus compact subira moins de collisions sur le gaz et aura donc une vitesse de dérive plus grande que celui dont la structure est étendue. La mobilité ionique est donc directement liée à la section efficace de collision (CCS pour *Collision Cross-Section*). Cette dernière est extraite de la dépendance linéaire du champ électrique sur les temps de dérive d'un ion de charge q et de masse m , selon l'équation de Mason-Schamp [71] :

$$K = \frac{v_D}{E} = \frac{3}{16} \frac{q}{N} \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{M} \right)^{\frac{1}{2}} \left(\frac{2\pi}{k_B T} \right)^{\frac{1}{2}} \frac{1}{\Omega_D} \quad (2.3.5)$$

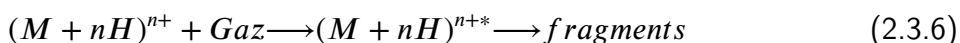
Avec N la densité du gaz, M la masse de ses atomes, k_B la constante de Boltzmann, T la température du gaz, et Ω_D (\AA^2) la CCS des ions.

Ainsi, plus la structure d'un système moléculaire sera dépliée, plus sa CCS sera grande [72]. En comparant les résultats de CCS ainsi obtenus avec des simulations, il est possible d'obtenir des informations structurales sur les systèmes étudiés. C'est par exemple le cas pour les acides nucléiques : V. Gabelica *et co.* ont montré que lorsque l'état de charge d'un système augmente, celui-ci tend à se déplier, jusqu'à sa dénaturation [73]. Ils ont également montré que l'apparition de cette dénaturation est directement lié à la taille du système. De nombreuses études ont également été menées sur les peptides et protéines. Ces travaux ont permis de caractériser l'influence de la répartition des charges sur la stabilité du système [74]. En effet, alors que le feuillet β neutre possède une structure stable, la présence de charges dans le système perturbe cette stabilité, en modifiant la conformation du système. A l'inverse, ces effets d'état de charge peuvent stabiliser d'autres types de structures en phase gazeuse, telles les hélices, qui ne sont pas observées pour des systèmes neutres [74]. De plus, d'autres études ont démontré que le choix de la séquence peptidique [75, 76] et la solvatation du système [77] peuvent accroître l'abondance, et donc la stabilité, de ces systèmes en phase gazeuse. Par ailleurs, comme cette technique permet la conservation de systèmes faiblement liés, il est aussi possible de caractériser des complexes non-covalents [78–82].

2.3.3 Collisions sur gaz neutre

La CID, pour *Collision Induced Dissociation*, est la technique de fragmentation la plus utilisée pour séquencer les protéines et brins d'ADN. En effet, sa facilité de mise en place sur la plupart des dispositifs expérimentaux a permis l'expansion de son utilisation, pour en faire une technique de référence, à laquelle les autres techniques de fragmentation sont souvent comparées.

Le principe de la CID réside dans la fragmentation de molécules par le biais de collisions sur du gaz neutre (habituellement de l'hélium, de l'azote ou de l'argon). De l'énergie est donc déposée dans la molécule, avant d'être redistribuée dans ses états vibrationnels [83]. Si cette énergie d'excitation est supérieure au seuil de dissociation, elle pourra amener la molécule à fragmenter :



Les énergies de collision habituellement utilisées en CID sont soit de l'ordre de 10 à 100 eV par charge ("basse énergie"), soit supérieures à 1 keV ("haute énergie"). A basse énergie, le système moléculaire reste en général dans son état électronique fondamental, alors que ses états excités peuvent être atteints à haute énergie. L'ionisation est même parfois observée. Dans la majorité des cas, l'analyse des produits de la CID se fait par spectrométrie de masse. Concernant la CID de basse énergie de protéines et peptides, à l'inverse des couples de fragments a/x et c/z qui sont peu observés, les couples b/y et les pertes de petites molécules,

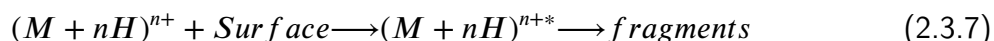
telles que H₂O, NH₃ ou CO, sont majoritaires. De nombreux fragments internes sont également présents lorsque l'énergie déposée augmente. Chen *et co.* ont mesuré la quantité d'énergie de collision transférée en énergie interne dans un dimère de Leucine-Enképhaline, pour une gamme d'énergie comprise entre 50 et 200 eV. Ils ont ainsi montré que l'énergie interne du peptide augmente presque linéairement avec l'énergie de collision, pour une proportion allant de 2 à 5% de celle-ci [84].

Lors de la CID de haute énergie, une collision unique de la molécule sur le gaz suffit à la faire fragmenter. Les spectres de masse obtenus sont plus riches en petits fragments que ceux de la CID de basse énergie, avec notamment l'apparition de la perte partielle ou totale de la chaîne latérale de l'acide aminé située là où la rupture de liaison du squelette peptidique est survenue. La perte partielle de ces chaînes induira l'apparition du couple de fragments d/w en fonction de la localisation de la charge, du côté N ou C-terminal respectivement. Ces pertes de chaînes latérales sont également accompagnées par la fragmentation interne du peptide [85].

Comme expliqué précédemment, la simplicité de mise en œuvre de la CID implique que de nombreuses études ont été réalisées sur des molécules de différentes tailles. Ainsi, Papayanopoulos *et co.* ont décrit l'influence d'une vingtaine d'acides aminés sur la fragmentation de peptides [85]. D'autres travaux utilisent la CID pour étudier la stabilité de peptides [86], leurs voies de fragmentation [87, 88], ou bien pour caractériser des processus, tels que l'effet proline [88]. Dans le cas de complexes non-covalents, ces études ont montré que ces multi-activations provoquent du réarrangement structural et peuvent mener à l'éjection d'une unité élémentaire du système, caractérisée par une structure dépliée, en comparaison à celle qu'elle avait dans le complexe [86, 89].

2.3.4 Collisions sur une surface

La SID (pour *Surface Induced Dissociation*) [90,91] est une technique qui permet de réaliser des collisions inélastiques et énergétiques sur une surface afin d'apporter de l'énergie au sein de molécules, sans les ioniser. Si l'énergie de collision est suffisante, la dissociation de la molécule peut survenir [83] :



La gamme d'énergie d'application de la SID est typiquement comprise entre 1 eV et 10 keV [91]. Entre 1 et 100 eV, les collisions se font dans un régime dit hyperthermal, où l'énergie du centre de masse de la collision est comparable à la valeur de l'énergie d'une liaison chimique (quelques eV). La collision peut alors provoquer des cassures de liaisons. Cette gamme d'énergie est la plus utilisée pour étudier les propriétés structurales. Les collisions réalisées à des énergies supérieures à 100 eV permettent quand à elles des analyses chimiques, comme par exemple l'implémentation ionique ou des analyses par spectrométrie de masse à ionisation secondaire (SIMS pour *secondary ion mass spectrometry*), où la surface de l'échantillon est

bombardée par des ions, et la matière ionisée ainsi pulvérisée est analysée par spectrométrie de masse par temps de vol.

Cette technique a été utilisée sur plusieurs peptides, tels la Leucine-Enképhaline [92]. A l'inverse de la CID, le temps d'activation d'une molécule par cette méthode est très court, ce qui permet d'apporter rapidement une haute énergie interne au système et d'atteindre des niveaux d'énergie plus élevés qu'en CID. Cette technique induit également une répartition des charges symétriques entre les fragments, mais ces derniers présentent une plus grande diversité dans le cas de la CID. Concernant les complexes non covalents, telle que la Vancomycine et son récepteur [93], Z. Yang *et co.* ont montré que la voie de dissociation majoritaire s'exprime par la séparation de la vancomycine et de son récepteur. Ils ont également mis en avant la faible proportion de fragments résultant de ce processus, en comparaison à la perte du récepteur. Par ailleurs, R. Beardsley *et co.* ont comparé SID et CID pour des tétramères et des pentamères de plusieurs protéines, telle l'hémoglobine (32 kDa) [89]. Ils ont remarqué que les voies de dissociation des deux techniques sont très différentes. Pour la CID, l'éjection d'un monomère dont la distribution d'états de charges est très restreinte est majoritairement observée, et son complexe associé (un trimère et un tétramère, respectivement) est également détecté intact. Après SID, les monomères sont présents sur une large distribution d'états de charges. Par ailleurs, même si leurs intensités respectives demeurent petites en comparaison des monomères, les dimères et trimères sont également observables après SID, toujours pour des états de charges étendus.

2.3.5 Collisions hors résonance

La technique de spectrométrie SORI-CID (pour *Sustained Off-Resonance Irradiation - Collision Induced Dissociation*), similaire à la CID, est principalement utilisée dans les dispositifs expérimentaux tels que les spectromètres de masse FT-ICR. Les collisions des ions moléculaires sur du gaz neutre sont réalisées dans une cellule où les ions sont soumis à une onde RF dont la fréquence est légèrement décalée de leur fréquence cyclotronique. Du gaz est injecté dans la cellule pour que les molécules réalisent de nombreuses collisions de faible énergie (quelques eV par charge). Cette technique s'avère efficace autant pour les petites molécules ($m/z < 200$) [94] que pour des biomolécules de taille plus importante ($m/z \sim 5000$) [95], et présente plusieurs avantages non négligeables par rapport à la CID [96].

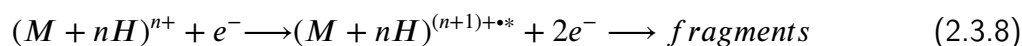
Même si les voies de dissociation observées après SORI-CID sont proches de celles observées après SID ou CID, certaines différences sont malgré tout présentes. J. Laskin *et co.* ont comparé cette technique à la SID sur des peptides de plusieurs états de charges. Ils ont montré qu'après SORI-CID, les principales voies de dissociation sont la perte de petites molécules, principalement la perte de CO_2 du C-terminal mais également des pertes de NH_3 , ainsi que la création de fragments de type a provenant de cassures de liaisons du squelette peptidique. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus après SID, cependant certaines voies de dissociation sont totalement absentes en SORI-CID. Il est également intéressant de noter que les pertes

de NH_3 n'ont pas été observées après CID dans un piège sur ces mêmes peptides. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que lorsque l'activation d'un système moléculaire se fait lentement, seuls les processus de plus basse énergie peuvent être sondés, contrairement aux activations plus rapides qui permettent d'apporter directement de l'énergie dans les niveaux plus élevés, comme lors de la SID [97]. Ces observations sont appuyées par d'autres études, menées sur le Cytochrome C, pour de hauts états de charge (12 et 21+). Les résultats ont également montré des similitudes avec des données obtenues après CID dans un piège [98].

Ces différentes techniques permettent une large caractérisation des systèmes moléculaires par le biais de collisions sur surface ou gaz neutre. Cependant, d'autres techniques utilisent des électrons comme projectiles afin d'obtenir une analyse complémentaire de la structure et de la stabilité du système. Différents processus peuvent se produire, impliquant des électrons du système, allant de la capture à l'ionisation, en passant par le transfert depuis un autre système moléculaire.

2.3.6 Ionisation par impact d'électron

L'ionisation par impact d'électron (EII pour *Electron Impact Ionisation*) est un processus induit par des électrons ayant une énergie cinétique supérieure au seuil d'ionisation du système moléculaire étudié, pouvant ainsi lui arracher un électron du cortège électronique, et induire sa fragmentation si l'énergie résiduelle est suffisante :



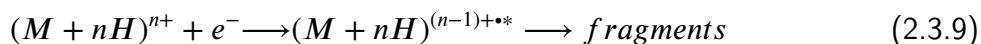
Plusieurs études ont été menées sur les bases nucléiques, comme l'Adénine, la Guanine ou la Thymine [99–102], mais également sur différents acides aminés [103, 104] ainsi que sur des peptides et protéines de différentes tailles, comme la Leucine-Enképhaline [105], la Substance P [105, 106] ou l'Ubiquitine [107]. En ajustant finement l'énergie cinétique des électrons, ces études permettent de déterminer l'énergie d'ionisation d'un système moléculaire donné [106], mais aussi de cibler les électrons d'une orbitale particulière, par exemple la 1s d'un atome de carbone de la molécule cible à 288 eV. Celle-ci subira alors une désexcitation Auger [107]. De plus, les principales voies de fragmentation après EII (~ 20 eV) sont la perte de molécules neutres issues des chaînes latérales et la production de fragments a/x et c/z provenant de ruptures du squelette peptidique [103, 108].

Dans le cas où les électrons ont une énergie cinétique inférieure à l'énergie d'ionisation de la cible, ils peuvent être capturés par cette dernière, ce qui peut induire sa dissociation, comme nous allons le voir.

2.3.7 Dissociation par capture d'électron

L'ECD (pour *Electron-capture dissociation*) est une méthode de dissociation de molécules multi-chargées positivement par la capture d'un électron libre d'une énergie comprise entre

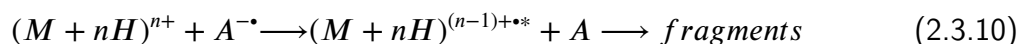
0.1 et 10 eV [83]. Après ce processus, dont l'efficacité augmente avec l'état de charge de la molécule cible [109, 110], cette dernière se trouve dans un état excité, pouvant amener à sa fragmentation :



Concernant les oligonucléotides (brins d'ADN ou d'ARN composés de plusieurs nucléotides), cette technique peut induire la perte de nucléobases neutres [111, 112]. Concernant les peptides, l'ECD peut provoquer la perte complète ou partielle de chaînes latérales neutres [113, 114], ainsi que des pertes de proton et de molécules H₂O et NH₃. Par ailleurs, les couples de fragments c/z produits par rupture de la liaison N-C_α sont fréquemment observés [109, 110, 114], mais dépendent de la taille du système. Ils ne sont ainsi pas observés pour de petits peptides (~5 acides aminés) [115]. Deux mécanismes différents ont été proposés pour expliquer leur provenance lors de l'ECD [109, 116]. Dans celui de Cornell, la capture d'électron se fait sur un des sites chargés positivement, typiquement le groupe amine du N-terminal, ou une chaîne latérale d'un des acides aminés basiques (Lysine, Arginine et Histidine), alors que le second mécanisme propose que l'électron soit capturé par l'orbitale π* anti-liante d'un des groupes amides du squelette. La capture de l'électron est suivie par un transfert d'un hydrogène ou d'un proton depuis un site avoisinant, créant majoritairement ces couples de fragments c/z. D'autres études démontrent que l'ECD induit la cassure de liaisons covalentes en laissant intactes les liaisons non covalentes [117, 118]. Ainsi, de par les sites de rupture qu'elle induit, différents de ceux produits par CID, l'ECD est une technique complémentaire, dont l'analyse des fragments par spectrométrie de masse permet le séquençage de protéines [119].

2.3.8 Dissociation par transfert d'électron

L'ETD (pour *Electron-Transfer Dissociation*) est une méthode de dissociation proche de l'ECD, à la différence que les électrons capturés ne sont pas initialement libres, mais proviennent d'un réactif chimique chargé négativement :



Le choix du réactif chimique doit donc être fait précautionneusement. En effet, en fonction de l'espèce choisie, le transfert d'électron de l'anion vers la molécule protonée est directement en concurrence avec le transfert de proton de la molécule vers l'anion [110]. Ainsi, de nombreux travaux ont été menés pour trouver les réactifs les plus efficaces pour le transfert d'électron. H. Gunawardena *et co.* ont réalisé une étude sur plusieurs réactifs, et ont montré que certains favorisent le transfert de proton vis-à-vis du transfert d'électron, et inversement [120]. Finalement, même si certains anions comme l'antracène [110], le nitrobenzène [121], ou la molécule de SO₂ [122] sont fréquemment utilisés, les expériences d'ETD privilégient l'utilisation de fluoranthène comme réactif, avec une efficacité de transfert d'électron mesurée à 40% [110, 120, 123].

J.Liu *et co.* ont également étudié l'influence de l'état de charge de la molécule protonée sur l'efficacité du processus d'ETD [124]. Ils ont montré que lorsque l'état de charge d'un peptide donné augmente, il existe un optimum favorisant le transfert d'électron et minimisant le transfert de proton du peptide vers l'anion. Cet optimum dépend, entre autres, de la masse du système et de l'affinité électronique du réactif chimique.

Les voies de fragmentation induites par ETD sont très similaires à celles observées après ECD, avec notamment la création des fragments c et z après rupture de liaisons N-C_α du squelette peptidique [125–127]. Cependant, des différences sont tout de même notables entre ces deux techniques [109, 128]. L'ECD aura tendance à produire plus de fragments dont la charge sera largement réduite par rapport au système initial, ainsi que des pertes de molécules neutres plus importantes. De plus, en comparaison à l'ETD, l'ECD favorise la production de fragments de plus hauts rapports m/z.

Finalement, ces deux techniques sont très adaptées à l'étude de la séquence de protéines, car elles produisent généralement une fragmentation plus fournie que des techniques d'activation lente, comme la CID ou l'absorption de photons infra-rouges, comme nous allons le voir par la suite.

2.3.9 Irradiation par faisceaux de photons

L'irradiation de molécules par photons permet un dépôt d'énergie contrôlé à l'intérieur du système, à condition de connaître le nombre de photons absorbés. De plus, cette énergie peut varier considérablement de par la large gamme de longueur d'onde que ce photon peut avoir [83, 129]. Comme nous pouvons le voir sur la figure 2.3.5 [66], la photo-absorption permet d'exciter les systèmes moléculaires grâce aux rayonnements allant des micro-ondes aux rayons-X. Le photon absorbé porte alors la molécule dans un état rotationnel, vibrationnel et/ou électronique excité. Grâce à l'utilisation des faisceaux produits par des synchrotrons, il est aussi possible d'induire l'ionisation en couche de valence d'un système moléculaire avec l'absorption d'un photon VUV, et en couche interne avec un photon X. Ces différents rayonnements sont en mesure de nous fournir des informations sur la structure géométrique du système, dans le cas des basses énergies (micro-ondes, IR), mais également sur les propriétés électroniques et la stabilité du système vis-à-vis de l'ionisation pour les plus hautes énergies (UV à X).

2.3.9.1 Infra rouges

Les niveaux d'énergie vibrationnels d'une molécule sont espacés par une différence d'énergie typiquement de l'ordre de 0.1 eV. Ainsi, après absorption par une molécule d'un photon infra rouge (IR), dont la gamme d'énergie est comprise entre 0.01 eV pour les IR lointains et 1.5 eV pour les IR proches, celle-ci sera excitée vibrationnellement. De même que la CID, l'IRMPD (*InfraRed MultiPhoton Dissociation*) est une méthode de fragmentation qui permet, en chauffant lentement la molécule, de redistribuer l'énergie des photons de manière statistique

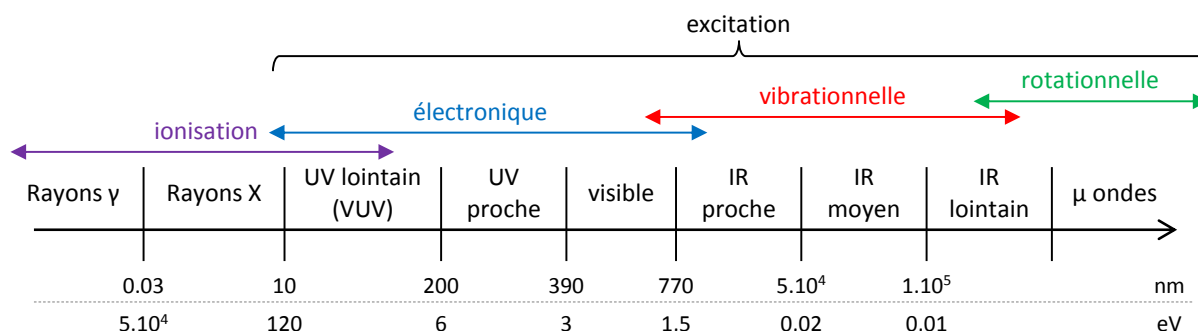


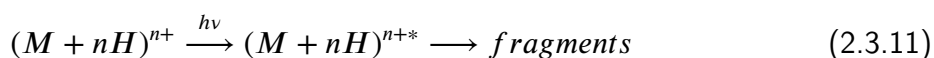
Figure 2.3.5 : *Domaine spectral des photons utilisés pour les différentes techniques de spectroscopie induisant l'activation ou la dissociation du système moléculaire. La correspondance entre la longueur d'onde et l'énergie des photons est donnée en dessous.*

selon les modes de vibration de la molécule. Elle est beaucoup utilisée pour la spectrométrie de masse d'analyse structurale de molécules car contrairement à la CID ou la SID, elle permet d'obtenir de nombreux fragments de petite masse [130, 131]. L'IRMPD est également facile à implémenter sur un dispositif, et le fait de ne pas nécessiter de gaz permet également de conserver une bonne résolution en masse lors de l'analyse. Cette technique s'applique pour la caractérisation de peptides [132] ou de petites protéines [133], où elle induit majoritairement des ruptures de liaisons peptidiques créant les fragments de types b et y [134].

Les voies de dissociation de peptides suite à leur excitation par CID de basse énergie ou par IRMPD s'explique par le modèle du *proton mobile* [135]. Celui-ci énonce que sur un peptide protoné, les transferts de protons sont responsables de la formation des fragments b et y. Initialement, les protons sont situés sur les sites de plus grande affinité protonique (N-terminal, Lysine, ...). L'apport en énergie prodigué par l'absorption d'un ou plusieurs photons IR permet à ces protons de pouvoir se déplacer vers d'autres sites, énergétiquement moins favorables, comme par exemple ceux induisant des ruptures de liaisons peptidique. Nous allons désormais voir que des photons plus énergétiques peuvent ouvrir d'autres voies de fragmentation.

2.3.9.2 Ultraviolet

L'énergie d'un photon Ultra Violet (UV) correspond approximativement à l'énergie des liaisons covalentes. L'absorption d'un unique photon par le chromophore d'une molécule induira l'excitation d'un électron d'une orbitale moléculaire. L'excitation des électrons peut être suivie par la dissociation du système, comme par exemple dans le cas d'une molécule protonée :



Des études ont montré que les nucléobases absorbent les photons UV autour de 263 nm (4.7 eV), les portant de leur état fondamental à un état excité [136]. Si une conversion interne

vers l'état fondamental se produit, l'énergie résiduelle peut être redistribuée dans les modes de vibration de la molécule, ce qui peut engendrer sa fragmentation. Il peut aussi se produire une dissociation dans l'état excité à une échelle de temps de l'ordre de 100 fs.

Concernant les acides aminés, une forte absorption se produit dans la gamme [260 - 280] nm par ceux qui possèdent une chaîne latérale aromatique, c'est-à-dire l'histidine, la phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine [137].

Pour les peptides protonés, deux cas sont à considérer, si la longueur d'onde est comprise entre 240 et 280 nm ou si elle est inférieure à 240 nm. Tout d'abord, dans la gamme [240 - 280] nm, l'excitation du peptide se fera localement par absorption du photon par un chromophore des chaînes latérales aromatiques des acides aminés [138]. La fragmentation à ces longueurs d'onde se fera aux abords de ces derniers, formant majoritairement des fragments de type b et y par cassure des liaisons peptidique [139, 140].

Lorsque la longueur d'onde du photon est inférieure à 240 nm, les électrons du squelette peptidique absorbent majoritairement, et la création de fragments a, b, c, x, y et z est provoquée par rupture de liaisons sur l'ensemble du squelette peptidique [141–143] suite à la répartition de l'énergie du photon dans les modes de vibrations.

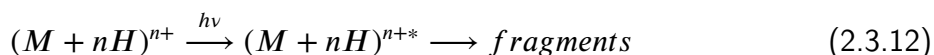
Des études ont également montré que pour les peptides protonés contenant des prolines, les fragments les plus intenses après photo-absorption correspondent à des dissociations du côté N-terminal de ces prolines [135, 144]. Ils sont également accompagnés de fragments internes produits par rupture de liaisons peptidique proches des prolines [145]. Cet effet est souvent attribué à la haute affinité protonique des prolines, mais T. Vaisar et J. Urban [88] ont démontré que la structure des prolines, proche de celle d'un oxazolone protoné et non d'un ion acylium, était favorable à la création des fragments y du côté de leur N-terminal au détriment des fragments b. L'affinité protonique ne jouerait alors qu'un rôle secondaire dans le mécanisme de rupture, expliquant uniquement l'abondance de ces fragments y.

L'absorption d'un photon UV par les chromophores des chaînes latérales des acides aminés permet donc de sonder les états excités de la molécule. Afin de caractériser les propriétés des couches électroniques plus profondes, ainsi que le comportement des molécules après ionisation, il est nécessaire d'utiliser des photons de plus faible longueur d'onde, tels les photons VUV ou X.

2.3.9.3 Vacuum Ultraviolet

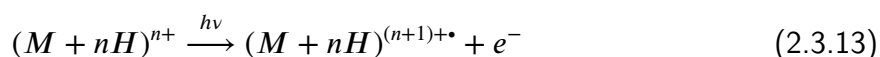
Les photons VUV (*Vacuum UV*) possèdent des énergies comprises entre 6 et 120 eV. La réponse des systèmes moléculaires sera donc très différente de celle obtenue avec d'autres processus, comme la CID, la SID ou l'IRMPD. Les photons vont principalement cibler les couches de valence, induisant une excitation électronique si l'énergie du photon correspond à une transition. Un électron pourra même être libéré si elle est supérieure au seuil d'ionisation, laissant ainsi la molécule dans un état radicalaire. L'absorption d'un photon VUV par une molécule permet donc d'étudier ses propriétés électroniques, ainsi que sa stabilité lorsqu'un de ses électrons de valence se trouve éjecté du cortège.

Dans le cas où l'énergie des photons VUV est inférieure à l'énergie de seuil d'ionisation (SI) d'un peptide protoné, il a été montré que le spectre de masse après photo-absorption, par exemple de 157 nm [143, 146], est similaire à celui observé après absorption de photons UV de 193 nm [92, 147–150]. S.Bari *et co* [151] ont mis en évidence qu'après photo-absorption les peptides protonés sont portés dans un état électronique excité par le biais de transitions de valence, pouvant amener à leur dissociation :

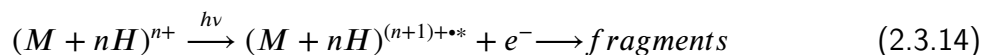


L'absorption se fait principalement au niveau des liaisons peptidiques avec possibilité de transfert de charge d'un électron d'une orbitale π d'une liaison peptidique vers une orbitale π^* d'une liaison adjacente [152]. Cette absorption peut ensuite être suivie par plusieurs processus, comme la désexcitation radiative ou la redistribution de l'énergie dans les modes de vibration intramoléculaires (IVR), induisant la création de fragments de types a, b et y, ou la perte de molécules neutres provenant principalement des chaînes latérales [153–157]. Concernant ces dernières, nous pouvons constater qu'elles représentent la contribution la plus importante de la dissociation de la molécule. Ce processus a été attribué à une dissociation rapide avant IVR [154, 156, 158]. Par ailleurs, une de nos récentes études a montré que des processus radicalaires étaient à l'origine de ces pertes [159].

Lorsque l'énergie du photon absorbé est égale au SI de la molécule, l'énergie apportée dans le système est suffisante pour libérer un électron de l'orbitale moléculaire la plus haute (*HOMO* pour *Highest Occupied Molecular Orbital*), en ne laissant que peu d'énergie d'excitation dans le peptide ionisé radicalaire [153, 156] :



En augmentant encore l'énergie du photon au delà du SI, les électrons des orbitales moléculaires plus profondes deviennent accessibles à l'ionisation, et la quantité d'énergie interne transférée peut augmenter. Cependant, il se peut également que des électrons de ces orbitales soient excités sans amener le système à l'ionisation. Dans ce cas, l'énergie interne serait très élevée. Comme précédemment, l'énergie d'excitation peut être redistribuée dans les modes de vibration intramoléculaire, mais au delà d'un certain seuil, l'énergie interne peut induire la dissociation du système après IVR [151] :



Plusieurs types de fragments peuvent être produits, avec d'une part la perte de molécules neutres des chaînes latérales, mais également des fragments provenant du squelette peptidique, après rupture du côté N- ou C-terminal, tels que les b/y et c/z [160]. En augmentant l'énergie du photon absorbé, la probabilité d'ionisation va s'accroître jusqu'à atteindre un maximum, puis diminuer progressivement [153]. C'est le cas par exemple pour le peptide protoné de Substance

P dont le seuil d'ionisation a été mesuré à 10.3 eV : elle atteint son maximum autour de 16 eV avant de décroître [153].

A. Giuliani *et co.* ont montré dans le cas de plusieurs protéines que l'énergie du SI augmente presque linéairement avec l'état de charge du système [161]. Ceci peut s'expliquer par l'augmentation du potentiel coulombien exercé par le cation sur l'électron émis. Ils ont également montré que dans le cas de systèmes plus complexes, tel que le Cytochrome C, l'augmentation de l'état de charge tend à déplier la structure, diminuant ainsi le potentiel coulombien du système [162]. En effet, le peptide chargé 4+ est replié, il change de conformation pour des états de charge intermédiaires (5 à 8+), et possède une structure étendue pour un état de charge supérieur ou égal à 8+. Son dépliement induit une baisse de l'énergie coulombienne, et l'augmentation en énergie de son SI entre deux états de charge est plus faible que pour des systèmes plus petits et de structure rigide.

L'influence de la taille des systèmes moléculaires sur les processus induits par photon-absorption VUV a également été caractérisée [154, 156, 158]. O. Gonzalez-Magaña *et co.* ont étudié l'irradiation d'un peptide synthétique composé de trois acides aminés : YG_nF, où le nombre n ($n = 0, 1, 2, 3, 5$ ou 10) correspond au nombre de Glycine séparant la Tyrosine de la Phénylalanine [158]. Ils ont montré que le photon est principalement absorbé par les orbitales non liantes de la partie G_n centrale du peptide, et que lorsque n est compris entre 0 et 5, une rapide migration de charge se produit depuis l'un des deux acides aminés terminaux. Les fragments observés sont principalement des cations provenant de leurs chaînes latérales aromatiques. Cependant pour $n = 10$, la taille du peptide implique que les trous induits par la photoionisation des Glycines ne sont plus comblés par les migrations de charges. Ainsi, les fragments cationiques diminuent fortement au profit de grands dications et de fragments provenant de rupture du squelette.

Comme nous allons maintenant le voir, le fait d'augmenter l'énergie du photon jusqu'aux valeurs d'énergies des rayons-X permet de cibler précisément le site d'absorption.

2.3.9.4 Rayons-X

La gamme d'énergie des rayons-X s'étend de la centaine d'eV à environ 50 keV. Contrairement au cas des photons VUV, où l'absorption se fait principalement sur les électrons des orbitales de valence, cette gamme d'énergie permet de cibler l'absorption sur les électrons des couches internes des atomes, notamment le carbone, l'azote et l'oxygène. Le tableau 2.3.1 [66] précise les énergies correspondant aux transitions électroniques de ces atomes. Par exemple, avec une énergie de 288.2 eV le photon X cible l'orbitale 1s de l'atome de carbone et l'électron sera porté vers une orbitale moléculaire non occupée $\pi^*(C=O)$. Et pour une énergie de photon autour de 300 eV, l'électron ciblé sera cette fois expulsé de l'orbitale 1s vers le continuum.

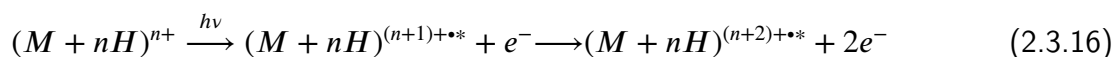
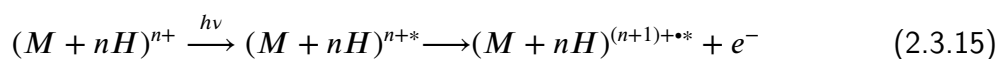
Ces valeurs d'énergies ont été obtenues à l'aide de spectres NEXAFS (*Near Edge X-ray Absorption Fine Structure*), par identification des transitions électroniques résonnantes entre des orbitales atomiques et des orbitales moléculaires [163]. Y. Zubavichus *et co.* ont mesuré

Atome	Transition électronique	Acides aminés	Energie (eV)
C	1s → π^* (amide)	tous	288,2
	1s → continuum	tous	300
N	1s → π^* (amide)	tous	401
	1s → σ^* (C-N)	tous	406
	1s → σ^* (C-N)	Pro, Hyp	409,6
	1s → continuum	tous	412
O	1s → π^* (amide)	tous	532
	1s → σ^* (C-OH)	Ser, Thr, Hyp	538
	1s → σ^* (C=O)	tous	545
	1s → continuum	tous	548

Table 2.3.1 : Tableau récapitulatif des énergies de photons utilisées pour cibler la photo-absorption des couches internes 1s des atomes de carbone, d'azote et d'oxygène. Les transitions électroniques induites par photo-absorption et les acides aminés correspondants sont également indiqués.

les structures fines pour le carbone, l'azote et l'oxygène pour les bases nucléiques en phase condensée [164], mais également pour 22 acides aminés, y compris l'hydroxyproline [165]. Ils ont également poursuivi leurs études en s'intéressant à des protéines de différentes tailles, dont une triple hélice de collagène de type I de 300 kDa. Ils ont montré que les spectres NEXAFS de protéines sont des combinaisons des spectres NEXAFS des acides aminés qui les composent [166, 167], ce qui indique que la structure 3D d'une protéine a peu d'influence sur les énergies de transition et de liaison des électrons des orbitales 1s.

Après absorption d'un photon X, la molécule est dans un état hautement excité et va subir un réarrangement du cortège électronique par processus Auger [168–170]. Ce processus de désexcitation de la molécule se produit sur une échelle de temps de l'ordre de la femtoseconde [171]. Comme l'illustre la figure 2.3.6 [66], deux cas sont à distinguer. Tout d'abord celui de la photo-excitation d'un électron de l'orbitale atomique 1s, d'énergie de liaison E_1 , qui se trouve porté vers une orbitale non occupée. Elle sera suivie par l'ionisation simple de la molécule lors de la désexcitation Auger : un électron d'une couche plus élevée, d'énergie de liaison E_2 , viendra combler la lacune produite dans l'orbitale 1s, et un autre électron d'énergie de liaison E_3 sera éjecté vers le continuum (relation 2.3.15) avec une énergie cinétique égale à $E_2 + E_3 - E_1$. Dans le second cas, la photo-ionisation, l'énergie du photon est supérieure à l'énergie de liaison E_1 de l'électron de la couche 1s, celui-ci est alors éjecté vers le continuum. Un second électron sera également éjecté lors de la désexcitation Auger, ce qui induit ainsi une double ionisation [129] (relation 2.3.16). Dans les deux cas, s'il reste suffisamment d'énergie dans le système après désexcitation Auger, la molécule peut fragmenter.



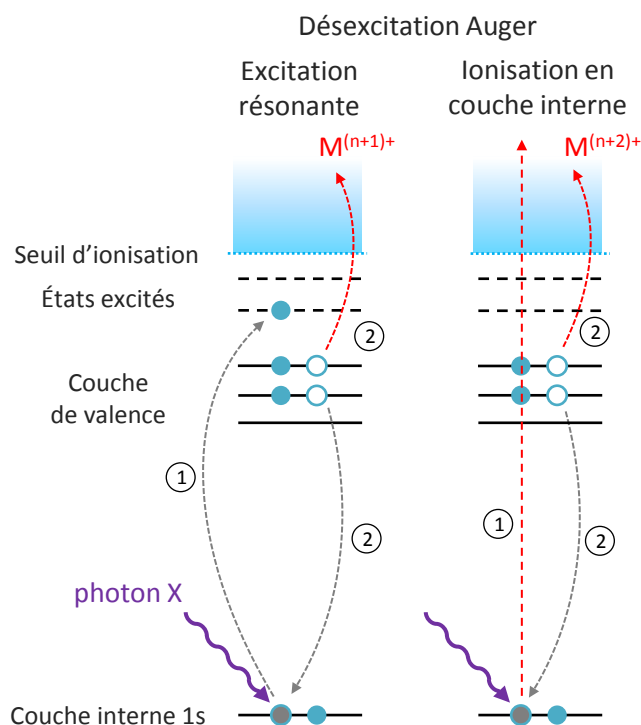


Figure 2.3.6 : Schématisation du processus de désexcitation Auger dans le cas de la photo-excitation de l'électron situé en couche interne 1s (gauche) et dans le cas de la photo-ionisation de la molécule (droite). Après absorption d'un photon, l'électron de l'orbitale 1s est soit porté vers un état excité, soit vers le continuum (étape 1). Dans les deux cas, lors de l'étape 2, un électron d'une couche de valence vient combler la lacune en 1s et un second électron est émis vers le continuum.

Des études d'irradiation en phase gazeuse par rayons-X ont été menées sur de nombreux acides aminés, comme la méthionine [172], ainsi que la glycine [168], l'alanine et la proline [173, 174]. Elles ont permis de montrer que les systèmes moléculaires de la taille d'un acide aminé fragmentent après absorption d'un photon X. Ces fragments sont de petite taille et la molécule ionisée intacte n'est pas observée.

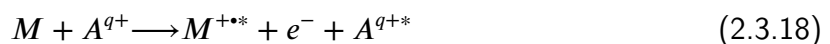
Plus récemment, ces observations ont été appuyées par une étude menée par D. Egorov *et co.*, réalisée sur 8 peptides et protéines de tailles différentes, de la Leucine-Enképhaline (555 Da) au Cytochrome C (12.4 kDa), afin d'étudier l'influence de la taille du système irradié au seuil d'absorption du carbone sur ses voies de désexcitation ou de fragmentation [175]. De la même manière que pour les acides aminés, la photo-absorption X par des petits peptides induit la production de fragments de petites masses et leur ionisation non-dissociative n'est pas observée. Pour les systèmes de taille intermédiaire, comme la Gramicidine (1.9 kDa) ou la Melittine (2.8 kDa), les fragments internes sont toujours présents majoritairement, mais sont accompagnés de la molécule ionisée intacte ainsi que de fragments provenant d'une seule cassure de liaison du squelette peptidique. Finalement, pour les protéines de taille plus conséquente, seules subsistent les ionisations simple et double non dissociatives. Ces évolutions, directement

liées à la taille du système, sont expliquées par le fait que les protéines les plus grosses possèdent plus de degrés de liberté vibrationnels que les petits peptides, permettant une plus grande redistribution de l'énergie résiduelle après simple ou double ionisation. Ceci est donc cohérent avec une fragmentation dans l'état fondamental, après redistribution de l'énergie électronique en énergie vibrationnelle.

Finalement, avec les photons, nous avons pu observer les processus d'excitation et d'ionisation. Nous allons désormais voir que dans le cas d'irradiation par des ions, ces mêmes processus sont accompagnés d'un troisième, la capture électronique, propre à ces projectiles.

2.3.10 Irradiation par faisceaux d'ions atomiques

Lors de l'irradiation d'atomes ou de molécules par des ions atomiques, différents processus interviennent en fonction de la nature de la cible, de l'état de charge et de la vitesse du projectile. Ainsi, pour ces interactions, la vitesse du projectile s'exprime en unités atomiques, où $1 \text{ ua} = 2.19 \times 10^6 \text{ m.s}^{-1}$ et correspond à la vitesse de l'électron (v_e) de l'atome d'hydrogène dans son état fondamental. En comparant la vitesse du projectile à celle des électrons de la cible, il est possible de déterminer les processus attendus lors de l'interaction. Comme nous pouvons le voir sur la figure 2.3.7a, trois processus sont possibles pour les électrons de la cible : la capture, l'excitation et l'ionisation. Ainsi, pour $v_p \gg v_e$, avec v_p la vitesse du projectile, l'excitation (équation 2.3.17) et l'ionisation (équation 2.3.18) de la cible moléculaire neutre (M) sont majoritaires [176, 177] :

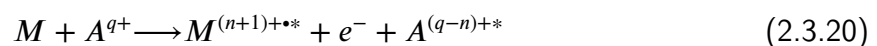


Le projectile va alors directement interagir avec un des électrons de la cible, en le portant dans un état électronique excité, ou en l'arrachant du cortège électronique. A l'inverse, lorsque $v_p \ll v_e$, l'interaction entre l'ion atomique et les électrons de la cible est suffisamment longue pour induire la capture électronique de la cible vers le projectile [177, 178] :



Comme l'illustre la figure 2.3.7b, qui décrit le modèle de la barrière coulombienne, le transfert d'un électron de la cible vers le projectile ne peut se faire que pour des distances R plus petites que celle pour laquelle l'énergie de liaison de l'électron est égale au potentiel U qui les sépare. Cet électron peut alors être capturé s'il est dans une orbitale qui correspond à un état résonnant avec un état excité de l'ion projectile.

Dans le cas intermédiaire où $v_p \simeq v_e$ (1 ua), l'ionisation de la cible ainsi que la capture et l'excitation de ses électrons peuvent être observés conjointement [179] :



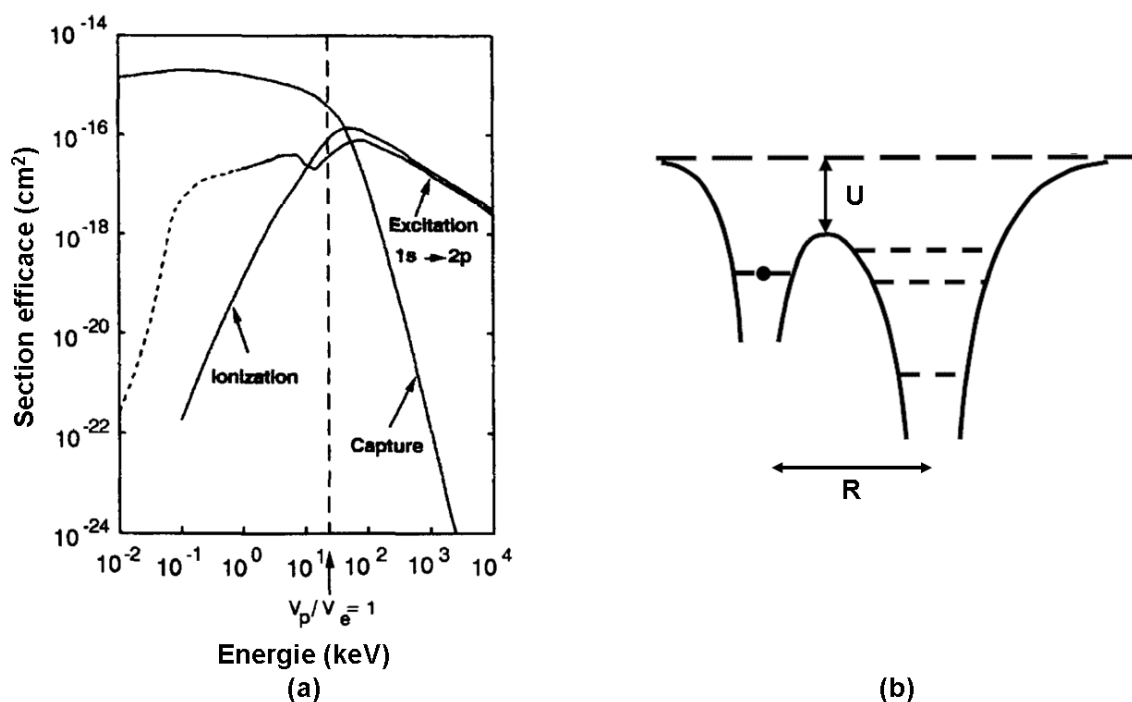


Figure 2.3.7 : (a) : sections efficaces des processus de capture électronique, d'excitation et d'ionisation en fonction de l'énergie du projectile, dans le cas d'une interaction entre un ion H^+ et une cible d'hydrogène [176]. (b) : schéma de principe de la capture électronique par le modèle de la barrière coulombienne, avec le puits de potentiel de la cible à gauche, séparé d'une distance R et d'un potentiel U de celui de l'ion projectile, à droite.

Comme nous l'avons montré dans le cas du modèle de la barrière coulombienne, il est également important de prendre le paramètre d'impact en compte pour déterminer quel processus sera prédominant entre l'ionisation et la capture électronique. Le paramètre d'impact correspond à la distance minimum d'interaction entre l'ion atomique projectile et la cible. Ainsi, lors des interactions à grand paramètre d'impact, la capture électronique sera favorisée, alors que pour les petits paramètres d'impact, l'ionisation sera prédominante, suite aux collisions du projectile sur les électrons [180]. Dans les deux cas la molécule sera dans un état excité après l'interaction. Il est également important de noter que tous les processus que nous venons d'énumérer peuvent être suivis par la fragmentation de la molécule cible.

Les études d'irradiation de molécules par des ions atomiques concernent principalement des cibles neutres produites thermiquement [181], mais le développement de techniques expérimentales comme les sources d'ions à électronébulisation, ont permis de réaliser des irradiations de molécules protonées en phase gazeuse sélectionnées en masse [182–184]. Des dispositifs expérimentaux consistent à mesurer en coïncidences les produits de l'interaction entre cible et projectile [185–189], permettant alors d'obtenir des informations sur l'état de charge de la cible avant sa fragmentation. De plus, la mesure de l'état de charge du projectile après l'interaction [177, 190–192], et celle du nombre d'électrons éjectés par la molécule [186, 187, 190]

permettent de déterminer quel processus entre l'ionisation et la capture électronique est survenu pendant l'interaction. La mesure de l'énergie d'excitation transférée à la cible peut également être obtenue en mesurant l'énergie cinétique perdue par le projectile lors de l'interaction [193, 194]. En parallèle des mesures expérimentales, des calculs de chimie quantique *ab-initio* s'avèrent être utiles à la compréhension des processus physiques qui entrent en jeu lors des irradiations [185, 195–197].

R. Brédy *et co.* ont montré que pour un projectile donné (Fe^{2+} dans leur cas), une irradiation à haute énergie (36 keV) induit la formation de fragments de plus petite taille que ceux observés à basse énergie (6 keV), suite au dépôt d'une plus grande énergie à l'intérieur du système [186, 187]. A. Agnihotri *et co.* ont quant à eux démontré que si la section efficace de capture diminue lorsque l'énergie d'irradiation augmente (*cf.* figure 2.3.7a), cette section efficace augmente avec l'état de charge du projectile [198]. Nous pouvons également mentionner qu'à basse énergie, les ions He^+ provoquent une fragmentation plus intense que d'autres ions projectiles. Ceci peut être expliqué par le fait que les niveaux d'énergie de l'ion He^+ ne sont pas résonants avec les orbitales HOMO de la molécule cible, ce qui est défavorable pour le processus de capture électronique, comme nous l'avons précédemment expliqué avec le modèle de la barrière coulombienne. Le projectile va alors transférer une plus grande énergie d'excitation à la molécule [182, 183, 188, 189, 194]. Cette multifragmentation se produit pour les petits paramètres d'impact et favorise l'apparition de fragments de petite masse. Ceci s'explique par un dépôt d'énergie plus important dans la cible dans ces conditions.

Les nucléobases ont été étudiées de nombreuses fois sous irradiation par de multiples projectiles et pour une vaste gamme d'énergie [190, 195, 196, 199–202]. T. Schlathölter *et co.* se sont intéressés à l'irradiation de l'Uracile par des ions carbonés avec un état de charge de 1 à 6+ et possédant des vitesses comprises entre 0.1 et 0.6 ua [188]. Ils ont mis en évidence que les spectres de masses obtenus sont similaires à ceux obtenus après photo-absorption et impact d'électrons. J. Tabet *et co.* ont confirmé cette similitude avec l'EII pour d'autres nucléobases [177, 192]. Ces irradiations entraînent la capture d'un électron de la cible par le projectile, laissant la molécule dans un état ionisé intact excité, qui peut être suivie par sa fragmentation, induisant principalement la perte de petites molécules telles que HCN et CNH_2 , comme c'est le cas par exemple pour l'Adénine si l'énergie d'excitation est supérieure à 6 eV environ [193]. Concernant les nucléosides, après leur irradiation la rupture de la liaison entre la base et le sucre est principalement observée [203, 204].

Peu d'acides aminés ont été étudiés sous irradiation. Les études se sont principalement focalisées sur les trois suivants : la Glycine, l'Alanine et la Valine, produits thermiquement en phase gazeuse, donc avec un état de charge neutre. Après irradiation à des énergies de quelques dizaines de keV, ils subissent majoritairement une rupture C- C_α [185, 189, 195], entraînant la perte du groupement COOH neutre, la charge résidant sur le groupe amine. Le processus de multi-ionisation intervient également, permettant alors d'observer la perte du groupement ionisé COOH^+ , suite à la répartition des charges sur l'acide aminé, mais avec une intensité plus faible que la perte du groupement neutre.

L'étude des peptides Leucine-Enképhaline et Substance P sous irradiation par des ions atomiques ont montré des résultats très différents de ceux observés avec d'autres techniques comme la CID, la SID et l'IRMPD. Alors que ces techniques sont caractérisées par des fragments de masse généralement supérieure à 350 Da et que les pertes de chaînes latérales sont peu voire non présentes, l'irradiation par des ions atomiques de quelques keV induit l'apparition de fragments internes, accompagnés des pertes de chaînes latérales des acides aminés [182, 183]. Ces observations, similaires aux processus de photo-absorption et EII, peuvent être expliquées par l'ionisation après irradiation par des ions atomiques. Des ruptures des liaisons peptidiques, induisant la création des fragments b et y, sont également observées, mais avec des intensités beaucoup plus faibles que pour les autres techniques. Il est également intéressant de noter que la taille de la molécule d'étude peut influencer sur les résultats obtenus. En effet, pour les deux peptides que sont la Leucine-Enképhaline et la Substance P, la fragmentation après ionisation domine. De plus, dans le cas de l'irradiation du Cytochrome C par des ions Xe^{8+} à 96 keV, S. Martin *et co.* ont montré que cette protéine, de taille encore plus importante que la substance P, est majoritairement observée de manière intacte après simple et double capture électronique [184]. Ces phénomènes peuvent être expliqués par le fait que la fragmentation se produit après répartition de l'énergie déposée dans les modes de vibration de la molécule : en effet, leur nombre augmente avec la taille de la molécule, et la fragmentation s'en trouve réduite. Lors de cette étude, S. Martin *et co.* ont également observé un phénomène de détachement de proton non dissociatif de la protéine, qu'ils ont attribué à un processus d'interaction coulombienne à longue distance entre le proton et l'ion incident. Ils ont par ailleurs pu mettre en exergue un fort effet de la charge de la molécule cible sur ce processus : pour un état de charge $15+$, la section efficace de cette perte de proton est estimée expérimentalement à 0.8%, alors que pour un état de charge de $19+$, cette section efficace est de 17%.

Les études d'irradiation par ions atomiques pour la caractérisation de systèmes moléculaires sont relativement récentes, notamment pour des énergies de projectiles avoisinant le MeV, mais même si peu d'entre elles ont été réalisées sur les acides aminés ou les peptides en phase gazeuse, le développement de techniques expérimentales, comme la source d'ion à électronébulisation, facilite la mise en place de telles expériences pour des systèmes moléculaires de plus en plus gros.

Ainsi, les différentes techniques que nous avons vu lors de ce chapitre peuvent être utilisées seules ou en combinaison, afin de caractériser des systèmes moléculaires tels que ceux que nous avons décrits dans la partie 2.1, en fonction des propriétés du système que l'on souhaite étudier. Mes travaux de thèse consistent alors à utiliser certaines de ces techniques pour étudier la réponse d'un modèle de la triple hélice du collagène sous irradiation en phase gazeuse.

2.4 Le collagène, de la cellule à la phase gazeuse

2.4.1 La protéine de collagène

Comme nous l'avons vu lors de l'introduction, le cartilage possède une faible teneur en cellules et est principalement composé de longues fibres de collagène. D'un point de vue moléculaire, ces fibres sont de longs filaments de 300 nm de long pour 1,5 nm de diamètre. C'est cette caractéristique qui donne au cartilage ses propriétés mécaniques. Comme nous pouvons le voir sur la figure 2.4.1 de gauche, ces fibres sont composées de nombreuses protéines de collagène dont la masse avoisine les 300 kDa, structurées en triples hélices, elles mêmes composées de 3 chaînes polypeptidiques. Celles-ci sont liées de manière non covalente par des liaisons hydrogènes [205], formant ainsi cette structure particulière. Comme l'illustre la figure 2.4.1 de droite, ces liaisons sont formées entre les groupements amines et carboxyles du squelette peptidique.

Chaque chaîne polypeptidique est formée par la répétition de la séquence d'acides aminés X-Y-G, où G correspond à la glycine, et X et Y, à d'autres acides aminés. La particularité du collagène réside dans le fait que 20% des acides aminés qui le composent sont des prolines, ce qui est très élevé pour une protéine. Par ailleurs, de part sa structure, la proline induit une contrainte qui favorise la formation et la stabilité de la triple hélice. Comme nous l'avons mentionné dans la sous partie 2.1.2, l'hydroxylation d'un acide aminé est une modification post-traductionnelle qui consiste à ajouter un groupe hydroxyle -OH sur celui-ci. Dans le cas du collagène, cette modification peut avoir lieu sur une lysine ou une proline située sur le site Y de la séquence. Cette hydroxylation des prolines est connue pour renforcer la stabilité de la structure en triple hélice du collagène [206]. A l'inverse, certaines mutations mènent au remplacement d'une glycine par un autre acide aminé et peuvent induire une déstabilisation de la structure en triple hélice, pouvant notamment entraîner des lésions cérébrales [207].

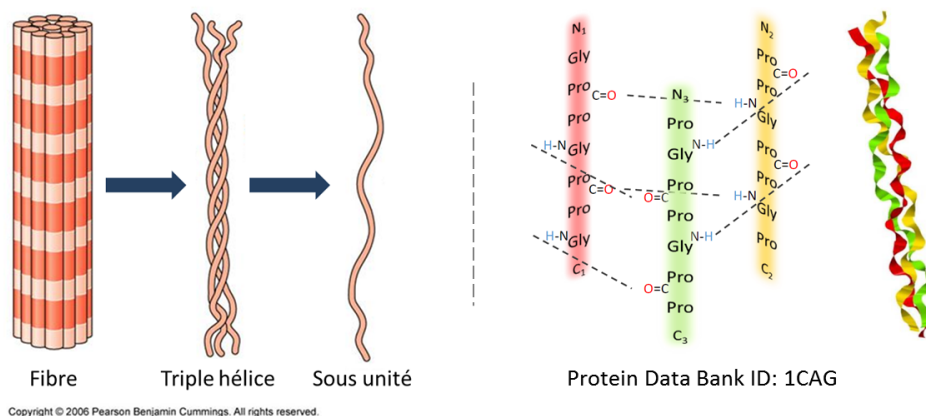


Figure 2.4.1 : A gauche, schéma d'une fibre de collagène. A droite : structure tri-dimensionnelle d'un modèle de triple hélice de collagène dans un cristal [208]. Les liaisons hydrogènes sont marquées en pointillés.

2.4.2 Peptide de collagène et peptide modèle de triple hélice

De nombreux travaux se sont déjà portés sur l'étude du collagène en phase condensée [209, 210]. Les sous unités et les triple hélices de collagène ont également été étudiées en solution sous irradiation UV [211, 212]. Ces études ont mis en avant des ruptures significatives et spécifiques des liaisons peptidiques Gly-Pro. Ces cassures sont également accompagnées du dépliement de la triple hélice et de la dénaturation du collagène. Concernant le peptide hydroxylé, des études ont montré qu'en phase condensée ces hydroxyprolines favorisaient la stabilité de la triple hélice de collagène [213, 214].

A l'inverse, une seule étude a été réalisée sur les peptides de collagène en phase gazeuse à l'échelle moléculaire [215]. Il est cependant intéressant d'étudier l'impact de l'irradiation par des rayonnements ionisants sur le collagène isolé des effets de solvant. Ces expériences permettent en effet de savoir comment le système se relaxe lorsqu'il est soumis à une perturbation induite par différents types de rayonnements, mais également de déterminer s'il existe des sites de rupture préférentiels le long du squelette peptidique, ou si l'hydroxylation des prolines en phase gazeuse permet de stabiliser le peptide, comme pour la phase condensée.

Pour répondre à ces questions, nous avons choisi d'étudier la séquence peptidique [423-448] du collagène de type I. Ce peptide, que nous nommerons PK26-P, est composé de 26 acides aminés. Nous avons étudié ses voies de relaxation après absorption d'un photon unique VUV ou RX, pour une gamme d'énergie allant de 14 à 545 eV, en nous intéressant principalement au peptide triplement protoné ($m/z = 759.2$). Nous nous sommes également intéressé au peptide hydroxylé, PK26-Hyp, où Hyp représente l'hydroxyproline et seules les prolines en positions Y ont été modifiées. Les spectres de masse obtenus présentent une évolution douce avec l'augmentation de l'énergie du photon, et sont caractérisés principalement par l'ionisation simple non dissociative pour des énergies inférieures à 150 eV, et par une fragmentation intense pour les énergies plus élevées.

Concernant le peptide hydroxylé, les résultats obtenus après irradiations sont très similaires à ceux obtenus avec le peptide PK26-P, à la différence près que la perte de molécules neutres d'eau est beaucoup plus importante avec le peptide PK26-Hyp, et devient la perte principale de fragments neutres. Une étude précédente a mis en avant le fait que ces pertes d'eau proviennent directement des hydroxyprolines [125]. Comme nous savons que ces dernières stabilisent la structure en triple hélice du collagène, nous nous sommes demandé si la perte de leur groupe hydroxyle suite aux rayonnements ionisant peut engendrer la modification de cette structure particulière et modifier les propriétés métaboliques du cartilage.

Ces études sur le peptide PK26, présentées dans la thèse de L. Schwob [66], ont été publiées récemment [159, 175].

Mes travaux de thèse consistent alors à aller plus loin dans la caractérisation du collagène sous rayonnements ionisants. Pour ce faire, nous avons décidé d'étudier les propriétés d'un peptide modèle de la triple hélice du collagène. De nombreux résultats obtenus sur ce modèle en phase condensée ont permis d'approfondir les connaissances sur le collagène. La structure

chimique de ce peptide modèle cristallisé provenant de la *Protein Data Bank* a déjà été présentée précédemment sur la figure 2.4.1 de droite. Elle a pu être obtenue grâce à des études de diffraction de rayons-X avec une résolution inférieure à 2 Å [208, 216]. Chaque brin de cette hélice modèle est composé de dix répétitions du motif Pro-Pro-Gly, pour un total de 90 acides aminés sur la triple hélice $((PPG)_{10})_3$ complète. De même que pour le peptide de collagène de type I, nous avons souhaité caractériser le rôle de l'hydroxylation de chaque proline en position Y de la séquence $(XYG)_{10}$ avec le peptide $(PHypG)_{10}$. En plus d'avoir prouvé la structure en triple hélice de ces peptides en solution [216, 217], les études sur ces deux systèmes ont également permis de démontrer que l'hydroxylation des prolines en position Y accentue la stabilité de l'hélice [206]. Cependant de telles structures n'ont jamais, à notre connaissance, été mises en phase gazeuse. Ces expériences sont susceptibles de nous renseigner sur les processus fondamentaux qui régissent les voies de relaxation du peptide lorsqu'il est soumis à des rayonnements ionisants, et apporter des éléments de réponse à la question de savoir si la stabilité de l'hélice est due au solvant qui l'entoure ou si c'est une propriété intrinsèque, propre à la structure de ce peptide. La première étape de nos études est donc de vérifier si ces peptides modèles conservent ou non cette structure particulière en phase gazeuse. Nous avons ainsi réalisé des mesures de mobilité ionique à l'Institut Lumière Matière de Lyon en collaboration avec l'équipe de P. Dugourd. Nous avons également irradié ces peptides par des rayonnements ionisants : des photons VUV et RX, ainsi que des ions carbonés, en collaboration avec l'équipe de T. Schlathölter (Université de Groningen, Pays-Bas).

Caractérisation de la structure de peptides modèles du collagène par spectrométrie de mobilité ionique

3

Sommaire

3.1	Description du dispositif expérimental	48
3.2	Espèces produites par la source ESI	49
3.3	Mobilité ionique et mesures de section efficace de collisions	50
3.4	Activation par collision sur du gaz	53
3.5	Conclusion	58

L'origine de la stabilité et de la structure en triple hélice du collagène est source de débats depuis de nombreuses années. Des modèles peptidiques de la triple hélice du collagène ont été étudiés de nombreuses fois en phase condensée, afin notamment d'identifier les séquences qui reproduisent le mieux cette structure particulière en triple hélice [205, 218, 219], mais aussi pour sonder le rôle de l'hydroxylation des prolines dans sa stabilisation [213, 214, 216, 220]. Deux hypothèses ont alors émergé dans la littérature concernant ce dernier point. Tout d'abord, lors de ces études, des liaisons hydrogènes entre ces hydroxyprolines et les molécules d'eau environnantes ont été fréquemment observées, et ont été supposées responsable de cet accroissement de stabilisation. Au contraire, la seconde hypothèse suggère que la stabilisation est due à des effets stéréoelectroniques intrinsèques aux peptides [206, 213, 221]. Ces effets auraient alors tendance à modifier la structure géométrique des peptides composant la triple hélice, diminuant ainsi le coût entropique nécessaire à la formation de l'hélice. Cependant, comme la phase condensée ne peut s'affranchir entièrement des effets de solvant, ces études ne permettent pas d'obtenir une réponse définitive concernant l'origine de la stabilisation de la triple hélice par les hydroxyprolines.

Depuis plusieurs années, un intérêt croissant s'est répandu pour la spectrométrie par mobilité ionique (IMS). Couplée à la spectrométrie de masse, celle-ci s'avère en effet être une technique d'analyse puissante pour déterminer la structure de systèmes moléculaires isolés [222], en particulier des complexes non-covalents d'intérêt biologique [223, 224].

Plus récemment, le développement de techniques de spectrométrie par mobilité ionique

en tandem ont permis de sélectionner un conformère d'un ion moléculaire de rapport m/z donné avant de l'activer par collisions douces ou photo-absorption par laser, afin d'étudier les modifications structurales induites par cette activation [225–231].

Lors des études décrites dans ce chapitre et menées en collaboration avec F. Chirot et P. Dugourd, respectivement de l'Institut Sciences Analytiques (ISA) et de l'Institut Lumière Matière (ILM) à Lyon, nous avons ainsi appliqué cette technique de mobilité ionique en tandem, couplée à la spectrométrie de masse afin d'étudier et de caractériser la structure et la stabilité des peptides modèles de la triple hélice du collagène en phase gazeuse.

3.1 Description du dispositif expérimental

Les peptides modèles de la triple hélice du collagène (PPG)₁₀ et (PHypG)₁₀ que nous avons utilisé lors de ces expériences ont été achetés sous forme de poudre auprès de la société Peptides International, avec une pureté supérieure à 95%. Ces poudres ont été dissoutes dans une solution composée en proportions égales d'eau et de méthanol pour une concentration finale de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. De l'acide acétique a également été ajouté à hauteur de 1% du volume global de la solution, afin d'aider la protonation des peptides.

Les expériences d'IMS en tandem ont été menées sur le dispositif développé au sein du laboratoire ILM et présenté sur la figure 3.1.1 [232]. Les peptides en solution sont mis en phase gazeuse par le biais d'une source électrospray, avant d'être accumulés dans un assemblage de deux funnels (noté A sur le schéma du dispositif) puis injectés pendant 150 μs dans un premier tube de dérive (DT1 sur la figure 3.1.1, pour *Drift Tube*). Ce tube est rempli de gaz d'hélium à température ambiante et dont la pression avoisine 5 mbar. La séparation temporelle des ions selon leur mobilité se fait en appliquant une tension de dérive comprise entre 250 et 500 V entre les extrémités du tube. Il est ensuite possible de sélectionner un conformère donné à l'aide d'une impulsion de tension appliquée à la fin du tube de dérive. Celle-ci permet de laisser passer uniquement les ions pendant une fenêtre typique de 500 μs . Après sélection, les ions sont focalisés par un second assemblage de deux funnels (B). L'activation des molécules peut s'effectuer dans le premier d'entre eux. En appliquant une tension d'activation ($V_{\text{Activation}}$ par la suite), entre ses deux dernières électrodes, les ions vont subir des collisions plus ou moins énergétiques sur le gaz résiduel. Ils vont ensuite être stockés dans le second funnel avant d'être injectés dans le deuxième tube de dérive (DT2). La seconde séparation des ions par IMS se fait dans des conditions identiques au premier tube. Après avoir traversé l'assemblage de funnels C qui permet une focalisation des ions à la sortie du DT2, ces derniers vont atteindre différentes optiques de guidages. Tout d'abord un guide d'ions (IG) composé de 40 électrodes sur lesquelles est appliquée une tension RF, puis un dernier assemblage de funnel (D), présent pour favoriser le différentiel de pression du dispositif, avant d'atteindre un hexapôle. A la sortie de ce dernier, les ions vont parcourir un quadripôle qui permet une sélection en masse pour une gamme comprise entre $m/z = 20$ et 3000, et enfin une cellule de collision qui utilise du N_2 comme gaz tampon.

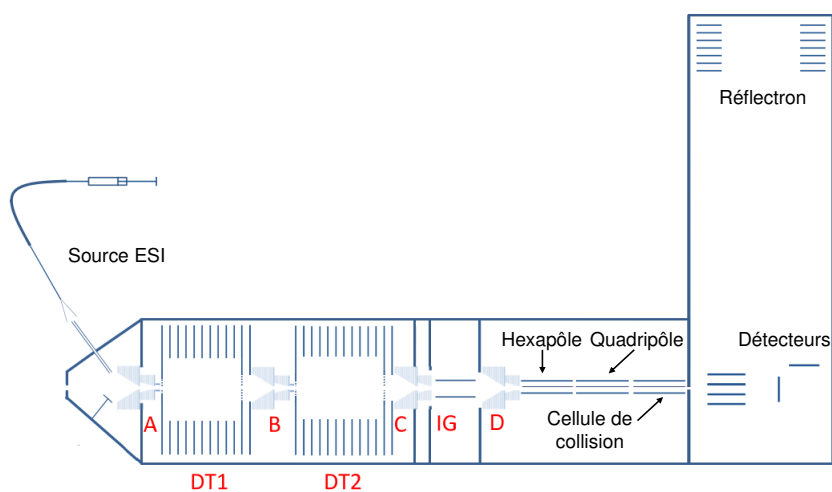


Figure 3.1.1 : Schéma du dispositif utilisé pour réaliser les mesures de mobilité ionique. En A, B et C se trouvent des assemblages de deux funnels. Les tubes de dérives sont notés DT1 et DT2, respectivement.

L'analyse des ions se fait selon leur rapport m/z à l'aide d'un spectromètre de masse par temps de vol de type réflectron couplé au second tube de dérives DT2. Ce spectromètre possède une résolution $m/\Delta m = 40\,000$, et peut fonctionner à une fréquence de 20 kHz. Deux détecteurs sont disponibles pour l'analyse, le premier se situe sur l'axe du dispositif et permet de caractériser les ions à la sortie du QMS. A l'inverse, le second est utilisé lorsque les ions traversent le spectromètre. Comme le temps de vol des ions dans celui-ci ($\sim 10\ \mu\text{s}$) est très inférieur au temps de dérive dans le tube DT2 ($\sim 10\ \text{ms}$), il est possible d'enregistrer un spectre de masse pour chaque temps d'arrivée dans la zone d'extraction. Ceci permet ainsi d'obtenir les distributions de temps d'arrivée (DTA) des ions en fonction de leur rapport masse sur charge. Ces DTA peuvent ensuite être converties en sections efficaces de collision à l'aide de la relation 2.3.5, détaillée dans le chapitre 2.

3.2 Espèces produites par la source ESI

La figure 3.2.1 présente le spectre de masse d'une solution du peptide $(\text{PPG})_{10}$ sans sélection en mobilité. Par convention durant cette thèse, sur les spectres de masse présentés, nous nommerons respectivement les monomères, dimères, trimères et hexamères : M^{n+} , D^{n+} , T^{n+} et H^{n+} , avec $n+$ leur état de charge. Les rapports masse sur charge des états de charges utilisés lors de cette thèse pour les oligomères des peptides $(\text{PPG})_{10}$ et $(\text{PHypG})_{10}$ sont présentés en annexes A et B.

Sur ce spectre de masse, nous pouvons directement observer que les trimères sont les espèces les plus intenses, et ce pour une distribution de charge allant de 3 à 7+. Nous pouvons également mentionner que le spectre de masse obtenu pour le peptide hydroxylé $(\text{PHypG})_{10}$ est très similaire, avec tout de même une proportion d'ajouts de Na^+ et K^+ plus importante.

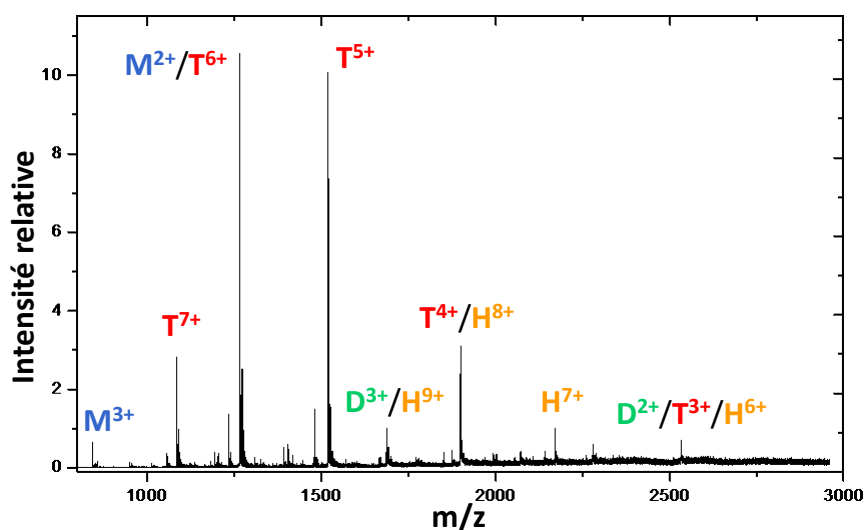


Figure 3.2.1 : Spectre de masse des espèces produites à partir d'une solution de $(PPG)_{10}$ de concentration de $50 \mu\text{Mol}$.

La quasi-absence de dimères est cohérente avec le fait que les oligomères produits en phase gazeuse sont déjà pré-existants en solution et ne sont pas le résultat d'une agrégation survenant lors du processus de désolvatation. Des études ont en effet montré que ces peptides, initialement sous forme de poudre, possèdent cette structure particulière en triple hélice [214], conservée en phase liquide [213].

De plus, la présence des hexamères tend à conforter les travaux menés par B. Brodsky *et co.*, qui ont mis en évidence que les agrégats de triples hélices du peptide $(PHypG)_{10}$ peuvent se former en solution par le biais de liaisons hydrogènes entre les chaînes latérales des hydroxyprolines [219]. Par contre, les hexamères de $(PPG)_{10}$ sont observés ici pour la première fois, les précédentes études en phase condensée ayant même conclu à l'impossibilité de leur formation [233]. Il reste cependant à vérifier si ces systèmes sont composés de triples hélices.

3.3 Mobilité ionique et mesures de section efficace de collisions

Suite à ces observations sur le spectre de masse, nous avons enregistré les DTA des différents oligomères des deux peptides. Les DTA du peptide $(PPG)_{10}$ sont exposées sur la figure 3.3.1 pour les états de charges 5 à 7+ du trimère, et de l'hexamère 9+. Comme nous pouvons l'observer sur la figure (a) pour le trimère 7+, les DTA obtenus pour ces peptides sont relativement fines, leur largeur étant fixée par la diffusion [71]. Cependant, les autres états de charges du trimère, tel que le 5+, possèdent des DTA plus larges, dû à une plus grande diversité structurale, et donc une structure relativement souple. En effet, de précédentes études ont montré que les DTA de systèmes moléculaires d'intérêt biologique de taille et de rapport masse sur

charge équivalents présentent généralement des distributions larges, synonymes d'une structure relativement flexible [232, 234–236]. A l'inverse, le fait d'observer des distributions fines pour les trimères 7+ des peptides $(PPG)_{10}$ et $(PHypG)_{10}$ (cf. annexe C) peut être interprété comme la signature d'une structure rigide.

Cependant, comme nous pouvons l'observer pour le trimère 6+, certaines DTA sont plus larges et comportent plusieurs pics. Comme plusieurs espèces moléculaires co-existent au même rapport masse sur charge, l'analyse des distributions de massifs isotopiques des spectres de masse permet d'assurer leur déconvolution. Ainsi, dans le cas du trimère 6+, cette seconde contribution a pu être attribuée au monomère 2+. Il en est de même pour avec l'hexamère 9+ et le dimère 3+.

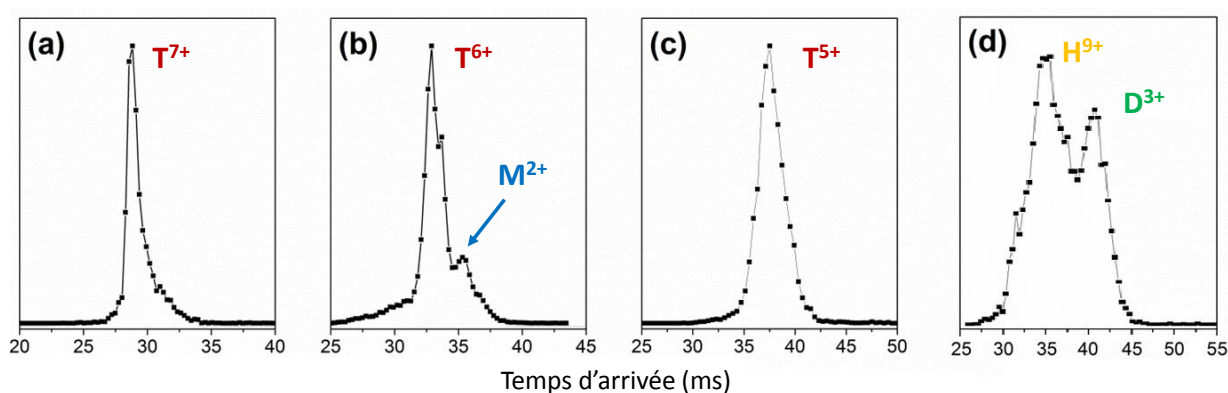


Figure 3.3.1 : Exemple de DTA obtenus pour le peptide $(PPG)_{10}$ dans le cas du trimère 5 à 7+ (spectres c, b et a, respectivement) et de l'hexamère 9+ (spectre d). Dans ce dernier spectre, un second pic est observable et correspond au dimère 3+. Le monomère 2+ est également visible avec le trimère 6+.

A partir de ces DTA, nous avons pu déterminer les sections efficaces de collision des différents oligomères. Ces résultats sont présentés dans le tableau 3.3.2. Il est important de préciser qu'à part les trimères 7+ dont les DTA ne contiennent qu'une conformation moléculaire, les valeurs de CCS obtenues correspondent à la valeur moyenne d'une famille structurale donnée. Nous pouvons observer que les CCS des trimères et des hexamères augmentent avec leur état de charge, ce qui est cohérent avec le phénomène de répulsion coulombienne qui induit le dépliement de la structure [237–240]. Il est par ailleurs intéressant de constater que les sections efficaces obtenues sont du même ordre de grandeur que celles de l'Ubiquitine (8.4 kDa). Cette protéine est similaire aux trimères de $(PPG)_{10}$ et $(PHypG)_{10}$ de par sa taille et sa masse, et a été étudiée de nombreuses fois par IMS [232, 234–236]. De plus, les valeurs de CCS des trimères 7+ des deux peptides sont comparables à celle de la conformation dépliée de l'Ubiquitine 7+ (1192 \AA^2), ce qui suggère que ces peptides ont aussi une structure allongée. Pour les états de charges 6 et 7+ communs aux deux peptides, les trimères de $(PPG)_{10}$ et $(PHypG)_{10}$ possèdent des CCS très similaires, ce qui signifie que l'hydroxylation des prolines n'influe pas de manière importante sur la structure de ces trimères.

		(PPG) ₁₀					(PHypG) ₁₀		
		État de charge		3+	4+	5+	6+	7+	6+
Trimères	CCS (Å ²)	Expérimentales	892 ± 30	971 ± 30	1190 ± 36	1270 ± 38	1295 ± 39	1250 ± 38	1303 ± 40
		Calculées	1330 ± 13					1383 ± 14	
Hexamères	CCS (Å ²)	État de charge		6+	7+	8+	9+		
		Expérimentales	1570 ± 50	1866 ± 56	1965 ± 60	2300 ± 70			
		Calculées	2236 ± 22						

Tableau 3.3.2 : Tableau récapitulatif des CCS obtenues pour les différents états de charges des trimères des peptides (PPG)₁₀ et (PHypG)₁₀, ainsi que pour ceux de l'hexamère du (PPG)₁₀. Les résultats de simulations sont également présents pour comparaison.

Afin de s'assurer que les trimères conservent bien une structure en triple hélice, nous avons comparé nos résultats expérimentaux de CCS à des simulations. Celles-ci se sont notamment basées sur la structure du peptide du (PPG)₁₀ obtenue lors d'une étude par R. Berisio *et co.* par diffraction de rayons-X [217]. Leurs travaux sur ce peptide ont montré que dans un cristal, les triples hélices s'arrangent de manière antiparallèle entre elles, comme nous pouvons le voir sur la figure 3.3.3 (*Protein Data Bank* (PDB) ID : 1K6F) qui représente un hexamère composé de deux triples hélices tête-bêche.

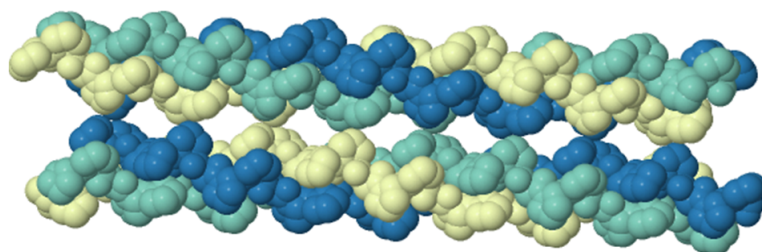


Figure 3.3.3 : Structure cristallographique d'un hexamère de (PPG)₁₀ composé de deux triples hélices. PDB ID : 1K6F.

A partir de cette structure, nous avons pu calculer les CCS de l'hexamère et du trimère de (PPG)₁₀. Les résultats de ces calculs sont également inclus dans le tableau 3.3.2. Ces CCS ont été obtenues par le programme IMPACT (*Ion Mobility Projection Approximation Calculation Tool*) de E. Marklund, basé sur l'approximation de projection paramétrée [241]. Cette approximation permet de déterminer des CCS en moyennant la projection de la molécule d'étude dans l'espace. De plus, elle ignore la diffusion et les interactions à longue distance. Il en résulte alors un temps de calcul beaucoup plus court que les autres méthodes, pour une faible sous-estimation des CCS. Les résultats obtenus sont alors corrigés selon la relation $\Omega_{MT} = 0.843 \cdot \Omega_{IMPACT}^{1.051}$. Cette calibration a été effectuée par comparaison avec la Méthode des Trajectoires, considérée comme une référence pour la détermination de sections efficaces, mais nécessitant un très grand temps de calcul. Ainsi, le programme IMPACT permet d'obtenir des

CCS de conformères de protéines sur une large gamme de masse (de 10^2 à quelques 10^7 Da), avec une bonne précision ($\sigma = 1\%$) et une grande rapidité de calcul.

Nous pouvons directement remarquer que pour l'hexamère du $(PPG)_{10}$, en prenant en compte les incertitudes, les résultats de ces calculs de CCS sont compatibles avec les valeurs obtenues expérimentalement pour le plus haut état de charge (9+). Ceci indique que la structure hélicoïdale de cet hexamère est conservée en phase gazeuse.

Concernant les trimères, les CCS mesurées expérimentalement pour les états de charges 6 et 7+ sont également très proches de celles obtenues à partir des structures cristallisées des trimères de peptides $(PPG)_{10}$ et $(PHypG)_{10}$ (PDB ID : 1CGD5), ce qui confirme que la structure en triple hélice est également conservée en phase gazeuse pour les trimères.

Aussi bien pour les hexamères que pour les trimères, pour les plus petits états de charges, les CCS obtenues expérimentalement sont inférieures à celles calculées, ce qui indique que les hélices se replient sur elles-mêmes quand le nombre de protons diminue. Les interactions coulombiennes n'induisent donc pas nécessairement la dénaturation de la structure de molécules lors du passage de la solution à la phase gazeuse, mais peuvent au contraire aider à la préserver. De telles stabilisations par effet coulombien ont déjà été rapportées, notamment pour des structures hélicoïdales [74, 239, 242, 243].

Après avoir trouvé les conditions de conservation de la structure hélicoïdale des modèles de la triple hélice en phase gazeuse, nous pouvons maintenant étudier leur stabilité en leur administrant de l'énergie interne de manière contrôlée.

3.4 Activation par collision sur du gaz

Comme les rapports masse sur charge de certaines espèces sont identiques, par exemple l'hexamère 9+ et le dimère 3+, nous avons décidé de faire fragmenter ces espèces par collisions sur du gaz afin d'étudier leur composition. Ainsi, après sélection d'un ion de rapport m/z donné dans le QMS, les ions subissent des collisions sur du gaz résiduel de N_2 dans la cellule de collision, de manière plus ou moins énergétique, à l'aide d'une tension que nous nommerons $V_{\text{Collision}}$. Le spectre de masse obtenu après activation de l'hexamère 9+ du $(PPG)_{10}$ est présenté sur la figure 3.4.1. Nous pouvons directement constater que même si le pic situé à $m/z = 1687$ peut être attribué à l'hexamère 9+ ou au dimère 3+, les fragments observés nous confortent dans le fait que ce pic parent est majoritairement composé de l'hexamère. En effet ces deux fragments sont attribués sans ambiguïté aux trimères 4 et 5+, ce qui confirme également que l'hexamère est bien composé de deux trimères, comme c'est le cas en phase condensée (figure 3.3.3).

Les triple hélices ne nécessitent donc pas de molécules d'eau ou d'hydroxyprolines pour s'agréger entre elles, ce qui est en contradiction avec les résultats d'études précédentes en phase condensée [219]. Nous proposons que l'arrangement anti-parallèle des deux hélices de l'hexamère est dû à l'interaction entre leurs moments dipolaires permanents. En effet, des

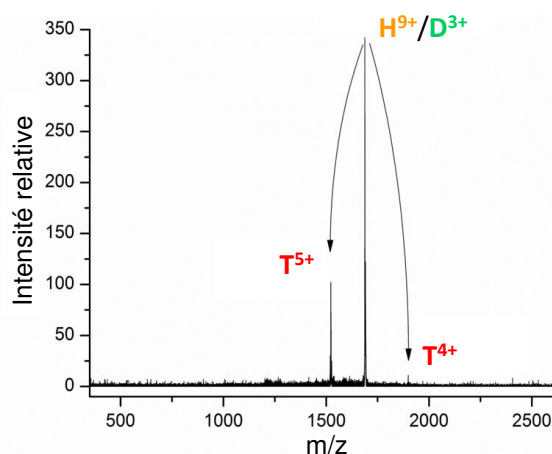


Figure 3.4.1 : Spectre de masse de l'hexamère 9+ du $(PPG)_{10}$ pour une activation de 15 V par charge.

mesures de biréfringence sur les fibres de collagène en solution ont révélé une haute valeur de moment dipolaire : $\mu = 1,5 \cdot 10^4$ D [244]. A notre connaissance, de telles expériences n'ont pas été réalisées pour les modèles de la triple hélice de collagène. Nous avons donc calculé le moment dipolaire d'une triple hélice neutre du peptide $(PPG)_{10}$ dont la structure est issue de la PDB et présentée sur la figure 3.3.3. Ces calculs ont été faits avec le programme Gaussian09 [245] au niveau semi-empirique AM1, et nous ont ainsi donné une valeur de moment dipolaire de 64.6 D, avec un dipôle presque parfaitement aligné selon l'axe de l'hélice. En comparaison, le moment dipolaire de l'hélice alpha est de l'ordre de 3.45 D par liaison peptidique [246, 247]. Dans ce cas particulier les dipôles sont alignés et de même sens, il est donc possible de les additionner directement pour obtenir le moment dipolaire d'une hélice alpha de 30 acides aminés, soit 103.5 D. La valeur que nous avons obtenu pour la structure en triple hélice du $(PPG)_{10}$ est donc du même ordre de grandeur que celle de l'hélice alpha. Il est de plus possible de déterminer l'énergie d'interaction entre les deux triples hélices de l'hexamère de la figure 3.3.3 par la relation suivante :

$$E = \frac{2k_c\mu^2}{r^3} \quad (3.4.1)$$

Avec $k_c = \frac{1}{4\pi\epsilon_0}$ la constante de Coulomb, μ le moment dipolaire d'une hélice, en C.m, et r , la distance en mètre entre les deux hélices de l'hexamère. Cette énergie est de l'ordre de 2 eV, ce qui n'est pas négligeable et confirme le fait que l'interaction entre les deux dipôles peut être responsable de l'existence de l'hexamère du peptide $(PPG)_{10}$.

Par ailleurs, il est également possible de donner une énergie d'activation aux systèmes moléculaires. Celle-ci permet non seulement de contrôler les effets de l'activation sur leur structure par IMS, mais également d'étudier leurs voies de dissociation par spectrométrie de masse. Comme nous l'avons déjà mentionné, l'activation par collision se fait dans l'assemblage de funnels B, avant l'injection dans le second tube de dérive.

Concernant les trimères des deux peptides, nos études se sont portées sur les états de charges 6 et 7+ car, en plus d'être les espèces les plus abondantes produites par la source ESI, ces états de charges possèdent des CCS correspondant à ou légèrement en dessous de celles calculées à partir des structures cristallographiques en triple hélice. La figure 3.4.2 correspond aux spectres de masse obtenus après activation des trimères 7+ des deux peptides dans la cellule de collisions, après leur sélection en masse. Nous pouvons constater que pour les deux peptides, les trimères fragmentent en monomères doublement et triplement protonés. Ces états de charges correspondent à une répartition statistique des protons sur les trois peptides.

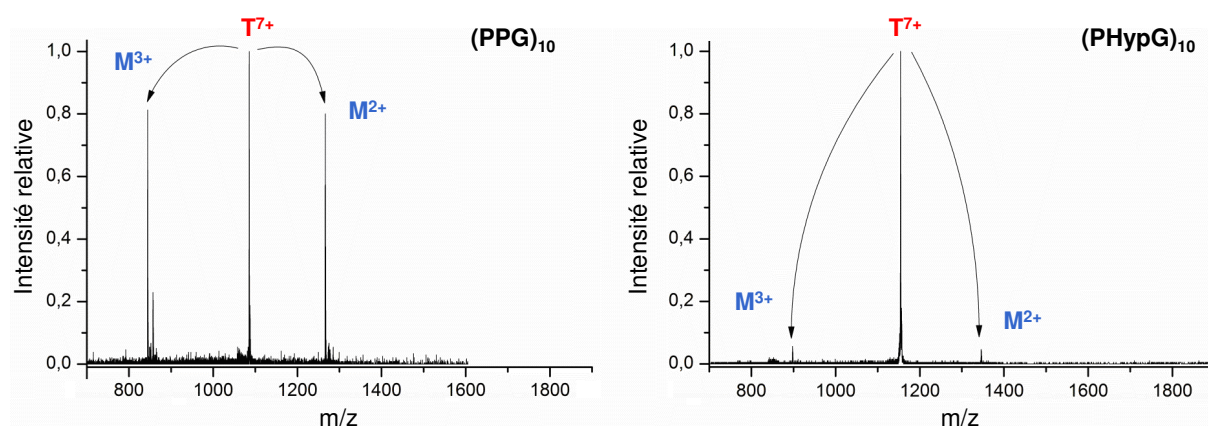


Figure 3.4.2 : Spectres de masse des trimères 7+ du (PPG)₁₀ (à gauche) et du (PHypG)₁₀ (à droite) après activation pour une tension de 12.5 V par charge.

Nous avons ensuite voulu étudier le comportement de ces différentes espèces en fonction de la tension d'activation, par la mesure du spectre de masse et de la DTA.

Le cas des trimères 6+ du peptide (PPG)₁₀ est illustré dans la figure 3.4.3. Celle-ci représente les spectres de masse pour la gamme [1265 - 1269] Da en fonction de la tension d'activation appliquée. Nous pouvons observer une évolution de la distribution du massif isotopique lorsque cette énergie d'activation augmente. En effet, sans activation, il correspond à une espèce chargée 6 fois, confirmant ainsi la présence du trimère 6+ du (PPG)₁₀. Par ailleurs, lorsque l'énergie d'activation augmente la distribution du massif isotopique se modifie progressivement pour correspondre finalement à celui du monomère doublement chargé. Il est également intéressant de remarquer que sur toute la gamme de tension d'activation, la dissociation du trimère n'induit pas la production de dimère, mais uniquement le monomère doublement protoné. Ceci peut s'expliquer si chacun des trois monomères est lié aux deux autres pour composer le trimère, comme nous l'avons vu précédemment (*cf.* figure 2.4.1). L'état de charge du monomère observé confirme également la distribution statistique des charges du trimère, équitablement réparties sur les trois monomères identiques qui le composent. Ce qui est attendu dans le cas d'une structure symétrique comme le trimère 6+.

Afin d'étudier plus en détails les effets induits par l'énergie d'activation sur la structure des trimères 7+, nous nous sommes intéressés à l'évolution des DTA en fonction de la tension d'ac-

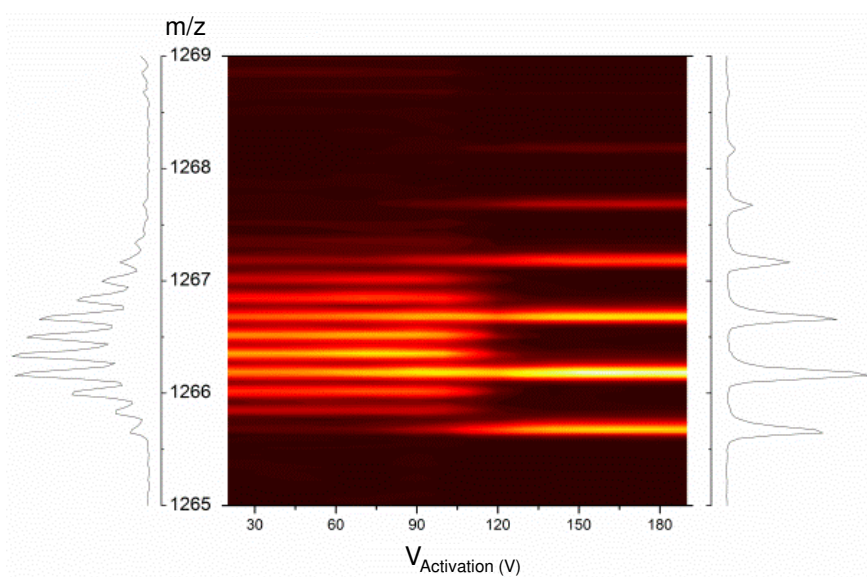


Figure 3.4.3 : Spectres de masse du trimère 6+ du $(PPG)_{10}$ en fonction de la tension d'activation. L'échelle de couleur représente l'intensité des ions, le jaune correspondant au maximum.

tivation normalisée (cf. figure 3.4.4). Il est intéressant de constater que les évolutions obtenues ici sont très différentes de celles observées lors de précédentes études sur d'autres molécules d'intérêt biologique. En effet, des protéines comme l'Ubiquitine [248] ou la Bradykinine [72] ont généralement la particularité de se déplier avant de se dissocier. Des signatures de dépliement induit par collision ont même été récemment proposées pour caractériser divers systèmes moléculaires [249]. Cependant dans notre cas, même si l'apparition d'une faible contribution apparaît pour un temps de dérive légèrement supérieur au trimère du $(PPG)_{10}$, suggérant un léger dépliement de celui-ci avant dissociation, il est intéressant de constater qu'aucun changement n'est observable sur le temps de dérive du trimère du peptide $(PHypG)_{10}$. Le seul effet de cette activation est la diminution de son intensité à partir d'un seuil en tension, suite à sa dissociation. Le fait que les DTA des trimères soient très peu sensibles à la tension d'activation jusqu'à ce seuil est cohérent avec la conservation de la structure en triple hélice des peptides, étant donnée sa forme allongée et rigide. Ce même comportement a également été observé pour les trimères 6+.

Cependant, comme l'activation de molécules par collisions est un processus relativement complexe, aucune information ne peut directement être déduite de nos expériences concernant les énergies des différents mécanismes de dissociation observés. Il est néanmoins pertinent de comparer les différents seuils de dissociation en fonction de la tension d'activation normalisée à l'état de charge des systèmes étudiés puisque ces différents trimères possèdent des CCS très proches, ainsi qu'un nombre de degrés de liberté presque identique [72]. Ainsi, en admettant ces approximations, nous pouvons constater que le seuil de dissociation des trimères 6+, présentés sur la figure 3.4.5 est supérieur à celui des trimères 7+. Cette différence peut être due, au moins en partie, à la répulsion coulombienne, réduisant la barrière de dissociation. Par ailleurs, il est

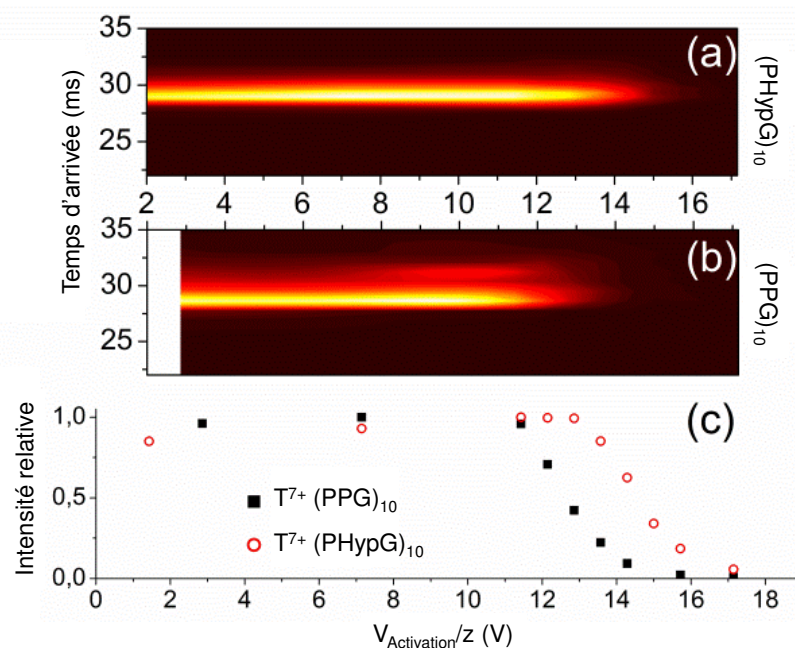


Figure 3.4.4 : (a) et (b) Cartes 2D du temps de dérive en fonction de $V_{\text{Activation}}/z$ pour les trimères 7+ des peptides (PHypG)₁₀ et (PPG)₁₀ respectivement. (c) Évolution de l'intensité relative de ces mêmes trimères en fonction de la tension d'activation normalisée par l'état de charge.

intéressant de constater que les courbes d'intensité relative des trimères 7+ des deux peptides sont légèrement décalées l'une par rapport à l'autre. En effet, afin d'obtenir 50% de perte de l'intensité du trimère hydroxylé, la tension d'activation doit être plus de 10% plus haute que pour le peptide (PPG)₁₀. Ce qui indique une plus grande stabilité pour la triple hélice du peptide (PHypG)₁₀. Nous pouvons de plus ajouter que le fait d'observer un léger dépliement pour le trimère du peptide (PPG)₁₀ et non pour le peptide hydroxylé appuie cette interprétation.

Ces résultats sont également cohérents avec de précédentes études qui ont montré que l'hydroxylation des prolines tend à augmenter la température de dénaturation de ces systèmes en solution [213], ainsi que leur température en fusion dans les solides [214]. Il est cependant important de noter ici que ces observations sont valables en phase gazeuse uniquement pour les trimères 7+, dont la CCS est celle d'une triple hélice, comme nous l'avons vu précédemment. En effet, nous pouvons voir sur la figure 3.4.5 que les courbes d'évolutions de l'intensité en fonction de $V_{\text{Activation}}/z$ sont identiques pour les trimères 6+ des peptides (PPG)₁₀ et (PHypG)₁₀. Ceci peut s'expliquer si cette stabilisation est due aux effets stéréoélectroniques puisque ceux-ci nécessitent une triple hélice non déformée pour être présents [206].

Les résultats de nos expériences en phase gazeuse sont donc finalement en accord avec une stabilisation de la structure en triple hélice des peptides induite par l'hydroxylation des prolines par le biais d'effets stéréoélectroniques, et démontrent de plus que la présence de solvant pour environner les peptides n'est pas obligatoire pour que les triple hélices existent.

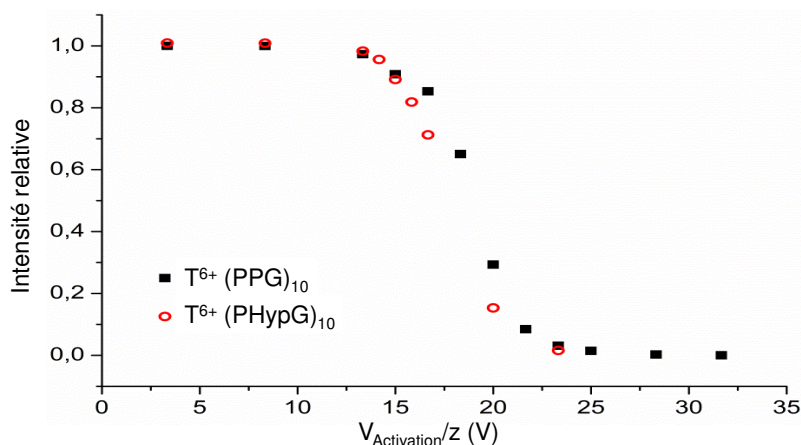


Figure 3.4.5 : Évolution de l'intensité relative de trimères 6+ des peptides (PPG)₁₀ et (PHypG)₁₀ en fonction de la tension d'activation normalisée par l'état de charge.

3.5 Conclusion

Les premières expériences structurales de modèles de la triple hélice de collagène en phase gazeuse ont été menées. Au moyen d'un montage de mobilité ionique en tandem couplé à un spectromètre de masse, la structure et la stabilité des trimères et hexamères protonés du (PPG)₁₀ ont pu être sondées. Il s'avère que pour des états de charge relativement élevés, le trimère de ce peptide possède bien une structure en triple hélice, semblable à la phase condensée. Son hexamère est quant à lui composé de deux triple hélices liées de manière anti-parallèles et stabilisé en phase gazeuse par l'interaction dipôle-dipôle. Les résultats de ces expériences ont par ailleurs démontré que si l'hydroxylation des prolines de ce peptide ne modifie pas sa structure de manière significative, elle augmente par contre l'énergie de collision nécessaire pour le dissocier en monomères. Par conséquent, la stabilisation de la triple hélice par l'hydroxylation des prolines est intrinsèque à sa structure et ne nécessite donc pas la présence d'eau pour être observée. Nos résultats indiquent également que les effets stéréoélectroniques jouent un rôle important dans cette stabilisation.

Ces travaux ouvrent finalement la voie à de nouvelles perspectives pour la compréhension de l'agrégation des triple hélices, qui constituent la première approche de la fibre de collagène, comme nous l'avons mentionné lors du chapitre 2. De nouvelles études sont malgré tout nécessaires afin de s'intéresser à un système composé d'un plus grand nombre de triple hélices, et également au rôle que les hydroxyprolines ou d'autres modifications peuvent avoir sur la structure et la stabilité d'un tel système.

En étudiant la stabilité et la structure particulière de ces modèles de la triple hélice de collagène, nous avons trouvé des conditions, directement liées à l'état de charge du système, pour que les trimères et les hexamères soient dans des conformations de triple hélices en phase gazeuse. Il peut alors être intéressant d'étudier les voies de dissociation de ces différents systèmes lorsqu'ils sont soumis à des rayonnements ionisants, tels des photons ou des ions.

Irradiation d'un modèle de la triple hélice du collagène

4

Sommaire

4.1	Dispositif expérimental et lignes de faisceaux	60
4.1.1	Grand Accélérateur National d'Ions Lourds	60
4.1.2	Synchrotron BESSY II	61
4.1.3	Spectromètre de masse Paultje	62
4.2	Étude de peptides modèles de la triple hélice du collagène sous irradiation	64
4.2.1	Peptides isolés	65
4.2.1.1	Photo-absorption VUV et X	66
4.2.1.2	Irradiation par un faisceau d'ions C ⁴⁺	72
4.2.2	Modèles de la triple hélice	74
4.2.2.1	Photo-absorption VUV et RX	74
4.2.2.2	Irradiation par un faisceau d'ions C ⁴⁺	80
4.2.3	Dimères de modèles de la triple hélice	82
4.2.4	Comparaison de l'énergie interne déposée après irradiations par photons X et C ⁴⁺	84
4.3	Conclusion et perspectives	87

Comme nous avons vu dans le chapitre précédent que les peptides modèles de la triple hélice du collagène conservent cette structure hélicoïdale en phase gazeuse pour de hauts états de charges, nous allons désormais étudier leur réponse sous irradiations ionisantes. L'objectif de cette étude est de caractériser ce modèle de triple hélice lors de l'interaction avec des ions carbonés à l'énergie du pic de Bragg, l'énergie pertinente en hadronthérapie, mais aussi avec des photons VUV et X. Les résultats présentés ici ont été obtenus grâce à la collaboration menée avec l'équipe de T. Schlathölter (Zernike Institute for Advanced Materials, université de Groningen, Pays-Bas). Après avoir décrit les différents dispositifs expérimentaux, nous étudierons plus en détails les résultats concernant le peptide isolé pour les différents faisceaux d'irradiation. Cette première étude nous permettra de connaître les propriétés propres aux sous-unités qui composent la triple hélice. Nous pourrons alors caractériser cette dernière sous les mêmes irradiations, afin d'étudier l'effet de complexation des trois sous-unités. Pour ces espèces, nous

explorerons également le rôle des hydroxyprolines sur la réponse du système moléculaire. Nous finirons par détailler les résultats obtenus dans le cas des dimères de triple hélices, qui sont la première étape dans la modélisation de la formation de la fibre de collagène.

4.1 Dispositif expérimental et lignes de faisceaux

Ces différentes expériences ont été menées au GANIL à Caen et au synchrotron BESSY-II à Berlin en couplant ces lignes de faisceaux avec un dispositif expérimental développé dans le but d'étudier l'irradiation de molécules isolées et sélectionnées en masse. Les molécules sont mises en phase gazeuse à l'aide d'une source à électronébulisation avant d'être guidées à travers le dispositif. Les ions d'intérêt sont alors sélectionnés selon leur rapport masse sur charge, puis accumulés dans un piège de Paul où l'irradiation est réalisée. Les produits de l'interaction sont alors extraits et analysés dans un spectromètre de masse à temps de vol.

4.1.1 Grand Accélérateur National d'Ions Lourds

Le GANIL (*Grand Accélérateur National d'Ions Lourds*), à Caen, est un accélérateur d'ions principalement utilisé pour la physique nucléaire. Néanmoins, des domaines interdisciplinaires tels que la radiobiologie, la physique des matériaux ou l'astrochimie utilisent également cette installation. Deux plateformes y sont présentes. L'installation ARIBE (*Accélérateur pour la Recherche sur les Ions de Basse Energie*) utilise une source ECR (*Electron Cyclotron Resonance*) pour fournir des faisceaux d'ions allant de l'hélium au xénon, pour des énergies de 3 à 17 keV/u. En complément, les faisceaux d'ions produits sur l'installation principale du GANIL peuvent aller du carbone à l'uranium, et pour une gamme d'énergie comprise entre environ 0.1 et 100 MeV/u. Les ions multichargés sont également produits par des sources ECR à partir de précurseurs solides ou gazeux. Ils sont ensuite pré-accélérés dans un cyclotron à la sortie duquel ils auront une énergie avoisinant le MeV par nucléon. Ils peuvent alors être dirigés sur la ligne d'irradiation IRRSUD avec une énergie comprise entre 0.1 et 1 MeV/u, ou vers un premier cyclotron à secteurs séparés afin d'augmenter leur énergie pour atteindre une gamme comprise entre 1 et 10 MeV/u. Après épluchage des électrons pour augmenter l'état de charge des ions, ceux-ci peuvent être conduits vers la ligne d'irradiation SME (*Sortie Moyenne Energie*) ou bien être injectés dans un second cyclotron à secteur séparé afin de subir une troisième accélération pour être finalement dirigés vers les lignes d'irradiation HE (*Haute Energie*). Sur ces dernières lignes, leur énergie peut atteindre 100 MeV/u.

Lors de nos expériences sur la ligne IRRSUD, nous avons utilisé un faisceau de C^{4+} à une énergie de 0.98 MeV/u, et une intensité de quelques μA avant notre montage expérimental. La forme du faisceau a été contrôlée au moyen de dipôles afin d'optimiser son recouvrement avec les molécules piégées dans le montage.

4.1.2 Synchrotron BESSY II

Ce dispositif a également été couplé à deux lignes de faisceaux du synchrotron BESSY II (Helmholtz-Zentrum Berlin). Ce synchrotron de troisième génération produit des faisceaux de photons de haute intensité et haute brillance sur une gamme d'énergie allant de 6 meV à 150 keV. Nos expériences ont été menées sur les lignes d'UV lointain (VUV pour *Vacuum-UV*) *U125-2_NIM* et de rayons-X *U49-2_PGM-1*, nous permettant ainsi d'irradier les peptides de 14 à 550 eV.

Pour produire ces faisceaux de photons, des électrons sont accélérés par un accélérateur linéaire (LINAC) à une énergie de 1.72 GeV pour une intensité de 300 mA, avant d'être injectés dans un anneau de stockage. Les photons sont alors créés par la courbure de la trajectoire des électrons et déservent une cinquantaine de lignes réparties autour de l'anneau. Afin d'augmenter l'intensité de photons émis, des onduleurs sont utilisés. Ce sont des aimants sur lesquels sont appliqués un champ magnétique alternatif. Les électrons vont alors subir des accélérations successives dans ces portions et ainsi émettre un rayonnement plus intense que lors de l'utilisation d'un simple aimant. Par ailleurs, comme le rayonnement émis est polychromatique, chaque ligne de faisceau est équipée de monochromateurs composés d'un cristal diffracteur, d'un réseau et de fentes sélectrices, afin de sélectionner la longueur d'onde désirée avec une grande précision. Sur ces lignes, des fentes permettent également d'augmenter ou de diminuer la résolution en énergie du faisceau, en faisant ainsi varier le flux de photons en sortie de ligne. En raison de la faible densité de cibles moléculaire lors de nos expériences, nous avons maximisé l'intensité du faisceau en maintenant les fentes ouvertes.

Ligne *U125-2_NIM*

La ligne de faisceau VUV *U125-2_NIM* [250–252] permet une irradiation pour des énergies comprises entre 4 et 40 eV, avec un flux avoisinant les 10^{12} photons par seconde. Comme nous avons souhaité nous placer dans des conditions favorisant l'intensité du faisceau, la dispersion en énergie des photons est de $\Delta E/E = 0.04\%$, soit une dizaine de meV. O.Plekan et *co.* ont montré que pour des transitions électroniques moléculaires la largeur de bande est de l'ordre de 1 eV [253], ce qui est bien supérieur à la résolution du faisceau. Nous pouvons également mentionner que sur cette ligne nous n'avons pas irradié à des énergies inférieures à 14 eV car pour celles-ci des contributions de photons d'harmoniques supérieures, et donc d'énergies plus élevées, viennent contaminer le faisceau et peuvent interférer dans nos mesures.

Ligne *U49-2_PGM-1*

La ligne *U49-2_PGM-1* [254, 255] produit un faisceau de rayons-X pouvant aller de 85 eV à 1.6 keV, avec des flux de $\sim 10^{13}$ photons/s pour la gamme d'énergie [85 - 500] eV, et $\sim 10^{12}$ photons/s pour la gamme [500 - 1600] eV. De même que pour la ligne VUV, nous avons souhaité maximiser l'intensité du faisceau en laissant les fentes de la lignes ouvertes. La

résolution en énergie est alors de $\Delta E/E = 0.1\%$, soit quelques centaines de meV. Lors de nos expériences sur les peptides modèles du collagène, nous nous sommes particulièrement intéressé à la gamme d'énergie [100 - 550] eV car elle contient les énergies d'absorption des électrons 1s des atomes C, N et O.

4.1.3 Spectromètre de masse Paultje

Le dispositif Paultje utilisé lors de ces expériences est schématisé sur la figure 4.1.1a, et a été présenté en détails dans les thèses de S. Bari [256] et O. González-Magaña [257]. Les peptides modèles (PPG)₁₀ et (PHypG)₁₀ proviennent des mêmes poudres que lors des expériences présentées lors du chapitre 3. La concentration finale des solutions que nous avons utilisées étaient également de 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, avec 1% du volume global d'acide formique afin de favoriser la protonation des peptides.

Un pousse-seringue amène la solution jusqu'à l'aiguille de la source ESI avec un flux de 5 $\mu\text{l.min}^{-1}$. Une haute tension de 4 kV est appliquée sur cette aiguille, placée à environ 5 mm d'un capillaire chauffant ($T = 350\text{ K}$) porté à un potentiel de 100 V. A leur sortie du capillaire, les ions sont focalisés à l'aide d'un funnel composé de 26 électrodes (rampe de potentiel linéaire de 25 à 13 V ; RF $\sim 270\text{ kHz}$; $V_{pp} \sim 170\text{ V}$) avant d'être guidés au travers d'un octopôle (RF $\sim 580\text{ kHz}$; $V_{pp} \sim 430\text{ V}$), d'un diaphragme porté à un potentiel de 40 V, puis finalement dans un QMS (RF $\sim 800\text{ kHz}$; $V_{pp} \sim 2000\text{ V}$) afin que l'ion d'intérêt soit sélectionné selon son rapport masse sur charge. Les ions sont alors accumulés dans un piège de Paul (RF $\sim 1\text{ MHz}$; $V_{pp} \sim 2\text{ kV}$) pendant 50 à 100 ms, simultanément à l'injection d'un gaz tampon d'hélium et à l'aide d'un champ radio-fréquence .

Le faisceau projectile est ensuite envoyé au travers de ce piège, orthogonalement à l'axe de propagation des ions moléculaires, et focalisé au centre du piège afin d'optimiser le recouvrement entre le faisceau projectile et le nuage d'ions piégés. Pour réaliser l'irradiation, le faisceau projectile est pulsé, soit à l'aide d'un obturateur électromécanique pour les photons, soit grâce à des plaques de déviation situées avant le cyclotron dans le cas des ions carbonés. Ces méthodes de pulsation permettent ainsi de contrôler le temps d'irradiation, qui est de l'ordre d'une seconde. L'intensité des faisceaux est mesurée à l'aide d'une photodiode ou d'une cage de faraday, respectivement pour les photons et les ions, placées sur la trajectoire du faisceau à la sortie du piège.

Après l'irradiation, les produits de l'interaction sont extraits par un champ électrique pulsé dans un spectromètre de masse à temps de vol pour être détectés. Il est important de mentionner ici que les expériences d'irradiation par photons VUV ont été réalisées en détectant les ions par des galettes à micro-canaux. Le signal électrique mesuré provient alors de la cascade d'électrons produite par l'impact d'un ion sur la surface des galettes. Pour les autres irradiations (photons X et ions C^{4+}), nous avons utilisé un second détecteur. Pour celui-ci, la cascade d'électrons également produite par une galette est convertie en photons dans un scintillateur, avant d'être de nouveau convertie, puis amplifiée dans le photomultiplicateur. Il permet ainsi de détecter

des ions positifs et négatifs, mais aussi l'application d'une tension de post-accélération de -9 kV (pour des ions positifs) sur la face avant de la galette, augmentant alors l'efficacité de détection par rapport à un simple jeu de galettes, pour lequel cette tension est de -5 kV. Par exemple, pour un ion de $m/z = 2000$, cette efficacité de détection est supérieure d'un facteur 2.5. Le spectromètre de masse à temps de vol du dispositif Paultje possède une résolution en masse avoisinant $m/\Delta m = 400$.

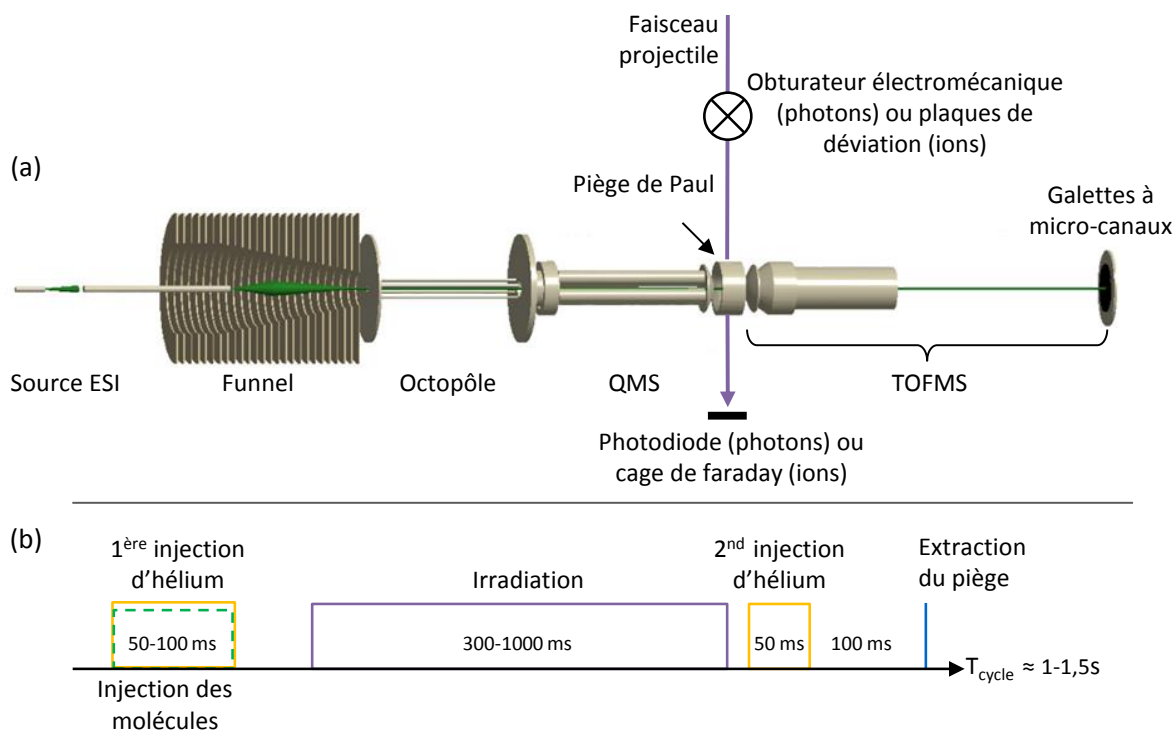


Figure 4.1.1 : (a) : Schéma du dispositif expérimental Paultje couplé avec les lignes de faisceaux de photons ou d'ions. (b) : Chronogramme de l'utilisation du dispositif présentant le piégeage, l'irradiation et l'extraction des ions moléculaires.

Le chronogramme de la figure 4.1.1b représente le cycle de fonctionnement habituellement utilisé lors de ces expériences. Les ions moléculaires sont injectés dans le piège en même temps que le gaz tampon d'hélium pendant une durée comprise entre 50 et 100 ms. Un court délai de quelques dizaines de millisecondes sépare la fin de l'injection des ions moléculaires du début de l'irradiation. Ce délai est nécessaire pour le pompage du gaz afin d'éviter que celui-ci ne soit ionisé par le faisceau projectile lors de l'irradiation. Comme la section efficace d'interaction dépend directement de l'énergie du faisceau projectile, son intensité peut être ajustée en variant la durée d'irradiation de 100 ms à 1 s. Une seconde injection de gaz d'hélium est réalisée juste après la fin de l'irradiation afin de thermaliser les fragments produits lors de l'interaction et d'augmenter la résolution en masse en conservant une petite taille de paquet d'ions. Un second délai de 100 ms est alors appliqué avant d'extraire les ions du piège, afin de s'assurer une fois

de plus que le gaz d'hélium est correctement pompé. En effet, lors de l'extraction des ions moléculaire du piège, les collisions sur le gaz résiduel détérioreraient la résolution en masse et pourraient faire fragmenter les ions moléculaires par CID.

Lors des expériences d'irradiation, nous souhaitons étudier les processus fondamentaux induits par l'interaction d'un unique photon ou ion atomique sur un ion moléculaire. Afin de garantir cette condition, le temps d'irradiation est ajusté pour que la perte de l'ion parent ne dépasse pas 10%. En effet, à ces flux de particules, comme les interactions multiples sont des événements indépendants, s'il existe une probabilité p pour réaliser une seule interaction, celle correspondant à deux interactions est p^2 . En négligeant la probabilité que plus de deux interactions se produisent, nous avons alors $p^2 + p \leq 0.1$, soit $p \leq 0.0916$ et $p^2 \leq 0.0084$. Par conséquent, moins de 10% des interactions seront multiples.

Lors de l'acquisition de données trois spectres de masse sont enregistrés : un premier spectre témoin correspondant uniquement au piégeage et à l'extraction des ions moléculaires et deux autres obtenus après leur irradiation par le faisceau projectile. Il est ainsi possible de soustraire le spectre de masse témoin à la moyenne des deux irradiations. Il résulte de cette soustraction un pic négatif pour l'ion parent, correspondant à la perte, c'est à dire à la quantité d'ions parents ayant interagi avec un photon ou un ion, et subi une ionisation ou une fragmentation, modifiant son rapport m/z . Les pics positifs correspondent alors aux produits de l'interaction. Un spectre d'irradiation du gaz résiduel est également enregistré, afin de repérer les pics correspondant au bruit de fond. Comme les efficacités de détection des deux détecteurs utilisés dépendent de la vitesse des ions, et par conséquent de leur rapport m/z , leur abondance sera corrigée en la divisant par cette efficacité.

4.2 Étude de peptides modèles de la triple hélice du collagène sous irradiation

Dans cette partie, nous allons caractériser le peptide modèle de collagène après irradiation par des rayonnements ionisants. Avant d'étudier la structure en triple hélice, nous allons dans un premier temps nous intéresser au simple brin, le monomère, afin de nous focaliser sur ses propriétés fondamentales. Les listes des fragments du squelette peptidique référencés selon la nomenclature de la figure 2.1.4 pour les peptides $(PPG)_{10}$ et $(PHypG)_{10}$ sont respectivement présentées dans les annexes A et B.

La figure 4.2.1 présente un spectre de masse obtenu à partir d'une solution du peptide $(PPG)_{10}$, sans sélection en masse ni irradiation des ions piégés. Nous pouvons alors observer les espèces produites par la source ESI. Les principales contributions correspondent aux monomères doublement et triplement protonés, avec des rapports masse sur charge respectifs de 1266.4 et 844.6 (moyenne sur tous les isotopes). Nous pouvons également observer des pics de plus faible intensité à des masses légèrement supérieures à celles des monomères. Ces contributions sont attribuées à la substitution d'un proton par un ion de sodium ou de potassium, et à l'ajout d'une

molécule d'eau. Ainsi, même si les pics correspondant aux rapports m/z de 1266.4 et 844.6 peuvent en principe être attribués à d'autres espèces, comme les dimères 4 et 6+ ou les trimères 6 et 9+, ces adduits nous assurent que ces pics correspondent majoritairement aux monomères 2 et 3+. La troisième contribution principale est sans ambiguïté le trimère $[(\text{PPG})_{10}]_3 + 7\text{H}]^{7+}$ pour un m/z de 1085.6. Le fait d'observer les états de charges précédemment mentionnés pour le monomère est donc cohérent avec la composition de ce trimère car si les charges sont également réparties sur le peptide, ce dernier est composé d'un monomère triplement protoné et de deux monomères doublement protonés. Ceux-ci sont donc probablement visibles sur le spectre de masse suite à la dissociation de la structure en triple hélice par CID sur le gaz résiduel présent dans le funnel. Ce processus a été décrit dans la littérature pour des complexes protonés non-covalents [84, 86, 258]. Dans le cas du second peptide, le $(\text{PHypG})_{10}$, le spectre en sortie de source est très similaire à celui du $(\text{PPG})_{10}$. Un nouveau pic est tout de même présent et est attribué au dimère 5+, ce qui est cohérent avec la distribution des charges sur la triple hélice. La présence de ces monomères, ainsi que l'absence de l'hexamère, indiquent que les conditions de source ESI favorisent des collisions plus énergétiques entre les molécules et le gaz résiduel que dans le cas du dispositif utilisé lors de nos expériences à Lyon et présenté dans le chapitre 3.

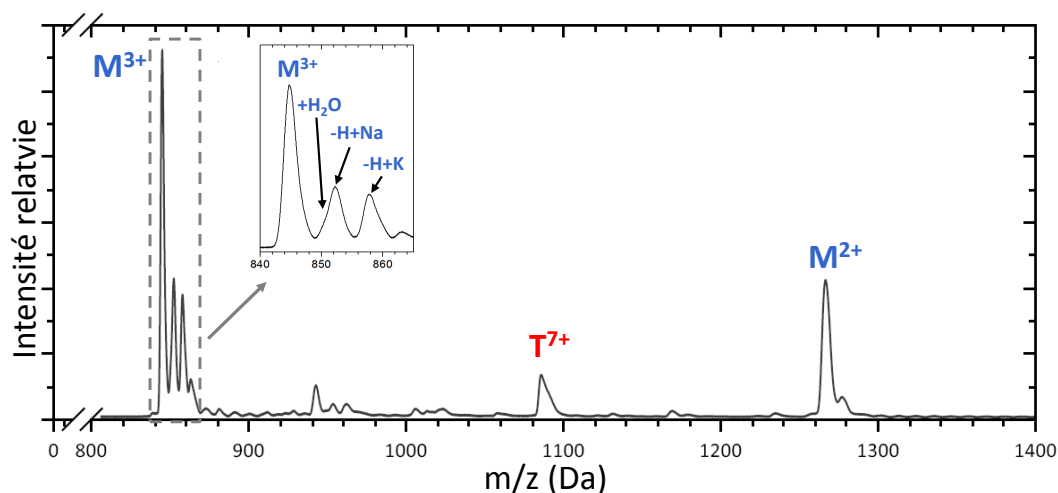


Figure 4.2.1 : Spectre de masse du peptide $(\text{PPG})_{10}$ obtenu sans sélection avec le QMS. L'encadré est un agrandissement du monomère triplement chargé et de ses adduits, $+\text{H}_2\text{O}$, $-\text{H}+\text{Na}$ et $-\text{H}+\text{K}$.

4.2.1 Peptides isolés

La première étape de notre démarche consiste donc à étudier les différents états de charge des deux peptides sous irradiation. Nous allons voir dans un premier temps la réponse de ces peptides à l'absorption d'un photon VUV ou X, ce qui correspond à la gamme d'énergie [14 - 531.5] eV. Ces premières expériences nous permettront de voir que les différentes voies de

relaxation des peptides dépendent directement de l'énergie du photon. Nous étudierons ensuite l'irradiation de ces peptides par des ions C^{4+} à l'énergie du pic de Bragg. Pour l'étude des monomères, comme les spectres de masse du $(PPG)_{10}$ et du $(PHypG)_{10}$ après irradiation de photons ou d'ions sont très similaires, nous avons choisi de présenter les résultats du peptide hydroxylé pour les photons VUV et les ions C^{4+} , et ceux du $(PPG)_{10}$ pour les rayons-X.

4.2.1.1 Photo-absorption VUV et X

Les spectres de masse du peptide $[(PHypG)_{10}+3H]^{3+}$ obtenus après absorption d'un photon VUV unique de 14, 22 et 32 eV sont présentés sur la figure 4.2.2. L'ion parent ($m/z = 897.9$) n'est pas visible sur les spectres. Son intensité est négative suite à notre méthode d'analyse, comme nous l'avons expliqué précédemment lors de la description du dispositif (*cf.* section 4.1.3).

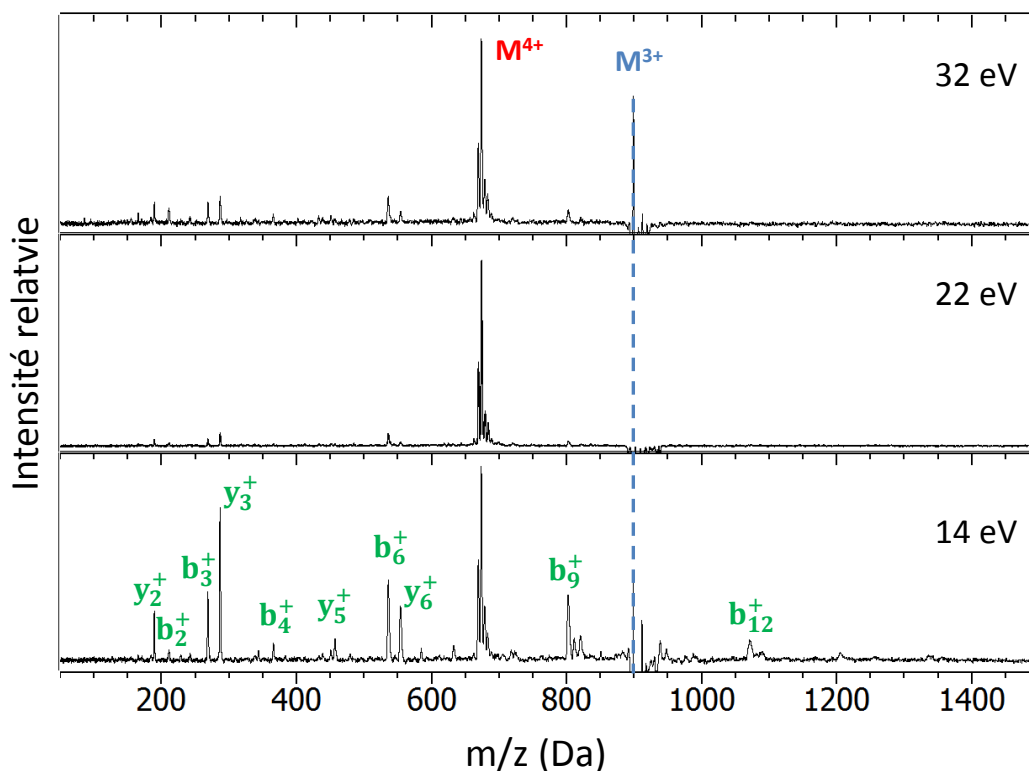


Figure 4.2.2 : Spectres de masses du peptide $[(PHypG)_{10}+3H]^{3+}$ (M^{3+}) après absorption de photons d'énergie respective de 14, 22 et 32 eV. Le peptide ionisé intact est noté M^{4+} et les fragments du squelette sont attribués selon la nomenclature présentée sur la figure 2.1.4.

La figure 4.2.3 présente quant à elle les spectres de masse obtenus après absorption de photons X de 150, 288, 350 et 531.5 eV par le monomère triplement protoné du peptide $(PPG)_{10}$. Comme nous l'avons mentionné en présentant le tableau 2.3.1 du chapitre 2, ces

énergies correspondent aux seuils d'excitation d'un électron d'une orbitale 1s des atomes de carbone (288 eV), d'azote (401.5 eV) et d'oxygène (531.5 eV) vers une orbitale π^* moléculaire.

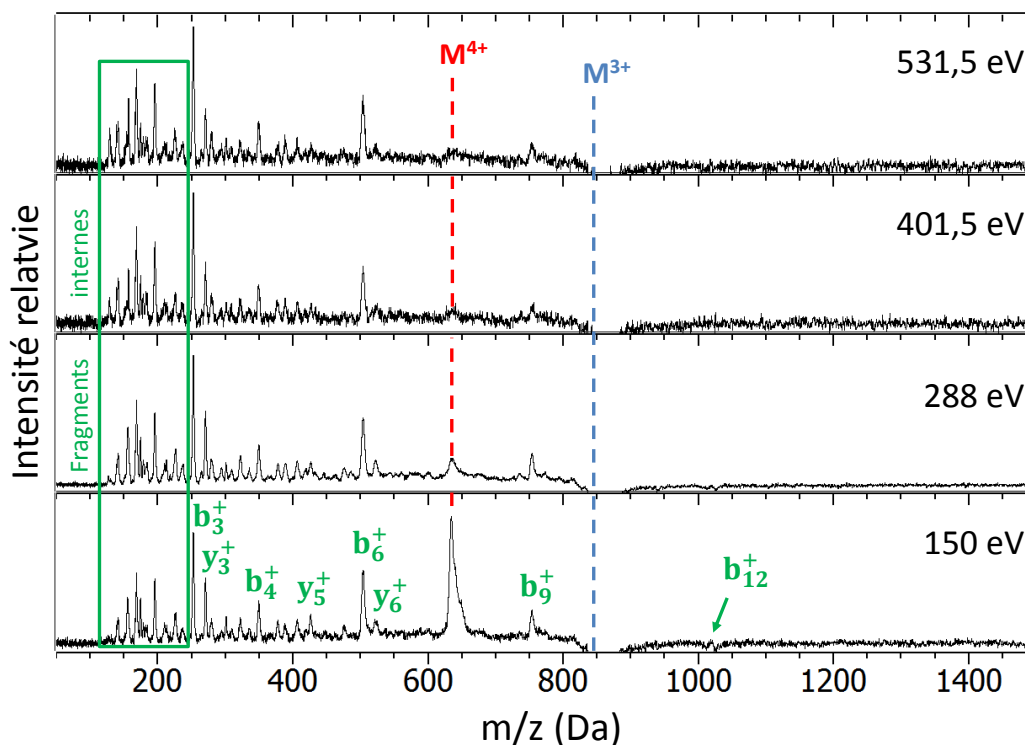


Figure 4.2.3 : Spectres de masses du peptide $[(PPG)_{10}+3H]^{3+}$ après absorption de photons d'énergies respectives 150, 288, 401.5 et 531.5 eV. Le peptide ionisé intact est noté M^{4+} et les fragments du squelette sont attribués selon la nomenclature présentée sur la figure 2.1.4.

Description des spectres de masses

Pour une énergie de photon de 14 eV, le spectre de masse est dominé par la fragmentation du peptide provenant principalement de la rupture de la liaison Gly-Pro du squelette peptidique, et amenant à la création des fragments b et y répartis le long du squelette (*cf.* figure 4.2.2). Les fragments y_2^+ ($m/z = 189$), b_4^+ ($m/z = 365$) et y_5^+ ($m/z = 456$) sont peu intenses, alors que les fragments majoritaires proviennent des séries de fragments b_{3n}^+ et y_{3n}^+ , avec $n = 1$ à 4, et sont observables pour quasiment toutes les énergies. Pour ces séries de fragments, à cause de la répétition des acides aminés qui composent le peptide, il n'est pas possible de séparer la contribution d'un fragment b_{3n}^+ donné et celle d'un fragment b_{6n}^{2+} . Il est également intéressant de constater une diminution de l'intensité de ces fragments lorsque n augmente. La baisse de l'efficacité de détection avec le rapport m/z ne permet pas d'expliquer entièrement cet effet. Une autre cause serait que les fragments b_{3n}^+ et y_{3n}^+ proviennent d'une fragmentation secondaire des ions b_{3m}^+ et y_{3m}^+ avec $m > n$. Ces ruptures de liaisons peptidiques sont en accord avec les

résultats observés après l'irradiation UV de ces mêmes peptides en phase liquide [211]. Cette observation concorde également avec de précédents travaux sur l'effet Proline qui ont montré que dans le cas de peptides protonés contenant des prolines, les ruptures du squelette peptidique surviennent du côté de leur N-terminal [88, 259].

Pour les énergies de photons X (*cf.* figure 4.2.3), de nouveaux fragments apparaissent pour des rapports masse sur charge inférieurs à 250. Ils sont attribués à des fragments internes provenant d'au moins deux ruptures de liaisons du squelette peptidique.

Jusqu'à une énergie de photon de 150 eV, le pic le plus intense est celui correspondant au peptide ionisé radicalaire intact $[(PPG)_{10}+3H]^{4+\bullet}$ à $m/z = 633.5$, ce qui est cohérent avec les études précédentes sur les seuils d'ionisation de peptides de taille et d'état de charge similaires. Nous pouvons par exemple citer les peptides et leur seuil d'ionisation suivants : [Arg-8]-Vasopressin (10.6 ± 0.4 eV), Méliittine (12.2 ± 0.7 eV), l'Insuline (13.3 ± 0.4 eV) [106], et la Substance P (11.1 ± 0.6 eV) [153].

Comme nous pouvons le voir sur les spectres des figures 4.2.2 et 4.2.3 que nous venons de présenter, les intensités relatives de toutes ces espèces sont directement liées à l'énergie du photon absorbé. Nous allons désormais caractériser plus en détails leur évolution en fonction de l'énergie du photon. Par ailleurs, ces intensités dépendent également de l'état de charge de la molécule cible. En effet, dans le cas du monomère doublement protoné, nous pouvons observer sur la figure D.1 de l'annexe D que l'intensité relative des fragments est beaucoup plus faible que pour le monomère triplement protoné. Cette différence peut s'expliquer par la présence du proton supplémentaire pour ce dernier. Ce proton peut être transféré vers un azote du squelette et induire la cassure de la liaison peptidique. Ce processus de proton mobile a été observé en CID pour des peptides protonés [135], et a permis d'expliquer l'effet proline [259–261].

Évolution des spectres de masse en fonction de l'énergie du photon absorbé

La figure 4.2.4a présente l'évolution de l'abondance du peptide ionisé intact, la somme des fragments b_{3n}^+ et y_{3n}^+ et celle des autres fragments en fonction de l'énergie d'irradiation dans le cas du peptide hydroxylé triplement protoné $[(PHypG)_{10}+3H]^{3+}$. Ces mêmes évolutions sont représentées dans le cas des énergies de photons X pour le peptide $[(PPG)_{10}+3H]^{3+}$ sur la figure 4.2.4b. Les abondances relatives sont déterminées en calculant l'aire sous le pic d'intérêt et en les corrigeant par l'efficacité de détection. Ensuite, dans le cas des rayons-X, les différentes abondances obtenues pour une énergie donnée sont normalisées par la somme des produits de la photo-absorption. Cette normalisation permet ainsi de s'affranchir des fluctuations survenant entre les différentes énergies, mais n'est possible que parce que les espèces ioniques détectées sont identiques sur toute la gamme d'énergie de rayons-X étudiée. Comme cette condition n'est pas respectée pour la gamme d'énergie des photons VUV, cette normalisation n'a pas pu être réalisée. Les abondances relatives ont alors été obtenues par normalisation à l'aire de la perte de l'ion parent, qui est proportionnelle au nombre d'ions ayant absorbé un photon.

Comme nous l'avons expliqué dans la partie expérimentale, les énergies de photons utilisées pour nos expériences sont comprises dans la gamme [14 - 531.5] eV mais les deux lignes de faisceaux utilisées ne permettent pas de recouvrement entre les énergies. Ceci explique l'écart entre les gammes sondées par irradiation VUV ([14 - 32] eV) et X ([100 - 531.5] eV).

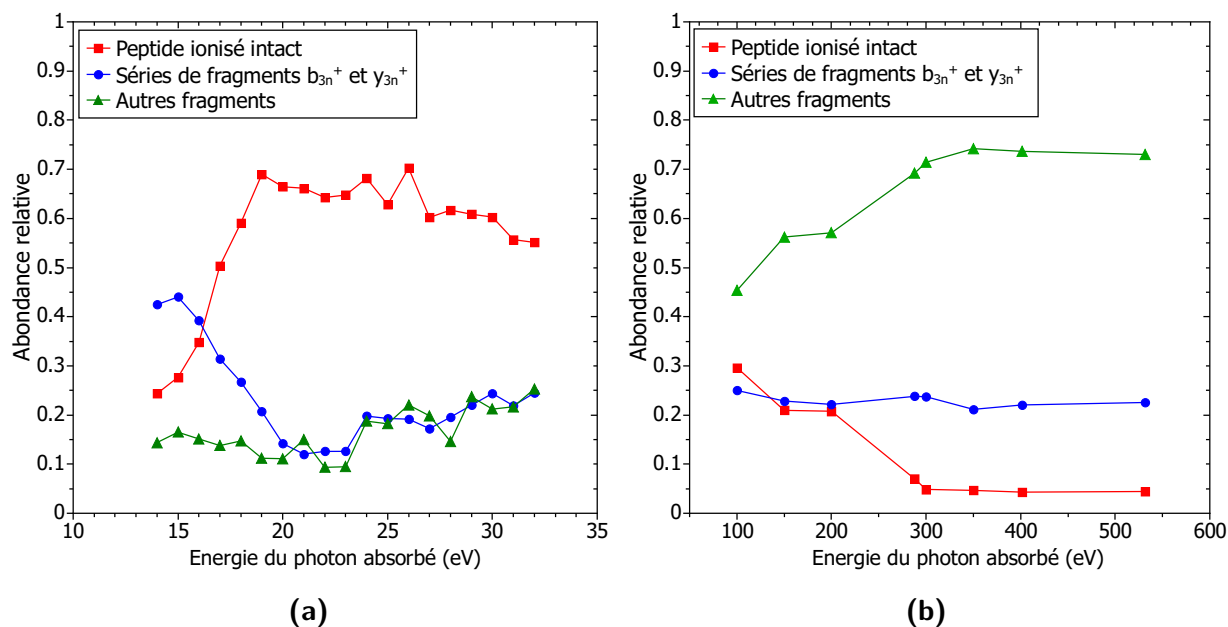


Figure 4.2.4 : Abondances relatives des différentes voies de relaxation du peptide [(PHypG)₁₀+3H]³⁺ (a) en fonction de l'énergie du photon absorbé pour des énergies VUV allant de 14 à 32 eV, et pour le peptide [(PPG)₁₀+3H]³⁺ (b) pour des énergies de photons X allant de 100 à 531.5 eV.

Nous pouvons directement remarquer que pour les basses énergies d'irradiation, l'ionisation non-dissociative augmente jusqu'à atteindre un maximum, autour de 20 eV, avant de diminuer progressivement jusqu'aux plus hautes énergies. Cet aspect a déjà été observé pour de l'ionisation photo-induite sur des gammes d'énergie plus restreintes pour des molécules neutres [262], ainsi que pour la Substance P simplement protonée [153], mais également pour des peptides multi-protonés dans le cas de l'ionisation par impact d'électrons [108].

Sur cette même gamme d'énergie, 14 - 20 eV, la fragmentation, qui était majoritaire à 14 eV, décroît jusqu'à atteindre son minimum vers 20 eV. Cette fragmentation est dominée par la rupture des liaisons peptidiques entraînant la création des séries de fragments b_{3n}⁺ et y_{3n}⁺. Le fait d'observer des tendances inverses pour les processus de fragmentation et d'ionisation indique que dans cette gamme d'énergie, la fragmentation du peptide n'est pas liée à sa photo-ionisation. Nous proposons que le peptide subit une photo-excitation dans de hauts états électroniques, suivie par une conversion interne dans l'état fondamental, puis une redistribution de l'énergie interne dans les degrés de libertés vibrationnels intra-moléculaires. Cette fragmentation par photo-excitation est également observée dans le cas de molécules organiques de différentes tailles pour la même gamme d'énergie de photons absorbés [263]. Le fait d'observer conjointement les processus de photo-excitation et de photo-ionisation dans cette gamme

d'énergie signifie qu'un photon unique peut être absorbé par des électrons de plusieurs orbitales de valence d'une même molécule. Ces observations ont également été faites lors d'études sur l'émission d'électrons après photo-absorption par des acides aminés de Glycine, Proline et de Méthionine [253], ainsi que par différents dipeptides cycliques [264].

Au delà de 20 eV, le processus d'ionisation non-dissociative commence à décroître au profit de la fragmentation, ce qui peut s'expliquer par l'augmentation de l'énergie d'excitation déposée à l'intérieur du peptide après ionisation. La fragmentation devient alors majoritaire pour les énergies de photons X. Contrairement aux plus basses énergies, après absorption d'un tel photon les séries de fragments b_{3n}^+ et y_{3n}^+ ne sont plus majoritaires. En effet, en observant les spectres de masse présentés sur la figure 4.2.3 et obtenus après irradiation par faisceaux de photons X, il apparaît que ceux-ci sont dominés par la fragmentation interne du peptide, pour des rapports masse sur charge inférieurs à 250. Ces derniers sont produits par rupture de plusieurs liaisons du squelette peptidique après absorption du photon X. Ceci est cohérent avec le fait que le photon dépose une grande quantité d'énergie dans le peptide.

Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre 2, les photons X peuvent cibler précisément un électron des couches internes 1s de certains atomes, et mener à leur excitation dans une orbitale moléculaire ou à leur éjection dans le continuum. Dans les deux cas ces processus sont suivis par l'émission d'un électron Auger lors du réarrangement électronique. Par exemple dans le cas de l'atome de carbone, l'excitation de l'électron 1s se produit pour une énergie de photon de 288 eV, et son éjection, pour 300 eV.

Dans notre cas, nous constatons une évolution significative entre 200 et 288 eV. L'ionisation non-dissociative subit une franche diminution, et à l'inverse, la fragmentation interne augmente. Ceci pourrait être dû à la transition entre l'ionisation en couche de valence profonde et l'excitation d'un électron 1s d'un carbone. Le réarrangement électronique qui s'ensuit induirait alors un plus grand dépôt d'énergie dans le système par redistribution de l'énergie dans les modes de vibration, augmentant ainsi la fragmentation interne.

A. Milosavljevic *et co.* ont montré que dans le cas de protéines protonées en phase gazeuse, une transition progressive entre les processus d'excitation et d'ionisation est observable après absorption d'un photon X par un électron 1s d'un atome de carbone entre 294 et 296 eV [163]. Dans notre cas, l'espacement en énergie des différentes irradiations que nous avons réalisées ne permet pas d'observer une telle transition, cependant nous constatons une variation des abondances relativement rapide entre 288 eV et 300 eV. Nous pouvons remarquer que la simple ionisation non-dissociative du peptide diminue en augmentant l'énergie, alors que l'abondance des fragments internes augmente et que celle des fragments peptidiques b et y reste constante. La baisse de l'abondance de la simple ionisation peut correspondre à l'apparition de la double ionisation par photo-ionisation suivie de l'émission d'un électron Auger, mais le fait de ne pas observer le peptide intact doublement ionisé suggère qu'il se dissocie directement après sa double-ionisation, ce qui pourrait expliquer l'augmentation des fragments internes.

Concernant le peptide hydroxylé, l'ionisation non-dissociative est également accompagnée des mêmes adduits que ceux observés sur le spectre de masse obtenu en sortie de source sur

la figure 4.2.1 : la substitution d'un proton par un ion Na^+ ou K^+ . La figure 4.2.5 présente une comparaison entre l'ion parent $[(\text{PHypG})_{10}+3\text{H}]^{3+}$ avant irradiation et le peptide ionisé intact $[(\text{PHypG})_{10}+3\text{H}]^{4+}$. Nous pouvons directement observer que sur la totalité de la gamme d'énergie étudiée, l'intensité relative de ces complexes est similaire avant et après absorption d'un photon. Ceci signifie que la photo-ionisation n'induit pas la dissociation systématique de ces complexes non-covalents, et donc que les ions Na^+ et K^+ sont liés avec le peptide par une énergie similaire à celle d'un proton.

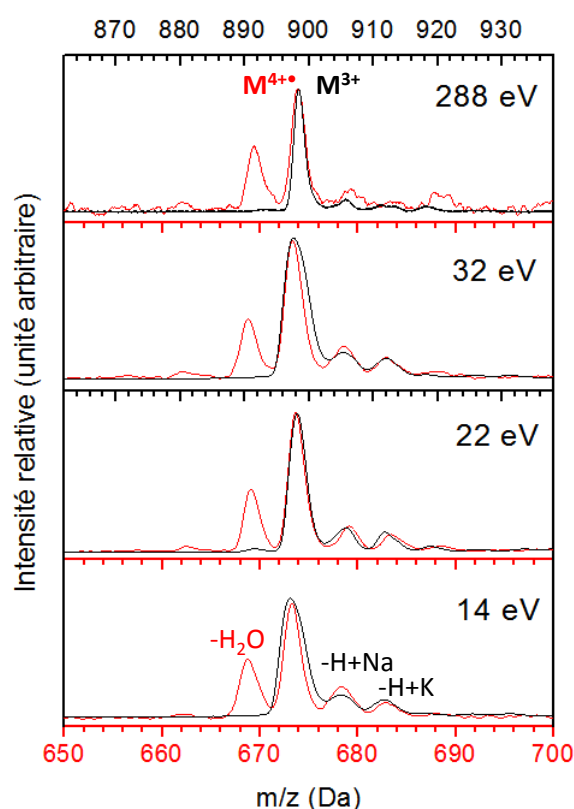


Figure 4.2.5 : Comparaison entre le peptide parent $[(\text{PHypG})_{10}+3\text{H}]^{3+}$ (en noir) et le peptide ionisé radicalaire intact $[(\text{PHypG})_{10}+3\text{H}]^{4+}$ (en rouge) après absorption d'un unique photon de 14, 22, 32 et 288 eV. La perte de H_2O , ainsi que les substitutions d'un proton par un ion Na^+ et K^+ sont indiquées.

De plus, la photo-absorption fait apparaître un pic à $m/z = 668.9$, attribué à la perte d'une molécule neutre d' H_2O après ionisation du peptide. Il est important de noter ici que cette perte de molécule d'eau n'est quasiment pas observée pour le peptide $(\text{PPG})_{10}$ non hydroxylé, et elle constitue l'unique différence entre les deux peptides. Cette perte a déjà été constatée lors d'études antérieures de l'équipe, dans le cas d'un peptide formé d'une séquence du collagène de type I, entre autres pertes de molécules neutres provenant des chaînes latérales des acides aminés [159]. A l'inverse des prolines, les hydroxyprolines possèdent un groupe OH sur leur chaîne latérale, probablement à l'origine de cette molécule d'eau. De même que pour les adduits, il est également intéressant de remarquer que l'énergie du photon absorbé n'influe

pas sur cette perte, qui représente près de 50% de l'intensité du peptide ionisé intact. De plus, le fait de ne pas l'observer pour le peptide parent non irradié est cohérent avec un processus se produisant après ionisation et qui se traduit par le réarrangement électronique, notamment de l'électron célibataire, entraînant la perte d'une molécule d'eau.

4.2.1.2 Irradiation par un faisceau d'ions C^{4+}

Après irradiation de ces monomères par des photons, nous allons désormais nous intéresser au cas des ions. Nous pouvons tout d'abord mentionner que les résultats sont présentés uniquement pour le peptide (PHypG)₁₀ car comme pour le cas des photons, ceux obtenus avec le peptide non hydroxylé sont quasiment équivalents.

Sur la figure 4.2.6 nous pouvons alors directement comparer les spectres de masse du monomère triplement protoné du peptide (PHypG)₁₀ obtenus après irradiation respectives de photons X à 150 eV, et d'ions C^{4+} à 0.98 MeV/u. La première constatation que nous pouvons faire concerne la grande similitude entre les deux spectres. Dans les deux cas, les principales contributions sont le peptide $[(PHypG)_{10}+3H]^{4+}$ ($m/z = 673.5$), produit par l'ionisation non-dissociative du peptide parent, ainsi que les mêmes fragments du squelette peptidique. Par conséquent, malgré la différence fondamentale entre les deux projectiles, les conséquences de l'irradiation semblent similaires.

Concernant la photo-absorption à 150 eV, cette énergie est inférieure à celle d'une transition d'un électron d'une couche 1s d'un atome vers un état excité. Le photon est alors absorbé par un électron d'une orbitale de valence profonde, un ou plusieurs électrons sont éjectés et l'énergie résiduelle est redistribuée dans les modes de vibration du peptide et mène à sa fragmentation. Par ailleurs, L. Tribedi *et co.* ont montré lors d'une étude de collisions entre des ions C^{6+} à 3.5 MeV/u et des molécules d'Uracile, qu'à cette énergie les ions projectiles interagissent avec les électrons des orbitales de valence externes [202]. Nous pouvons alors supposer que le même type d'interaction survient dans notre cas avec les ions C^{4+} . Cet aspect est appuyé par la similarité des deux spectres présentés sur la figure 4.2.6. Les photons comme les ions interagissent avec les électrons des peptides, en éjectent au moins un, et déposent de l'énergie interne vibrationnelle dans le système.

La fragmentation qui s'ensuit est aussi abondante pour les deux projectiles, nous pouvons donc en déduire que le dépôt d'énergie vibrationnelle dans le peptide dans le cas des ions C^{4+} est équivalent au cas de l'absorption d'un unique photon X de 150 eV, et ce malgré les interactions à longue distance survenant entre les ions et les peptides. En effet, comme les ions interagissent avec les peptides sur une gamme de paramètres d'impact, lorsque ceux-ci sont grands les électrons des orbitales de valence externes peuvent être éjectés lors d'une ionisation relativement douce, et nous aurions pu nous attendre à ce que l'énergie déposée dans le système soit faible en comparaison avec l'absorption d'un photon X.

Par ailleurs, une différence est directement observable entre les deux spectres de masse. Un pic situé à $m/z = 1346.4$ et correspondant au peptide doublement protoné $[(PHypG)_{10}+2H]^{2+}$

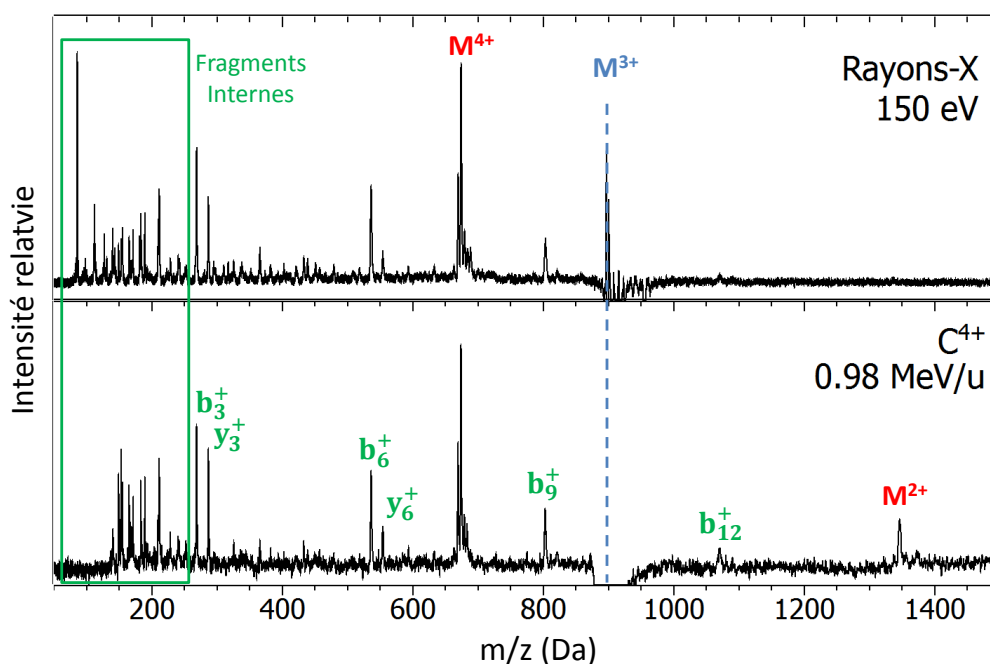


Figure 4.2.6 : Comparaison des spectres de masse du monomère $[(\text{PHypG})_{10}+3\text{H}]^{3+}$ après irradiation par des photons X de 150 eV et des ions C^{4+} à 0.98 MeV/u. L'absence de fragments de m/z inférieures à 140 dans le spectre du bas est due à la tension V_{pp} du piège, trop élevée pour piéger ces ions.

est uniquement visible après irradiation par des ions. Nous attribuons cette contribution à un détachement de proton non dissociatif du peptide parent. A notre connaissance, ce phénomène n'a jamais été observé après photo-absorption, mais l'a été uniquement après collisions entre des ions Xe^{8+} et la protéine Cytochrome C multi-protonée [184]. Lors de leur étude, S. Martin *et co.* ont mis en évidence que la probabilité de détacher un proton augmente avec l'état de charge initial du peptide, ce qui est cohérent avec nos résultats puisque lors de l'irradiation par des ions C^{4+} du monomère doublement protoné, nous n'avons pas observé ce processus de détachement de proton (*cf.* figure D.2 de l'annexe D).

Le monomère $[(\text{PHypG})_{10}+2\text{H}]^{2+}$ pourrait également être obtenu après un transfert d'électron provenant du projectile, comme observé lors du processus d'ETD. Mais l'électron capturé provient alors d'un anion et l'interaction se fait à très basse énergie (quelques eV). Dans notre cas, l'ion projectile C^{4+} est chargé positivement et possède une énergie cinétique telle que la section efficace de capture est très basse devant celle d'ionisation de la cible, rendant très peu probable le transfert d'un de ses électrons.

Il est alors intéressant de considérer certaines propriétés thermo-chimiques pour expliquer ce processus de détachement de proton, et notamment l'acidité du système en phase gazeuse [265]. Celle-ci correspond à la différence d'énergie libre de Gibbs entre les produits et les réactants de la dissociation d'un système de type $[\text{M}+\text{nH}]^{n+}$ en $[\text{M}+(\text{n}-1)\text{H}]^{(\text{n}-1)+}+\text{H}^+$ en phase gazeuse.

Des études ont en effet démontré que l'acidité de peptides à 300 K augmente avec le nombre de protons du système. De plus, en phase gazeuse, les valeurs typiques de ces acidités sont comprises entre 8 et 11 eV [266, 267]. Comme les énergies d'ionisation des peptides de la taille du $(\text{PPG})_{10}$ sont situées dans le même ordre de grandeur, voir légèrement plus hautes [106], cela confirme une possible compétition entre l'ionisation et le détachement de proton. Nous reparlerons plus loin de ce processus.

4.2.2 Modèles de la triple hélice

Ces études préliminaires sur les monomères des peptides modèles de la triple hélice du collagène nous ont permis d'explorer les propriétés fondamentales des sous unités de cette triple hélice sous irradiation. La seconde étape de notre démarche est donc de réaliser ces mêmes expériences pour cette structure hélicoïdale particulière.

4.2.2.1 Photo-absorption VUV et RX

Nous avons réalisé nos expériences d'irradiation sur la même gamme d'énergie que pour le monomère : [14 - 531.5] eV. Les résultats présentés concernent cette fois-ci le peptide $(\text{PPG})_{10}$. L'influence des hydroxyprolines sur la réponse du trimère sous irradiation sera étudiée par la suite.

Description des spectres de masses

La figure 4.2.7 présente les spectres de masse du trimère du peptide $[\text{((PPG)}_{10})_3 + 7\text{H}]^{7+}$ après irradiation par des faisceaux de photons de 14, 30, 150, 288 et 531.5 eV. D'après nos études de mobilité ionique (*cf.* chapitre 3), la structure en phase gazeuse de ce système à cet état de charge est une triple hélice. Sur ces spectres, les contributions majeures observées sont identiques à celles du peptide isolé, avec tout d'abord le processus d'ionisation non-dissociatif amenant à la triple hélice radicalaire ionisée $[\text{((PPG)}_{10})_3 + 7\text{H}]^{8+\bullet}$, mais également les fragments b_{3n}^+ et y_{3n}^+ produits par rupture de liaisons peptidiques, et les fragments internes. Ces fragments sont identiques à ceux du peptide isolé. Nous pouvons cependant observer de nouveaux pics, attribués aux monomères, et pour des états de charges de 2 à 4+, provenant de la dissociation de la triple hélice. Cette observation est cohérente avec l'état de charge initial de l'hélice. Si on suppose que les charges sont uniformément réparties sur le peptide, une triple hélice 7+ est donc composée de deux monomères 2+ et d'un 3+. Le monomère 4+ n'apparaît quant à lui de manière intense qu'après absorption d'un photon X, ce qui confirme que la dissociation a lieu après ionisation pour les hautes énergies d'irradiation, comme nous le verrons par la suite.

Les autres contributions observées pour les énergies des rayons-X proviennent de la fragmentation intra-moléculaire. Les spectres de masse sont de nouveau dominés par les séries de fragments b_{3n}^+ et y_{3n}^+ . Les fragments internes de rapport $m/z < 250$ sont également présents.

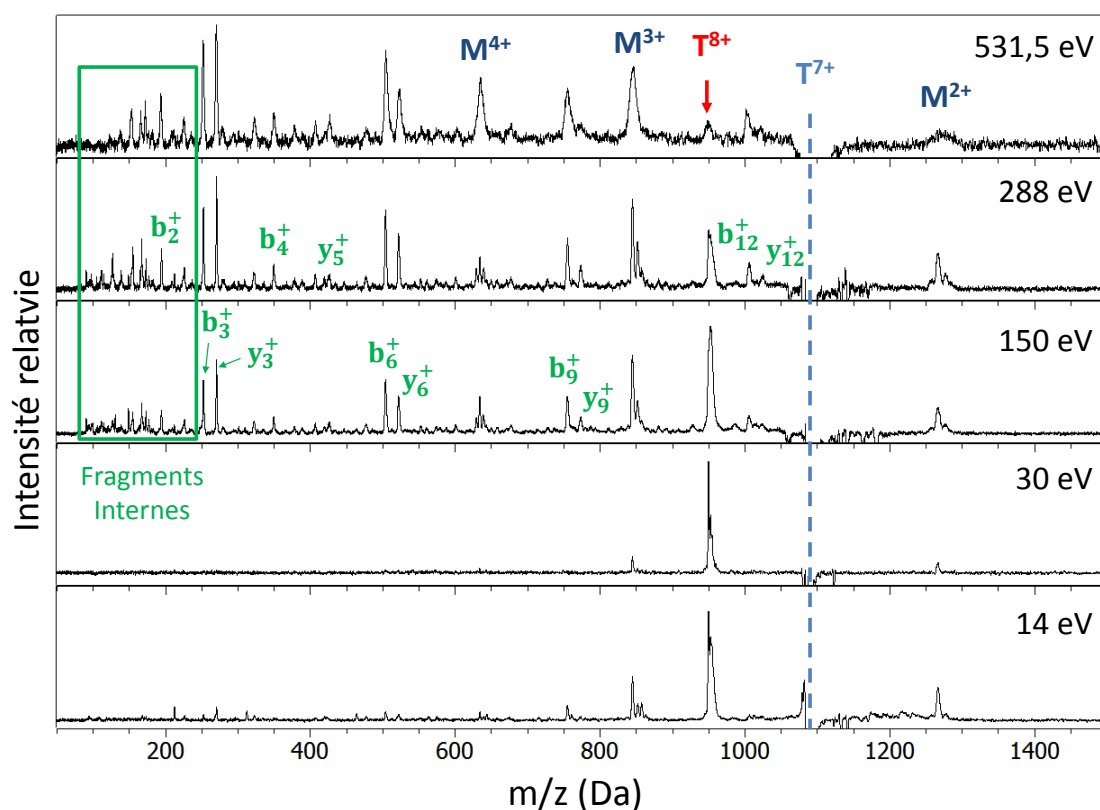


Figure 4.2.7 : Spectres de masse de la triple hélice $[((PPG)_{10})_3+7H]^{7+}$ obtenus après absorption d'un photon de 14, 30, 150, 288 et 531.5 eV. Le peptide ionisé radicalaire intact $[((PPG)_{10})_3+7H]^{8+}$ est indiqué en rouge, les monomères en bleu et les fragments en vert.

Des différences sont tout de même notables avec les spectres de masses obtenus pour le peptide isolé. En effet, même si les fragments observés sont identiques, la fragmentation est plus faible pour le trimère de manière générale. En comparaison avec le peptide isolé, les intensités relatives des fragments de petite masse du trimère sont plus faibles, et celles des fragments lourds sont plus élevées. Ces observations sont cohérentes avec l'augmentation de la taille du système, et avec les nombreuses liaisons hydrogènes entre les trois monomères qui le composent. Ceci implique également que la fragmentation à haute énergie est induite après ionisation par redistribution de l'énergie interne dans les degrés de liberté vibrationnels du système. En effet, ceux-ci sont plus nombreux lorsque le nombre d'atomes augmente, la quantité d'énergie transférée par degré de liberté sera donc plus petite. De même, une partie de cette énergie est utilisée pour rompre les liaisons hydrogènes.

Pour les énergies de rayons-X, nous pouvons nous attendre à observer le processus de double ionisation par émission d'un électron Auger. En effet, ce processus a été observé pour des systèmes de taille similaire, comme l'Ubiquitine [171]. Cependant, suite à la basse résolution en masse, il n'est pas possible de distinguer le pic correspondant au peptide $[((PPG)_{10})_3+7H]^{9+}$, car il possède quasiment le même rapport masse sur charge que le monomère $[((PPG)_{10})+3H]^{3+}$.

Or, nous n'observons pas de différence flagrante sur l'abondance de ce monomère lorsque l'énergie d'irradiation augmente. Cela pourrait signifier que le peptide doublement ionisé ne survit pas de manière intact à cette double ionisation. Son abondance serait donc négligeable devant celle du monomère triplement chargé. Ce processus de double ionisation a tout de même été observé avec une très faible abondance pour la triple hélice $[((PPG)_{10})_3+6H]^{6+}$, comme nous le verrons par la suite.

Évolution des spectres de masse en fonction de l'énergie du photon absorbé

Afin de mieux caractériser les différentes voies de relaxation de la triple hélice, la figure 4.2.8 présente leurs évolutions en fonction de l'énergie du photon absorbé. Comme nous l'avons mentionné lors de l'étude du peptide isolé, les abondances obtenues par irradiations VUV sont normalisées par la perte de l'ion parent, celles obtenues avec les rayons-X le sont par la somme des produits de l'irradiation.

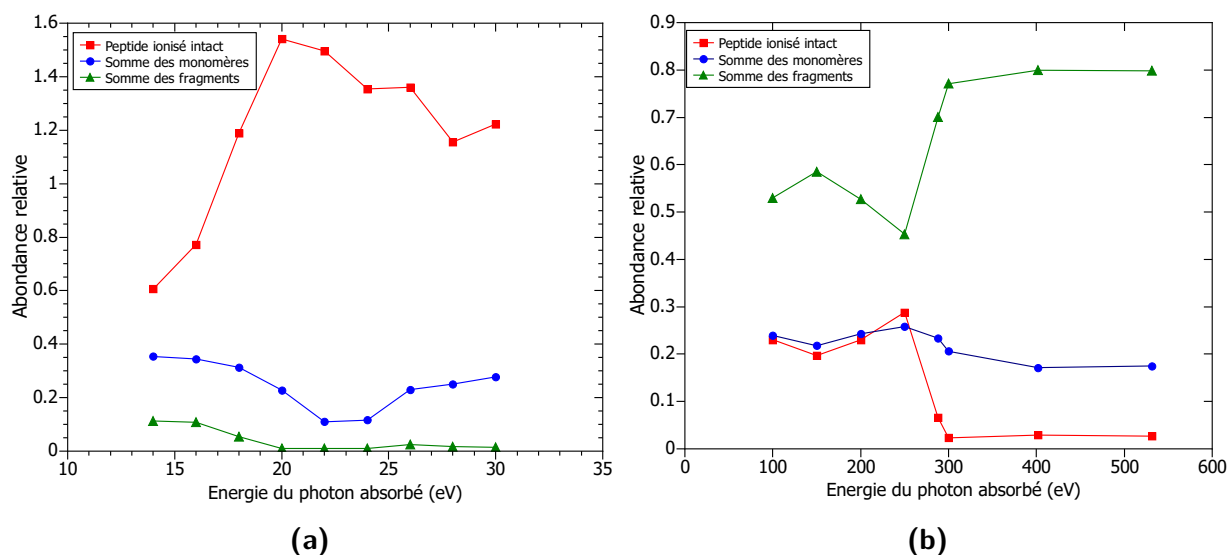


Figure 4.2.8 : Abondance relative des différentes voies de relaxation du $[((PPG)_{10})_3+7H]^{7+}$ en fonction de l'énergie du photon absorbé pour des énergies VUV en (a) et X en (b). Le peptide ionisé radicalaire intact $[((PPG)_{10})_3+7H]^{8+}$ est présenté en rouge, la fragmentation inter-moléculaire est en bleu, et l'intra-moléculaire en vert.

Pour les énergies VUV, le spectre est dominé par l'ionisation non-dissociative du peptide, qui augmente fortement dès 14 eV et atteint son maximum pour une énergie de photon de 20 eV. Il n'est pas surprenant d'observer ce processus car des études ont montré pour d'autres protéines de taille similaire, tels le Cytochrome C et l'Ubiquitine, que leur seuil d'ionisation est inférieur à 14 eV [268]. Sur cette même gamme, les fragments inter- et intra-moléculaires baissent en abondance. Ces tendances opposées ont déjà été observées pour le peptide isolé (figure 4.2.4a), et nous les avons expliquées par le fait que les fragments sont produits par

la photo-excitation du système, sans ionisation, après conversion de l'énergie du photon en énergie interne vibrationnelle. Lorsque l'ionisation se produit, elle ne mènerait donc pas à de la fragmentation.

Pour des énergies supérieures à 22 eV, lorsque la photo-ionisation du système diminue, l'abondance relative des monomères commence à augmenter à partir de 24 eV. La fragmentation intra-moléculaire est quant à elle quasiment nulle entre 20 et 30 eV, avant de devenir la contribution majoritaire pour les énergies de rayons-X. Le fait de ne pas observer cette fragmentation dans cette gamme d'énergie est une différence notable avec les observations réalisées lors de l'irradiation des peptides isolés. Ceci peut s'expliquer par la plus grande taille du système et par l'effet de sa complexation. L'augmentation de l'abondance des monomères à plus basse énergie que les fragments peut être expliquée par l'augmentation du dépôt de l'énergie interne lorsque l'énergie du photon augmente. Et si l'énergie interne vibrationnelle est suffisante après dissociation de l'hélice, les monomères fragmentent à leur tour. Nous pouvons de plus mentionner que nous n'observons ni la présence de dimères, ni des pics pouvant être attribués à des fragments peptidiques d'un premier monomère liés à un second intact. Pourtant dans le cas du dimère de Leucine-Enképhaline sous irradiation par photons VUV, des monomères ont été observés liés à des chaînes latérales d'acides aminés du second monomère, voire même avec ses fragments peptidiques [155, 269].

L'absorption d'un photon X d'une énergie de 288 eV correspond à l'excitation d'un électron 1s d'un carbone vers une orbitale π^* . Cette transition devrait alors être suivie d'une désexcitation Auger [270], menant majoritairement à la simple mais aussi à la double ionisation, et laissant alors le système avec une énergie interne de l'ordre de 20 eV [175]. Cette énergie résiduelle est finalement déposée et distribuée parmi les degrés de liberté du système, et mène à la fragmentation, comme dans le cas de la photo-absorption VUV. De plus, S. Zagorodskikh *et co.* ont montré que la double ionisation de l'acétaldéhyde après photo-absorption à 40.8 et 95 eV (couche profonde de valence) est due à l'émission simultanée de deux électrons [271], donc sans effet Auger. Si nous supposons que le même effet se produit à 150 eV pour les peptides modèles du collagène, et comme nous observons les mêmes pics pour 150 et 288 eV, nous pouvons en déduire que la désexcitation Auger ne joue pas un rôle primordial dans les processus induits par photo-absorption.

Cependant, pour mettre en avant l'apparition de ce processus de double ionisation, nous avons irradié la triple hélice de $(PPG)_{10}$ chargée 6 fois pour des énergies de 288 à 300 eV, par pas de 1.5 eV, car la double ionisation produit la triple hélice 8+, qui possède un rapport masse sur charge non ambiguë. Les spectres de masse contiennent des pics attribués aux mêmes espèces que pour le trimère $[((PPG)_{10})_3 + 7H]^{7+}$. Les abondances relatives ainsi obtenues sont tracées en fonction de l'énergie du photon sur la figure 4.2.9. Il est à noter que le monomère doublement chargé n'est pas présent car il possède le même rapport m/z que l'ion parent et ne peut donc pas être détecté. Par conséquent, la perte s'en trouve très légèrement sous-estimée. La première observation que nous pouvons faire concerne la fragmentation intra-moléculaire, qui représente la contribution principale et reste constante en fonction de l'énergie. Les deux monomères

restent globalement constants également. Par contre, nous constatons des évolutions contraires des abondances des ionisations simple et double non-dissociatives. Alors que l'abondance de la simple diminue progressivement sur la gamme [288 - 300] eV, la double est constante de 288 à 294 eV, augmente nettement de 294 à 297 eV, et reste constante ensuite. Cette évolution est la même que celle observée par A. Milosavljevic *et co.* dans le cas du Cytochrome C 8+ [163]. Le fait de ne pas observer d'augmentation de la fragmentation indique que la double ionisation n'induit pas ce processus, et donc que l'énergie déposée est bien inférieure au cas de la simple ionisation dans cette gamme d'énergie de photon.

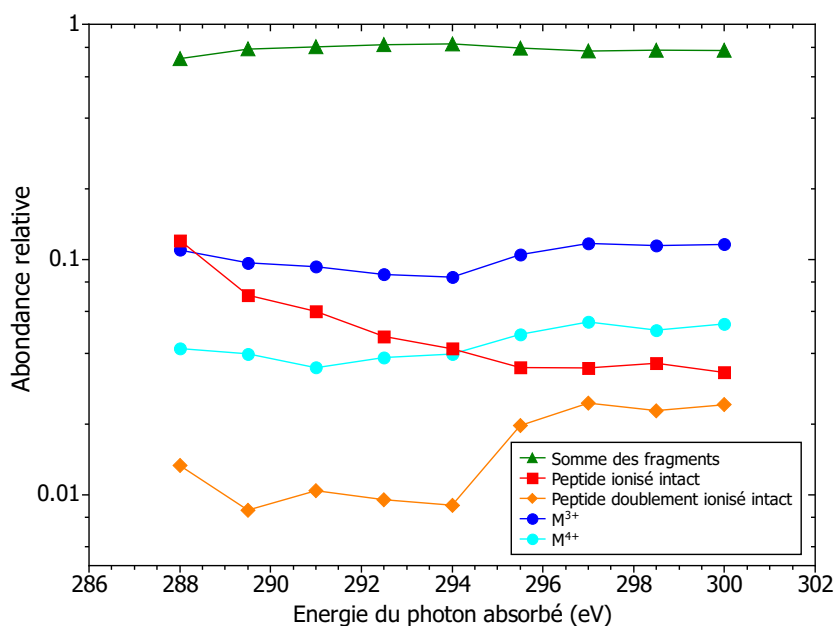


Figure 4.2.9 : Abondances relatives des différentes voies de dissociations du trimère 6+ du peptide (PPG)₁₀ pour des énergies de photon absorbé comprise entre 288 et 300 eV, après normalisation par la somme des espèces produites.

Effet de l'hydroxylation des prolines sur la structure en triple hélice

Contrairement au cas du peptide isolé, nous allons voir ici que l'influence de l'hydroxylation des prolines sur les voies de dissociation de la triple hélice est majeure.

La figure 4.2.10a est un spectre de masse obtenu après absorption d'un photon de 20 eV par la triple hélice $[((\text{PHypG})_{10})_3 + 7\text{H}]^{7+}$. Nous pouvons alors observer qu'à cette énergie, le spectre est dominé par l'ionisation non-dissociative, de la même manière que pour le cas de la triple hélice $[((\text{PPG})_{10})_3 + 7\text{H}]^{7+}$. Les mêmes états de charges des monomères sont présents, de 2 à 4+, cependant une nouvelle contribution qui n'était pas observée pour le peptide (PPG)₁₀ apparaît et est attribuée au dimère 5+. Son état de charge est cohérent avec celui du peptide parent, initialement composé de deux monomères 2+ et d'un 3+.

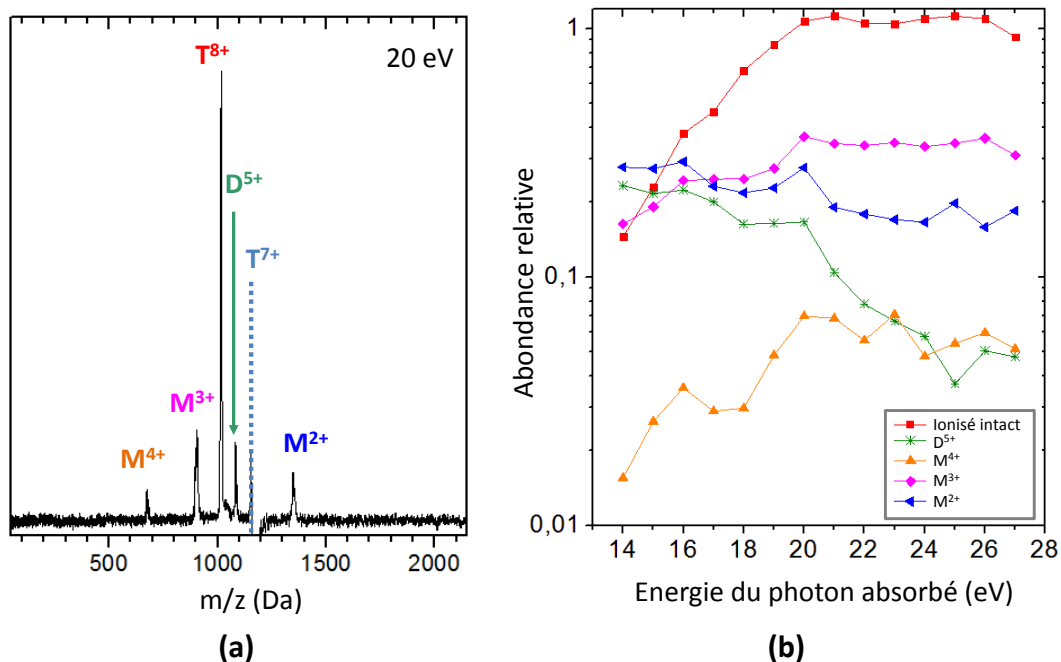


Figure 4.2.10 : (a) : spectre de masse obtenu après irradiation du $[(\text{PHypG})_{10}]_3+7\text{H}]^{7+}$ par des photons de 20 eV. Les espèces produites respectent le même code couleur que pour la figure de droite. (b) : abondance relative en fonction de l'énergie du photon absorbé pour la triple hélice ionisée intacte en rouge, le dimère 5+ en vert, et pour les trois états de charges observés pour les monomères : 4+ en orange, 3+ en rose et 2+ en bleu.

L'évolution des abondances relatives de toutes ces espèces sont représentées en fonction de l'énergie du photon absorbé sur la figure 4.2.10b. Nous pouvons alors remarquer la même augmentation du processus d'ionisation sur la gamme [14 - 20] eV que pour le cas du peptide (PPG)₁₀. Cela signifie que l'hydroxylation des prolines joue un rôle négligeable sur ce processus pour la structure en triple hélice. Au delà de 20 eV, l'ionisation non-dissociative est relativement constante. Concernant les monomères possédant les plus hauts états de charges (3 et 4+), leurs abondance relative suivent la même tendance que celle de l'ionisation sur toute la gamme d'énergie. Ceci indique que ces monomères proviennent d'un processus de fragmentation intermoléculaire induit par l'énergie interne résiduelle du système après sa photo-ionisation.

A 14 eV, le dimère 5+ et le monomère 2+ ont quant à eux une abondance similaire. Ceci est cohérent avec la dissociation du trimère 7+ suite à sa photo-excitation sans ionisation. Lorsque l'énergie du photon absorbé augmente, l'abondance relative du dimère diminue rapidement, alors que celle du monomère baisse de manière beaucoup plus douce. Ceci peut s'expliquer par une transition progressive du processus de photo-excitation vers celui de photo-ionisation. Ce dernier entraîne ainsi la dissociation de la triple hélice en trois monomères uniquement. Par ailleurs, lors de l'ionisation de la triple hélice, il est plus probable que l'électron soit émis d'un monomère 2+ que d'un 3+. En effet, la triple hélice est composée de deux monomères

doublement protonés, contre un unique 3+, et l'énergie d'ionisation du monomère 2+ est plus faible. Ainsi, après ionisation et dissociation du système, le monomère 3+ est observé de manière plus abondante que le 2+.

De plus, nous n'observons pas de fragmentation intra-moléculaire pour cette gamme d'énergie, ce qui constitue une différence majeure avec le peptide (PPG)₁₀. Cette caractéristique, ainsi que la présence de dimères après photo-excitation pour les basses énergies d'irradiation, est une indication de la stabilisation de la structure en triple hélice par l'hydroxylation des prolines. En effet, nous avons vu que dans la littérature, des études de la stabilité de ces deux peptides en phase condensée proposent que les effets stéréoélectroniques induits par l'hydroxylation des prolines augmentent la stabilité de la triple hélice. Nos observations sur les triple hélices isolées sont donc cohérentes avec cette hypothèse, ainsi qu'avec nos mesures précédentes menées au laboratoire ILM (*cf.* chapitre 3).

4.2.2.2 Irradiation par un faisceau d'ions C⁴⁺

Nous allons désormais nous intéresser à l'irradiation de la triple hélice par des ions. La figure 4.2.11 présente une comparaison des spectres de masse du trimère $[((\text{PPG})_{10})_3 + 7\text{H}]^{7+}$ obtenus après irradiation par photons X de 288 eV et par des ions C⁴⁺. En comparaison avec les spectres obtenus pour le monomère, présentés précédemment, nous pouvons remarquer que les mêmes processus contribuent au spectre de masse, à savoir l'ionisation non-dissociative et la fragmentation peptidique. Cependant, comme nous venons de le voir dans le cas de la photo-absorption du trimère, des pics attribués aux états de charges 2, 3 et 4+ des monomères sont également présents. Comme précédemment, ils sont dus à la dissociation de la triple hélice, majoritairement composée de monomères 2+ et 3+. La présence du monomère 4+ confirme alors l'ionisation d'un monomère 3+ de la triple hélice, suivie par la dissociation de cette dernière.

La fragmentation observée sur les spectres de masses de la figure 4.2.11 est similaire, comme c'était également le cas pour les irradiations de monomères. Cependant, la grande différence entre les irradiations par photons et ions réside dans les pics de monomères. En effet la dissociation de la triple hélice est beaucoup plus importante dans le cas des photons, puisque les monomères sont aussi intenses que les fragments alors qu'ils possèdent une abondance beaucoup plus faible après irradiation par des ions.

A l'inverse, il est intéressant de constater que contrairement aux photons, dans le cas des ions C⁴⁺ le pic correspondant au monomère doublement protoné est plus intense que celui du monomère 3+, en prenant en compte la différence d'efficacité de détection. Ceci peut être dû au processus de détachement de proton non dissociatif, qui produit le trimère $[((\text{PPG})_{10})_3 + 6\text{H}]^{6+}$, possédant le même rapport masse sur charge que le monomère doublement protoné. Nous pouvons tout de même mentionner que ce processus de détachement de proton a été observé de manière non ambiguë pour d'autres états de charges de la triple hélice, comme par exemple dans le cas de l'irradiation de la triple hélice $[((\text{PPG})_{10})_3 + 6\text{H}]^{6+}$. Nous avons également pu

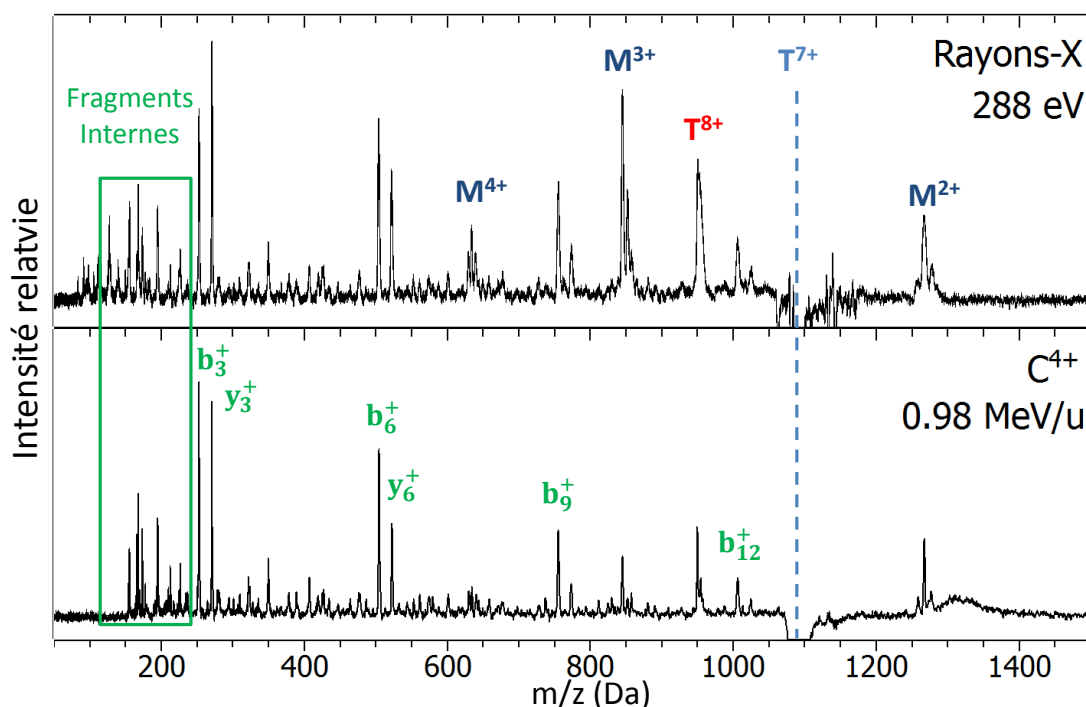


Figure 4.2.11 : Comparaison entre les spectres de masse du peptide modèle de la triple hélice du collagène $[((PPG)_{10})_3+7H]^{7+}$ irradiés par des ions C^{4+} et des rayons-X de 288 eV.

constater que ce détachement de proton non dissociatif est moins probable pour les trimères 5 et 6+ que pour les monomères triplements protonés (cf. figure D.3 de l'annexe D), ce qui semble être en contradiction avec un processus dépendant uniquement du nombre de protons du système, comme l'ont énoncé S. Martin *et co.* [184]. Cependant, une autre explication à cette observation pourrait être que ce détachement de proton induit la dissociation de la triple hélice en monomères. Ceci impliquerait alors que ce processus transfère de l'énergie vibrationnelle au système.

Ces résultats confirment les observations faites lors de nos expériences de mobilité ionique, mais également celles de la littérature : le modèle de la triple hélice du collagène possède une structure dont la stabilité est accrue par l'hydroxylation de ses prolines. Pour poursuivre notre étude, nous avons étudié l'effet de complexation de ces triple hélices lors de l'irradiation de l'hexamère, assemblage de deux triple hélices présenté lors du chapitre 3. Ce dimère de triples hélices peut être vu comme un modèle de la première étape de la formation de la fibre de collagène, et la comparaison de sa réponse sous irradiation avec celle de la triple hélice permettra d'étudier l'influence de la taille du système lorsqu'il est soumis à des rayonnements ionisants.

4.2.3 Dimères de modèles de la triple hélice

Pour ces expériences, les hexamères neuf fois protonés des deux peptides $(PPG)_{10}$ et $(PHypG)_{10}$ ont été irradiés par des rayons-X. Comme nous l'avons vu lors du chapitre 3, ces agrégats sont composés d'un trimère $5+$ et d'un $4+$, contenant respectivement les distributions de monomères $(2,2,1)+$ et $(2,1,1)+$.

La figure 4.2.12 présente les spectres de masse de l'hexamère neuf fois protonés du peptide $(PPG)_{10}$ après absorption d'un photon de 100, 150 et 288 eV. Les mêmes fragments du squelette peptidique que pour les systèmes précédents peuvent être observés. Un pic à l'attribution plus ambiguë est également présent. Il est situé à $m/z = 1519$ et peut donc correspondre à plusieurs espèces. Il n'est effectivement pas possible de discerner l'hexamère ionisé intact H^{10+} et le trimère T^{5+} provenant de sa dissociation en deux triples hélices. Il en est de même pour le monomère doublement protoné et la triple hélice T^{6+} . Cependant, en comparaison avec ce que nous avons observé lors de l'irradiation des trimères (cf. figure 4.2.7) nous pouvons constater ici que la fragmentation du peptide est réduite. Cet aspect peut directement être lié à l'effet de complexation du système, qui permet alors de répartir l'énergie déposée par le photon selon deux fois plus de modes de vibration que dans le cas de la triple hélice.

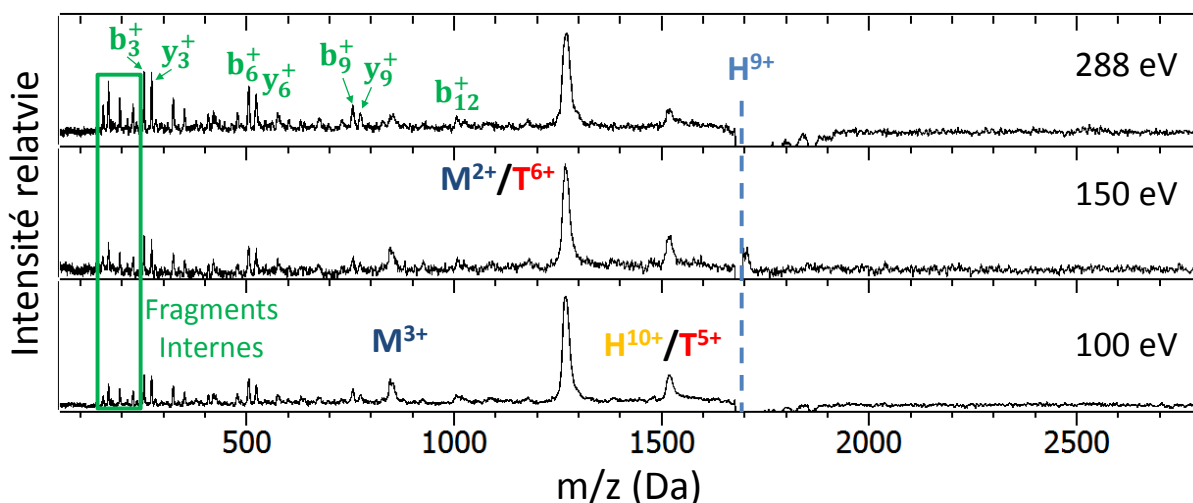


Figure 4.2.12 : Spectres de masse de l'hexamère $9+$ du peptide $(PPG)_{10}$ après absorption d'un photon X de 100, 150 et 288 eV. Le pic attribué à l'hexamère ionisé intact est noté en jaune, ceux des trimères en rouges, les monomères en bleu, et la fragmentation intra-moléculaire en vert.

Cette fragmentation n'est pas majoritaire pour une énergie de 100 eV, mais devient plus présente après l'absorption d'un photon de 288 eV, comme c'était également le cas pour l'irradiation de la triple hélice. Sur toute la gamme d'énergie explorée, le monomère $3+$ semble avoir une abondance en baisse, ce qui est cohérent avec l'augmentation de la fragmentation avec l'énergie déposée dans le système. La contribution majoritaire du spectre de masse reste le pic attribué au monomère $2+$ et à la triple hélice $6+$ provenant de la dissociation du dimère.

Le pic attribué à l'ionisation non-dissociative et au trimère 5+ subit quand à lui une légère baisse sur cette gamme d'énergie, ce qui est là encore sans doute dû à l'augmentation de la fragmentation.

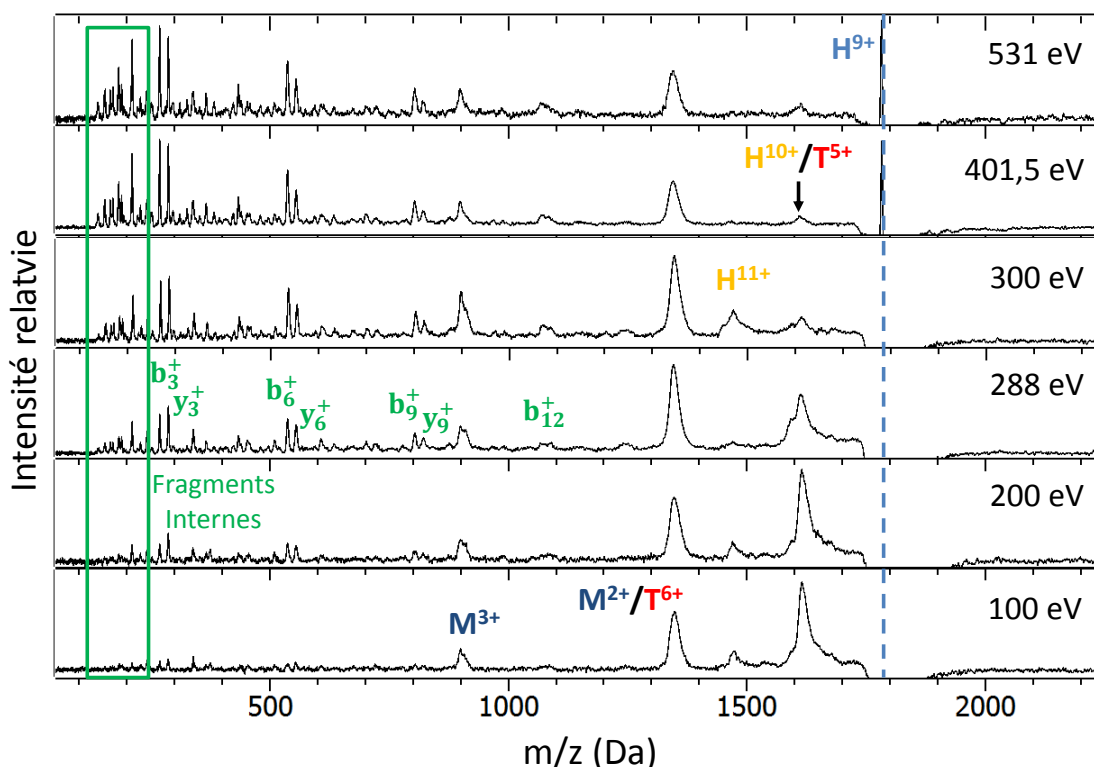


Figure 4.2.13 : Spectres de masse de l'hexamère 9+ du peptide de (PHypG)₁₀ après irradiation par rayons-X de 100, 200, 288, 401.5 et 531 eV. Les notations sont identiques à celles de la figure 4.2.12.

Nous avons ensuite voulu étudier l'effet de l'hydroxylation des prolines sur ces hexamères en irradiant ces derniers par des photons de 100, 200, 288, 401.5 et 531 eV, comme nous pouvons l'observer sur la figure 4.2.13. Au premier abord, les spectres ainsi obtenus sont similaires à ceux présentés pour le (PPG)₁₀. Les fragmentations peptidiques et internes sont très peu prononcées vers 100 eV, mais augmente avec l'énergie des rayons-X. Les monomères et les pics attribués aux triples hélices sont également observables sur toute la gamme d'énergie. Nous observons cependant une baisse d'intensité franche du pic attribué à l'ionisation non-dissociative et au trimère 5+. Par ailleurs pour presque toutes les énergies d'irradiation nous pouvons observer l'hexamère 11+ (H¹¹⁺), c'est à dire l'hexamère 9+ ayant subit une double ionisation non-dissociative. Entre 100 et 288 eV, l'abondance du H¹¹⁺ a tendance à diminuer alors que pour 300 eV, elle devient plus importante que celle de la simple ionisation. Nous pensons que deux processus différents sont à l'origine de cette double ionisation. Le premier est à l'œuvre à 100 et 200 eV : le photon est absorbé par un électron d'une orbitale de valence profonde,

et le réarrangement électronique qui s'ensuit provoquerait l'émission d'un second électron. A 288 eV, dans la majorité des cas, le photon excite un électron 1s du carbone, et un électron Auger est émis. La double ionisation est donc peu probable. Dans le cas de la photo-absorption à 300 eV, cette énergie correspond à l'ionisation du peptide par éjection d'un électron 1s du carbone dans le continuum, suivi par l'émission d'un électron Auger lors du réarrangement électronique. Il est donc cohérent que cette transition entre l'excitation et l'éjection dans le continuum de cet électron 1s soit caractérisée par la baisse de la simple ionisation entre 288 et 300 eV, au profit de la double.

En comparaison avec le peptide non hydroxylé, nous pouvons remarquer que le taux de fragmentation est réduit. De plus, le pic correspondant à H^{10+} ou T^{5+} est beaucoup plus important dans le cas du peptide hydroxylé. Ces différences indiquent que les hydroxyprolines stabilisent la structure de l'hexamère, et il est donc nécessaire d'apporter plus d'énergie interne au système pour le faire dissocier. Cette hypothèse est également appuyée par la présence de l'hexamère H^{11+} pour le peptide hydroxylé. Contrairement au peptide non hydroxylé, l'hexamère du peptide (PHypG)₁₀ survit à cette double ionisation. Cette observation confirme également la plus grande énergie de dissociation de l'hexamère en deux triples hélices en présence des hydroxyprolines après double ionisation. La plus grande stabilité du peptide hydroxylé est probablement due à des liaisons hydrogènes, créées entre les groupes -OH des hydroxyprolines des deux triples hélices [217].

L'irradiation de ces hexamères nous a alors permis d'étudier l'effet de la complexation du système lors d'une photo-absorption X. Nous avons pu non seulement montrer que celle-ci favorise la stabilisation du système moléculaire, mais également que les hydroxyprolines jouent un rôle important dans cette stabilité. Afin d'avoir une meilleure compréhension des différents processus induits par les irradiations d'ions et de photons, nous allons nous intéresser à l'énergie interne déposée lors de ces interactions.

4.2.4 Comparaison de l'énergie interne déposée après irradiations par photons X et C^{4+}

Pour obtenir des informations supplémentaires sur les processus survenant après irradiation des peptides modèles du collagène, pour les monomères et les trimères nous avons représenté sur la figure 4.2.14 les abondances relatives de l'ionisation et du détachement de proton non-dissociatifs, ainsi que celles des sommes respectives des fragments et des monomères en fonction de l'état de charge des peptides. Ces intensités relatives sont alors définies en proportion de la globalité des produits de l'interaction :

$$I = \frac{A_i}{\sum A_i} \quad (4.2.1)$$

Où A_i représente l'intégrale de l'aire sous la courbe du pic i . Nous pouvons mentionner que comme précédemment, ces calculs d'aires sont corrigés par l'efficacité de détection. Dans le cas

des monomères, comme les résultats obtenus pour les deux peptides $(PPG)_{10}$ et $(PHypG)_{10}$ sont très similaires, seuls ceux du peptide hydroxylé sont présentés.

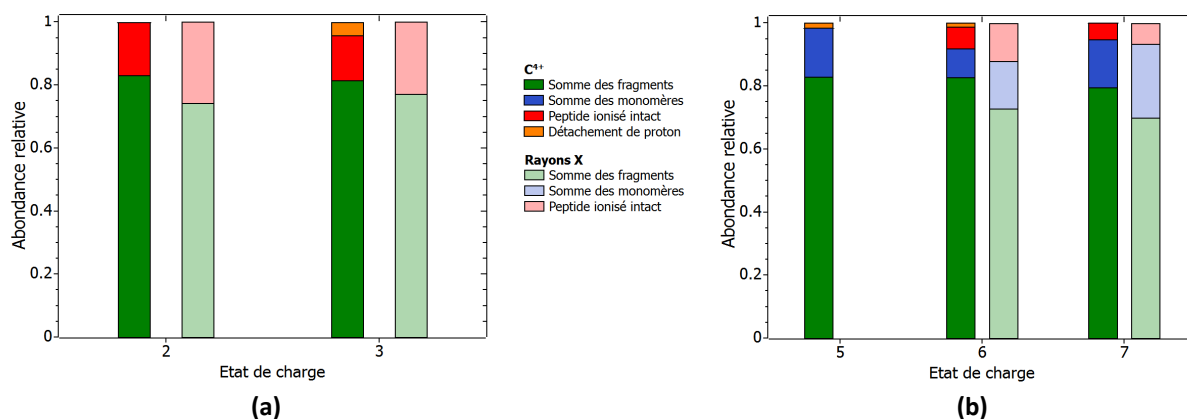


Figure 4.2.14 : (a) : abondances relative du monomère de $(PHypG)_{10}$ en fonction de l'état de charge et après irradiation par des ions C^{4+} et absorption d'un photon de 150 eV. (b) : abondances relative du trimère de $(PPG)_{10}$ pour différents états de charges après irradiation par des ions C^{4+} et absorption d'un photon de 288 eV.

Nous pouvons alors directement remarquer que la fragmentation intra-moléculaire est le processus dominant après irradiation, alors que l'ionisation non-dissociative a une abondance plus faible, que ce soit dans le cas des photons, comme dans celui des ions. Ceci indique que les deux types de particules transfèrent le même ordre de grandeur d'énergie vibrationnelle au système, proche de 20 eV en moyenne, comme nous l'avons déjà mentionné pour un photon absorbé de 288 eV [175]. Dans le cas des photons, la quantité d'énergie transmise peut être ajustée en modifiant leur énergie ou le nombre de photons absorbés. Pour une absorption de photon de 150 eV, l'énergie déposée est donc plus faible, mais nous pouvons nous demander si cette énergie transférée peut être contrôlée dans le cas des ions.

Nous avons alors considéré les aspects théoriques du transfert d'énergie intervenant dans des collisions ion-matière. Pour un ion de charge z et d'énergie cinétique $E_{c_{ion}}$ de l'ordre du MeV, le transfert d'énergie se fait par interaction entre cet ion et un électron du système. Au premier ordre, d'un point de vue classique, cette interaction peut être décrite comme un transfert de moment directement dépendant du paramètre d'impact b . Ainsi, le paramètre d'impact nécessaire pour qu'un électron possédant une énergie de liaison E_l soit éjecté peut être obtenu par la relation suivante [106], avec b en Å, $E_{c_{ion}}$ en MeV/u et E_l en eV :

$$b \simeq 618 \sqrt{\frac{z^2}{E_l \times E_{c_{ion}}}} \quad (4.2.2)$$

Il est alors possible de déterminer ce paramètre d'impact dans notre cas, pour des collisions entre les ions C^{4+} et les peptides. Sur ces derniers, les électrons les moins liés possèdent une

énergie de liaison proche de 10 eV [106], ce qui implique un facteur d'impact $b_{\max} \sim 0.8 \text{ \AA}$. Il est alors nécessaire de distinguer les collisions à courtes et longues distances, où les ions ciblent les électrons des orbitales de valences internes et externes, respectivement. En effet, il a été montré que l'éjection d'un électron d'une orbitale externe mène à un plus faible dépôt d'énergie vibrationnelle que lors de l'éjection d'un électron d'une orbitale interne [272]. Ainsi nous pouvons nous attendre à ce que la quantité d'énergie transférée au peptide lors d'une collision augmente lorsque le paramètre d'impact diminue.

Dans le cas de nos expériences, tous les produits de l'irradiation des peptides contribuent aux spectres de masse, mais nous pouvons tout de même estimer la proportion de collisions faites à courtes ou longues distances. Pour représenter cet aspect nous pouvons schématiser simplement le système moléculaire par un disque qui correspond à la projection de la sphère créée par toutes les orientations possible du peptide. Ainsi, si un ion C^{4+} entre en collision avec ce disque, il a une certaine probabilité d'interagir avec chacun des électrons du système, indépendamment de la taille du disque. A l'inverse, si cet ion passe à très longue distance du disque il n'induit aucune ionisation. Mais dans le cas intermédiaire où l'ion ne traverse pas le disque mais passe autour, dans une couronne entourant ce disque avec un diamètre externe de 3 \AA correspondant environ au rayon de l'orbitale HOMO d'une molécule, des collisions à longues distances interviennent, transférant une faible quantité d'énergie au peptide. En première approximation, la surface de ce disque correspond à la section efficace de collision à basse énergie du peptide avec des atomes d'He, que nous avons obtenus lors de nos expériences de mobilité ionique présentées lors du chapitre 3. Pour rappel, cette section efficace avoisine les 1400 \AA^2 pour le trimère du peptide (PPG)₁₀ protoné 7 fois, contre 425 \AA^2 pour le monomère doublement protoné. Le rapport entre l'aire de cette couronne et l'aire du disque est deux fois plus petite dans le cas du trimère que dans celui du monomère. Ceci signifie que les collisions à longues distances sont moins probables pour la triple hélice que pour le monomère replié sur lui-même. La fragmentation peptidique devrait alors jouer un rôle plus important que l'ionisation dans le cas de la triple hélice.

Au premier abord, les résultats présentés sur la figure 4.2.14 ne semblent pas confirmer cette tendance, car il apparaît que les monomères et les trimères présentent les mêmes taux de fragmentation après irradiation par des ions C^{4+} . Cependant, pour les rayons-X nous observons un effet non négligeable de la complexation du système [273]. Pour les trimères, le dépôt d'énergie doit être plus important (288 eV) pour induire un taux de fragmentation équivalent au cas du monomère (150 eV). Nous avons tout d'abord attribué cela à un effet de la taille du système, qui permet la redistribution de l'énergie vibrationnelle transférée dans trois fois plus de degrés de liberté, mais nous pouvons aussi considérer la dissipation de l'énergie par rupture de liaisons H de la triple hélice. Puisque nos résultats semblent indiquer que les processus principaux induits par l'irradiation des ions carbones et par la photo-absorption X sont équivalents, cette augmentation de l'énergie déposée pour les trimères des peptides observée dans le cas des photons, doit également être présente pour les irradiations par des ions, ce qui est en accord avec l'augmentation de la fragmentation due au dépliement de la structure.

Pour vérifier que la quantité d'énergie vibrationnelle transférée par un ion à un système moléculaire donné peut effectivement être augmentée lors du dépliement de sa structure, des expériences supplémentaires pourraient être réalisées sur différents conformères d'un même peptide, mais cela nécessiterait une sélection, par mobilité ionique par exemple, d'un conformère avant l'irradiation. Une alternative serait le choix d'un système se dépliant significativement avec l'état de charge.

4.3 Conclusion et perspectives

Lors de ce chapitre, nous avons pu caractériser les modèles de triple hélice du collagène sous irradiation par des ions carbonés à l'énergie du pic de Bragg, ainsi que par photo-absorption VUV et X.

L'irradiation des monomères nous a permis de mettre en avant le site de rupture préférentiel de ces peptides, situé sur les liaisons Gly-Pro. Par ailleurs, mis à part la perte de molécules d'H₂O et les substitutions de protons par des ions Na⁺ et K⁺, les hydroxyprolines n'influencent pas la réponse du peptide isolé à ces irradiations, que ce soit avec les ions carbonés, ou pour toutes les énergies de photon utilisées. A partir de 14 eV, lorsque l'énergie du photon augmente il se produit une transition entre les processus de photo-excitation du peptide et sa photo-ionisation. Au delà de 20 eV, la photo-ionisation dépose une quantité d'énergie interne vibrationnelle qui augmente avec l'énergie du photon. L'irradiation avec des ions carbonés à l'énergie du pic de Bragg mène aux mêmes processus qu'après absorption d'un photon X de 150 eV, mais un processus spécifique aux ions existe : le détachement de proton non-dissociatif, qui n'a été observé qu'une fois auparavant. Une manière d'en savoir plus sur celui-ci serait de détecter le proton détaché et de mesurer son énergie.

Lors de l'étude de la triple hélice, nous avons observé cette même transition de la photo-excitation à la photo-ionisation à partir de 14 eV. Au delà de 20 eV, lorsque l'énergie du photon absorbé augmente, la structure en triple hélice est ionisée et se dissocie en ses trois monomères, et ces derniers fragmentent lorsque l'énergie déposée devient suffisante. L'étude du trimère 6+ du peptide (PPG)₁₀ après absorption de photon d'énergie comprise entre 288 et 300 eV par un électron de l'orbitale 1s d'un carbone nous a ensuite permis d'étudier le seuil d'apparition de la double ionisation par effet Auger. Celle-ci reste malgré tout relativement faible en proportion des autres voies de relaxation et n'induit pas d'augmentation de la fragmentation. Le spectre de masse que nous avons obtenu après irradiation de la triple hélice par des ions est similaire à celui obtenu pour des rayons-X de 288 eV. Cependant la dissociation du trimère en monomère est beaucoup plus présente dans le cas des photons, ce qui pourrait signifier que l'irradiation par des ions dépose une plus grande énergie dans le système et mène à sa fragmentation. Comme pour l'irradiation des monomères, le détachement de proton est également visible dans le cas des trimères. L'abondance de ce processus y est cependant réduite, mais cette diminution pourrait indiquer un dépôt d'énergie dans le système important, menant à sa fragmentation. A l'inverse

des observations faites lors de l'irradiation du monomère, nous avons constaté une différence de la réponse à l'irradiation des photons VUV lorsque le peptide est hydroxylé. En effet, il est possible de discerner des dimères, provenant de la dissociation de la triple hélice après sa photo-excitation. Ceux-ci étaient totalement absents des spectres obtenus pour le peptide (PPG)₁₀ et confirment qu'il faut apporter plus d'énergie au système afin de le dissocier en ses trois monomères.

Nous avons alors poursuivi notre étude en caractérisant les hexamères sous irradiation de photons X. Plusieurs aspects intéressants ont alors été relevés. Tout d'abord, pour le peptide non hydroxylé, nous constatons que de manière générale la fragmentation est diminuée en comparaison avec la simple triple hélice. Ceci peut s'expliquer par un effet de complexation du système, qui tend à le stabiliser. Dans le cas du peptide hydroxylé, cette fragmentation est encore plus réduite, mais la différence majeure entre les deux peptides réside dans l'observation de l'hexamère doublement ionisé. Ces deux faits vont dans le sens de la stabilisation du système induite par la présence des hydroxyprolines. Cependant, contrairement au cas de la triple hélice, celle-ci est sans doute induite par des liaisons hydrogènes entre les hydroxyprolines des deux triples hélices présentes dans le dimère.

Cette étude a finalement permis de caractériser un peptide modèle de la triple hélice du collagène en phase gazeuse, de son aspect le plus fondamental (la sous unité) au dimère de triples hélices. Celui-ci constitue un modèle de la première étape de la formation de la fibre de collagène. Il serait alors intéressant de poursuivre les recherches dans cette direction en étudiant des agrégats de triples hélices plus gros. De plus, lors de notre étude, nous nous sommes intéressés à une large gamme d'énergie de photons, mais uniquement à des ions d'énergie similaire à celle utilisée lors de l'hadronthérapie. Nous pouvons alors nous demander comment ces différents peptides peuvent réagir suite à l'irradiation d'ions de plus basse énergie, comme par exemple celle que peuvent avoir les ions carbonés d'un faisceau thérapeutique à la fin du pic de Bragg, ou celle des ions secondaires créés sur la trajectoire de ce faisceau primaire. C'est dans cette optique que le dispositif PIBALE a été développé au sein de notre laboratoire. Au terme de son développement, celui-ci devrait permettre la détection en coïncidence des produits de l'interaction en faisceaux croisés entre des ions moléculaires en phase gazeuse et un faisceau atomique monochargé ayant une énergie de l'ordre du keV.

Développement du dispositif expérimental PIBALE

5

Sommaire

5.1	Présentation du dispositif expérimental	90
5.1.1	Production, sélection et transport des ions moléculaires	92
5.1.2	Piégeage, extraction et détection	93
5.1.2.1	Piégeage et formation d'un paquet d'ion	94
5.1.2.2	Zone d'interaction et caractérisation du paquet d'ions	96
5.1.3	Faisceau d'ions projectiles	97
5.1.4	Spectromètre de masse à temps de vol	98
5.1.5	Cycle d'acquisition	100
5.2	Développement et optimisation d'un groupeur d'ions	101
5.2.1	Principe d'un groupeur d'ions	102
5.2.2	Mise en place des simulations	103
5.2.3	Comparaison des mesures expérimentales et des simulations	105
5.2.4	Influence de la charge d'espace sur l'utilisation du groupeur	108
5.3	Irradiation du peptide Leucine-Enképhaline protoné par un faisceau d'He⁺ à 7 keV	109
5.3.1	Présentation du système moléculaire	109
5.3.2	Analyse des résultats de l'expérience	110
5.3.3	Mesure et estimation du taux de comptage	113
5.4	Mise en phase gazeuse et irradiation du peptide modèle de collagène	114
5.4.1	Étude des conditions de source sur le faisceau de molécules	115
5.4.2	Irradiation du peptide (PPG) ₁₀ doublement protoné par un faisceau d'ions He ⁺	116
5.4.3	CID des molécules dans le piège de Paul	118
5.5	Conclusion	121

L'étude de l'interaction entre des molécules isolées en phase gazeuse et des ions atomiques est un champ d'investigation qui a été exploré durant les dernières années, afin de sonder les propriétés physico-chimiques de ces molécules. L'isolation en phase gazeuse de ces dernières permet de s'affranchir des effets de solvants et d'environnement afin de se consacrer aux propriétés intrinsèques du système irradié. La plupart de ces expériences ont été réalisées sur des molécules cibles neutres dans une configuration en faisceaux croisés, avec une spectrométrie de masse par temps de vol des produits de l'interaction [193–196, 199, 203, 274]. De telles expériences permettent l'utilisation de mesures en coïncidences pour obtenir, entre autres, l'état de charge de la molécule avant sa fragmentation, mais également la détection des électrons émis [190, 275], celle de la charge des fragments [185, 276], et de la charge finale de l'ion projectile [177, 191, 192]. Cependant, ces expériences sont limitées à des systèmes moléculaires de petites tailles et résistant aux techniques de mise en phase gazeuse par évaporation thermique. Nous pouvons par exemple citer le cas des nucléobases de l'ADN [187, 193], ou des acides aminés [189, 195].

Depuis, les irradiations de molécules d'intérêt biologique de tailles variables, protonées ou déprotonées, ont été étudiées, à l'aide notamment des techniques de mise en phase gazeuse présentées dans le chapitre 2, telles que les sources ESI et MALDI. Des dispositifs, tels que celui utilisé lors du chapitre 4, permettent l'irradiation de molécules sélectionnées en masse. Que ce soit par photons ou par ions, ces irradiations sont généralement effectuées dans un piège, soit un piège de Paul tridimensionnel comme sur le dispositif Paultje, soit un piège linéaire. Cependant, les irradiations de molécules dans un piège ne permettent pas la mise en place de mesures en coïncidence.

Le dispositif PIBALE a alors été développé pour appliquer les techniques de mesures en coïncidences propres aux cibles de molécules neutres, dans le cas d'irradiation de molécules chargées d'intérêt biologique de tailles plus conséquentes. Le développement de ce dispositif a récemment fait l'objet d'une publication [277] et a été décrit en détails dans la thèse de L. Schwob [66].

Dans ce chapitre, nous verrons dans un premier temps la description générale du dispositif, puis les modifications apportées lors de son développement durant cette thèse. Nous finirons alors par voir les premiers résultats d'irradiation obtenus, avec notamment l'irradiation du peptide modèle de la triple hélice du collagène.

5.1 Présentation du dispositif expérimental

Le dispositif PIBALE (*Plateforme d'Irradiation de Biomolécules et d'Agrégats Libres et Environnés*) est illustré sur la figure 5.1.1. Les molécules cibles protonées sont produites par une source ESI et guidées par deux octopôles vers un analyseur en masse quadripolaire. Les ions arrivent à un déviateur à 90° qui évite la présence des molécules neutres produites par la source dans la suite du dispositif. Ce déviateur dirige le faisceau de molécules protonées, soit

vers un détecteur qui permet de mesurer son intensité, soit vers la zone d'interaction. Dans ce cas, les ions sont d'abord injectés en continu dans un piège de Paul tridimensionnel rempli de gaz d'hélium, et accumulés pendant environ 100 ms. Le paquet d'ions ainsi formé est ensuite extrait et les ions sont alors guidés par des lentilles électrostatiques, avant d'arriver finalement dans la zone d'interaction pour y être irradiés par le faisceau projectile.

La détection en coïncidence des fragments cationiques produits après interaction est réalisée grâce à un spectromètre de masse à temps de vol de type Wiley - McLaren [64], couplé avec un détecteur sensible en position, nommé DSP_{ToF} sur la figure 5.1.1. Une interaction en faisceaux croisés, comme celle réalisée sur le dispositif PIBALE, permet la mesure en coïncidence des fragments mais requiert que le faisceau de molécules cible ait une énergie relativement faible (≈ 20 eV) afin de s'assurer que les produits cationiques de l'interaction soient extraits dans le spectromètre et détectés.

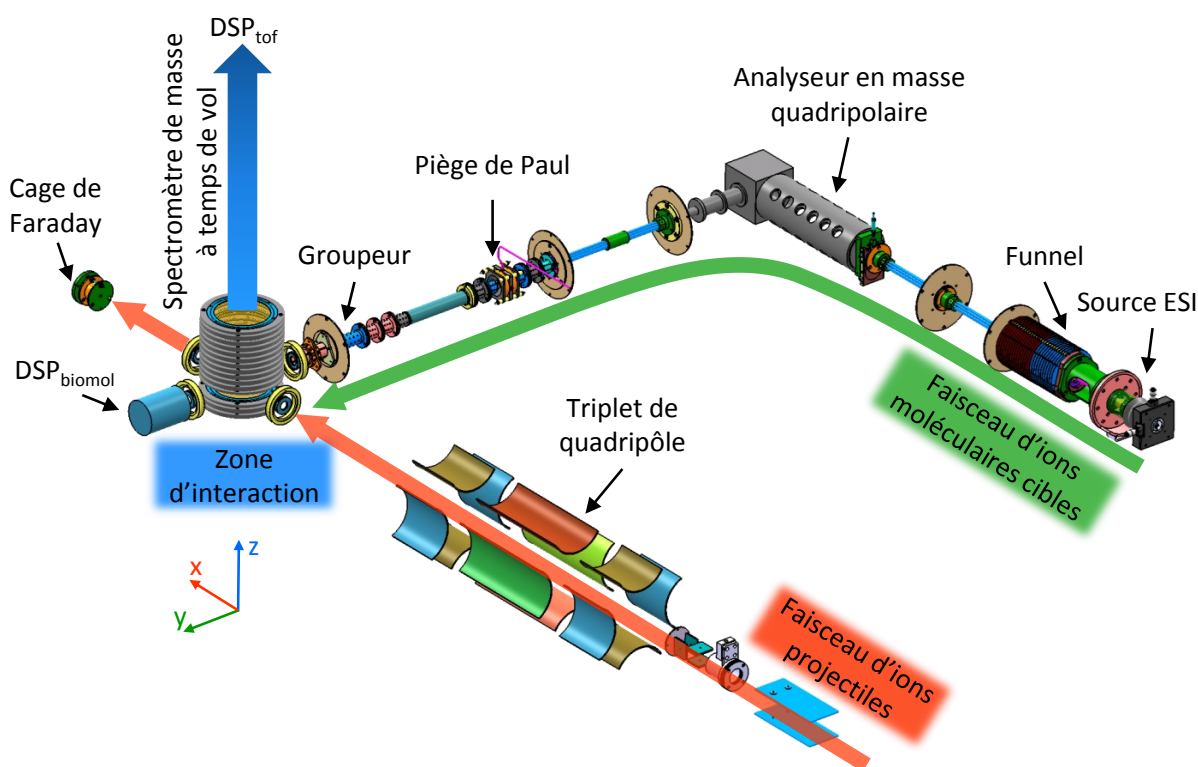


Figure 5.1.1 : Schéma du dispositif PIBALE.

Un second détecteur sensible en position est également présent sur le dispositif. Il est situé après la zone d'interaction sur la trajectoire des ions moléculaires, et est appelé DSP_{Biomol} . Il permet la caractérisation du faisceau de molécules cibles à la sortie du piège à ions. Il est possible d'obtenir l'intensité, la taille, la position et la distribution en énergie du paquet d'ions.

Le faisceau projectile est créé par une source ECR Mono1000, mis en forme par un triplet de quadripôles et traverse la zone d'interaction perpendiculairement à l'axe de propagation des

ions moléculaires.

Pour plus de clarté par la suite, un repère orthonormé définit les axes du dispositif : l'axe x correspond à la direction du faisceau projectile, l'axe y à celle de propagation des biomolécules et l'axe z à l'extraction des fragments.

5.1.1 Production, sélection et transport des ions moléculaires

Cette première partie du dispositif expérimental, schématisée sur la figure 5.1.2, permet la mise en phase gazeuse des molécules, ainsi que leur transport jusqu'à l'analyseur en masse quadripolaire. Elle forme également des étages successifs de pompage différentiel. Les pressions obtenues dans chacune des chambres sont indiquées sur le schéma.

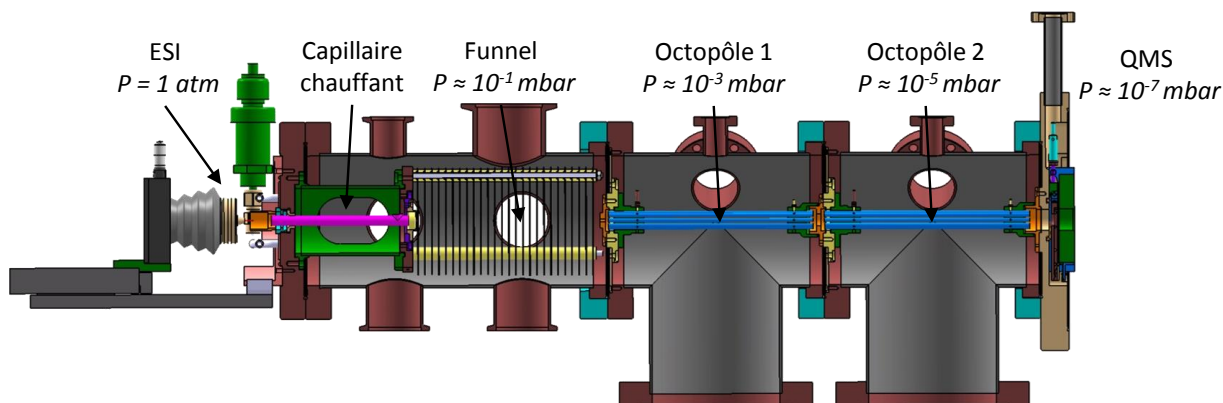


Figure 5.1.2 : Schéma de la première partie du dispositif PIBALE, avec la source ESI à gauche et le QMS à droite. Les pressions dans chaque chambre sont indiquées.

La source ESI présente sur le dispositif PIBALE a été construite au sein du laboratoire selon le modèle développé à l'université d'Aarhus au Danemark [278], et est similaire à celle du dispositif Paultje.

Une fois les molécules en phase gazeuse, elles sont guidées par le biais de différents éléments : un funnel et deux octopôles, séparés par des diaphragmes. Des potentiels RF de 1 MHz de fréquence et d'amplitudes crêtes respectives de 900 et 1100 $V_{c.\grave{a}.c}$ sont appliqués sur les octopôles, en plus d'un potentiel statique ajustable indépendamment. Nous pouvons noter que la pression dans la chambre du premier octopôle ($\sim 10^{-3} \text{ mbar}$) est suffisamment basse pour que le libre parcours moyen des ions soit de l'ordre de la dizaine de centimètres. Ainsi, la probabilité de collisions avec le gaz résiduel devient suffisamment faible pour que leur énergie potentielle puisse directement être convertie en énergie cinétique dans une zone sans champ électrique. Cette énergie peut être estimée par $q \cdot U_{\text{oct}1}$, avec $U_{\text{oct}1}$ le potentiel statique appliqué sur cet octopôle. Celui-ci est fixé entre 15 et 25 V.

À la sortie des octopôles, les ions entrent dans un spectromètre de masse quadripolaire (QMS) commercial (EXTREL), qui fonctionne pour une gamme de masses allant de 0 à

4000 Da avec une résolution maximale donnée par le constructeur de $m/\Delta m = 10\,000$.

Une fois sélectionnés, les ions moléculaires arrivent à un déviateur électrostatique à 90° . Celui-ci permet de diriger le faisceau vers un détecteur, ou bien vers le piège et la zone d'interaction. Ce détecteur, composé d'une plaque de conversion et d'un channeltron, permet de mesurer l'intensité absolue du faisceau d'ions moléculaires formés par la source ESI et sélectionnés par le QMS. Cette information est utilisée par la suite pour calculer l'efficacité de piégeage et de transport des ions dans la zone d'interaction. L'intensité typique des ions sélectionnés en masse est de l'ordre de la dizaine de pico-ampères.

5.1.2 Piégeage, extraction et détection

Lorsque le déviateur à 90° dirige le faisceau d'ions moléculaires vers la zone d'interaction (ZI), celui-ci va traverser un troisième octopôle (1 MHz, 700 V_{c.à.c.}) avant d'être focalisé par trois électrodes pour optimiser son injection dans le piège, comme nous pouvons le voir sur la figure 5.1.3. La première de ces électrodes permet également de contrôler la durée d'injection des ions dans le piège, en pulsant une tension à une valeur suffisamment haute pour bloquer les ions le reste du temps. A la sortie du piège, les ions seront une nouvelle fois guidés par des optiques avant d'atteindre la zone d'interaction. Comme nous allons le voir par la suite, du gaz tampon est injecté dans le piège pour thermaliser les ions. Les pressions indiquées sur cette figure sont celles obtenues lors d'un fonctionnement normal de piégeage et d'injection de gaz.

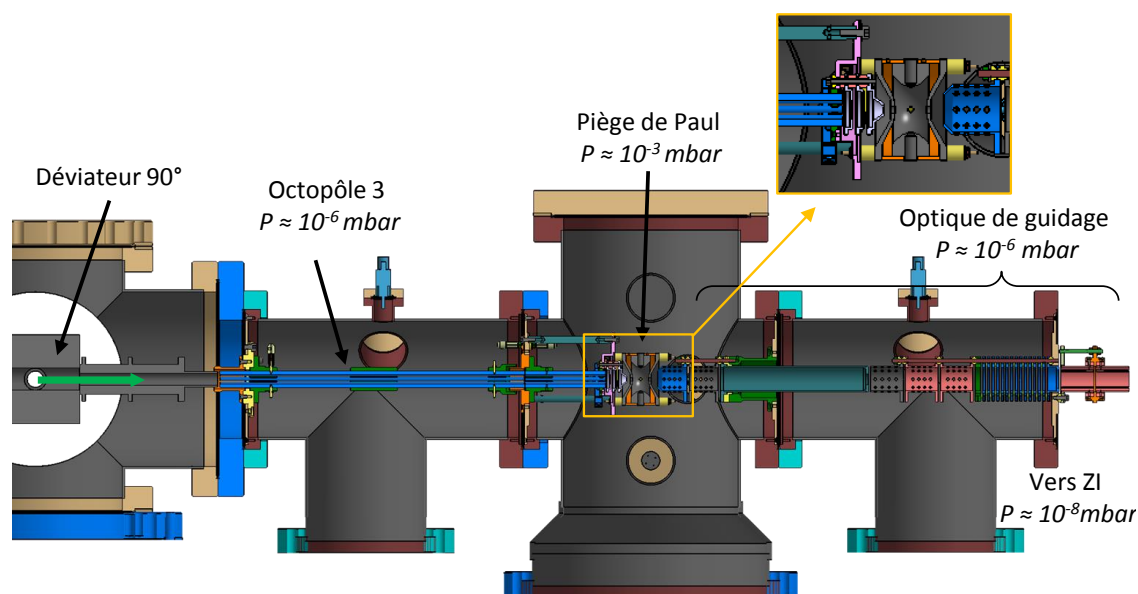


Figure 5.1.3 : Schéma de la seconde partie du dispositif PIBALE, avec le piège à ions et les optiques de guidage amenant à la zone d'interaction. Les pressions des différentes chambres lors de l'injection de gaz dans le piège sont également indiquées.

5.1.2.1 Piégeage et formation d'un paquet d'ion

Le piège à ions utilisé sur le dispositif PIBALE est un piège de Paul tridimensionnel caractérisé par les dimensions suivantes : $r_0 = 10$ mm et $z_0 = 7$ mm. La composante sinusoïdale appliquée sur l'anneau central est fixée à une fréquence de 1 MHz et possède une amplitude crête ajustable entre 0 et 4000 V.

La tension U_{bias} est fixée de sorte que l'énergie cinétique des ions soit faible à leur entrée dans le piège. Elle est alors ajustée 1 ou 2 V plus bas que la tension U_{oct1} de l'octopôle 1, limitant ainsi la dissociation induite par collisions sur le gaz tampon à l'injection des ions.

Ce gaz est présent dans le piège afin de thermaliser les ions en dissipant leur énergie cinétique résiduelle par collisions élastiques. Pour ce faire, les atomes de ce gaz tampon doivent posséder une masse beaucoup plus faible que celles des ions à piéger, et la pression doit être suffisamment élevée pour que le libre parcours moyen des ions soit inférieur aux dimensions du piège [48]. De l'hélium est utilisé à une pression avoisinant les 10^{-1} mbar.

Le chronogramme d'un cycle typique de période T_{cycle} (~ 200 ms) est présent sur la figure 5.1.4. Le gaz tampon d'hélium est injecté dans le piège pendant la première moitié du cycle. Les ions moléculaires sont injectés en continu pendant cette même durée. Dans certains cas cependant, il est souhaitable de diminuer le nombre d'ions piégés, en ajustant le temps Δt_{inj} d'injection. L'extraction des ions du piège se fait lors de la seconde partie du cycle, après un temps $\Delta t \sim 90$ ms nécessaire pour s'assurer que le gaz d'hélium ait été correctement pompé, afin de limiter les collisions des ions sur celui-ci.

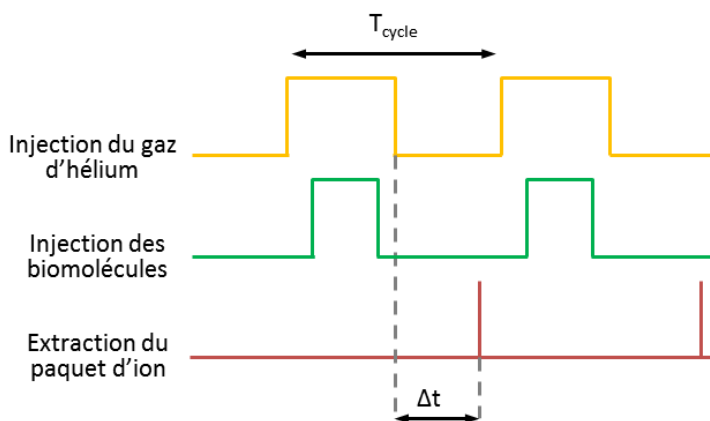


Figure 5.1.4 : Chronogramme de deux cycles consécutifs avec en jaune l'injection du gaz dans le piège, en vert, celle des ions, et en rouge, le début de l'extraction des ions du piège.

Par ailleurs, L. Schwob a montré que le phénomène de charge d'espace influe de manière importante sur la taille du nuage [66]. Ainsi, lorsque le nombre d'ions injectés augmente, la densité de charges au centre du piège devient de plus en plus importante, et la répulsion coulombienne entre les ions induit un élargissement du nuage d'ions piégés. Il existe alors un nombre

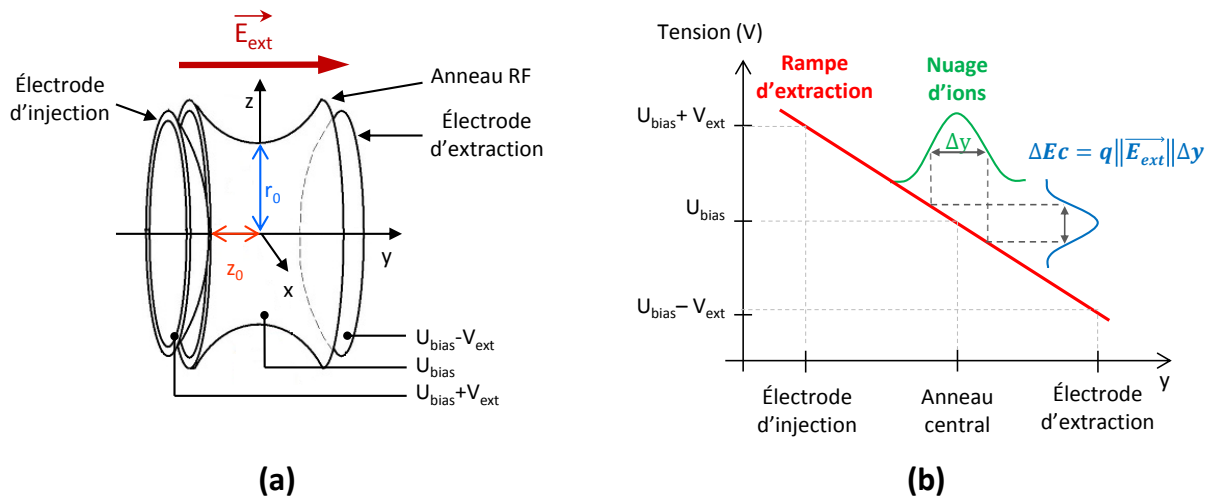


Figure 5.1.5 : (a) : schéma des électrodes du piège de Paul. Les potentiels appliqués dans le cas de l'extraction des ions positifs du piège sont mentionnés. (b) : graphique de l'influence de la rampe d'extraction appliquée entre les électrodes d'injection et d'extraction, sur les dispersions en position et en énergie du paquet d'ions.

limite d'ions pouvant être contenu dans le piège. Celui-ci a été estimé expérimentalement à quelques 10^5 ions, ce qui est cohérent avec la littérature [45]. Pour une intensité de faisceau de 10 pA, le piège est rempli pour une durée d'injection d'environ $\Delta_{inj} = 100$ ms ($T_{cycle} = 200$ ms).

Afin d'extraire les ions, la tension RF est coupée et un champ électrique de quelques volts par millimètre est créé en appliquant les tensions $U_{bias} + V_{ext}$ et $U_{bias} - V_{ext}$, respectivement sur les électrodes d'injection et d'extraction, comme le précise la figure 5.1.5a. L'énergie moyenne des ions sera donc fixée par la tension U_{bias} ($E_{c,moy} = q \cdot U_{bias}$), et il est également possible de déterminer la dispersion en énergie cinétique à mi hauteur du paquet : $\Delta E_c = q \cdot \|\vec{E}_{ext}\| \cdot \Delta y$. Cette relation est obtenue en faisant deux approximations : tout d'abord en considérant que les ions sont sur l'axe y, où le champ électrique est homogène, et ensuite en négligeant leur vitesse initiale, par rapport à celle qu'ils acquièrent lors de l'extraction du piège. Comme l'illustre la figure 5.1.5b, Δy correspond à la taille du paquet d'ion dans le piège à l'instant de son extraction. Ainsi, plus le champ d'extraction est fort, plus la dispersion en énergie du paquet d'ions sera importante. De plus, les ions situés à l'arrière du paquet, vers l'électrode d'injection, auront une vitesse plus importante une fois sortis du piège, que ceux situés à l'avant, près de l'électrode d'extraction. Le long de leur trajet vers la zone d'interaction, les ions les plus rapides vont rattraper puis devancer les plus lents, pour finalement se retrouver à l'avant du paquet d'ions. Cette dispersion en énergie du paquet d'ions induit donc une dispersion en position selon leur axe de propagation. Comme nous souhaitons avoir la densité d'ions la plus élevée possible dans la zone d'interaction, il est nécessaire d'utiliser une valeur du champ d'extraction du piège la plus petite possible. Par ailleurs, si ce champ est trop faible, l'influence des vitesses initiales

des ions sur leur trajectoire à l'extraction du piège n'est plus négligeable et conduit notamment à une diminution de l'efficacité d'extraction. Pour ces raisons, nous avons choisi de fixer V_{ext} à 40 V, ce qui correspond à un champ électrique de $5.7 \text{ V}\cdot\text{mm}^{-1}$.

Finalement, les ions sont de nouveau guidés par différentes optiques, comme nous pouvons le voir sur la figure 5.1.3. A partir de l'entrée de la zone d'interaction, dont le centre est situé à une distance de 529 mm de celui du piège, les ions sont en vol libre. Afin de corriger les éventuels défauts d'alignement du dispositif, la dernière lentille de guidage est segmentée en 4 électrodes et permet une déviation du faisceau dans les plans X et Z.

Les ions arrivent au centre de la zone d'interaction avec une énergie cinétique proche de $q\cdot U_{\text{bias}}$, avec q leur charge. La transmission totale depuis le QMS jusqu'au détecteur caractéristique DSP_{Biomol} est de l'ordre de 1 ou 2%.

5.1.2.2 Zone d'interaction et caractérisation du paquet d'ions

La zone d'interaction est le point de rencontre entre les faisceaux cible et projectile, comme nous pouvons le voir sur la figure 5.1.6. Afin de réaliser les expériences en faisceaux croisés, il est également important de connaître les caractéristiques propres au paquet d'ions extrait du piège, tels que sa forme et son temps de vol du piège jusqu'au centre de la zone d'interaction. Ainsi, le DSP_{Biomol} de 40 mm de diamètre est situé à une distance de 295 mm du centre de la zone d'interaction selon la trajectoire des ions moléculaires. Ce type de détecteur plan permet de définir le point d'impact d'une particule sur sa surface, par association de galettes à micro-canaux et d'anodes à lignes à retard [279–282], afin de réaliser une imagerie du faisceau de particules de faible intensité (de l'ordre de 10^6 particules par seconde). Dans notre cas, le DSP_{Biomol} est nécessaire pour déterminer le nombre d'ions par paquet et la forme de celui-ci, mais également le temps de vol des ions depuis leur extraction du piège jusqu'à leur détection, ainsi que leur distribution en énergie, comme nous le détaillerons par la suite.

Pour chaque ion qui atteint la surface de la galette, une cascade d'électrons est créée. Les efficacités géométriques des galettes utilisées sont de l'ordre de 50% [283, 284], mais l'efficacité totale dépend de la masse et de l'énergie des particules incidentes. Pour une énergie d'environ 20 eV et des masses de quelques centaines de Da, l'efficacité de détection est extrêmement faible. Un fort champ électrique de post-accélération est appliqué pour donner une plus grande énergie cinétique aux ions au moment de l'impact sur la surface de la galette. Sur le DSP_{Biomol}, une tension de -2500 V est appliquée sur la face avant du détecteur. Ainsi, pour une énergie de 2500 eV, l'efficacité de détection est maximale pour les rapports masse sur charges inférieurs à 200 Da.

De plus, quatre grilles fixes sont positionnées devant le détecteur afin d'isoler le champ électrique de post-accélération de la zone de vol libre. La transmission totale de ces grilles est de 4%. Elles sont également accompagnées de grilles escamotables, de transmission respectives de 10 et 1%, qui permettent de réduire l'intensité des ions qui arrivent sur le détecteur afin de pouvoir fonctionner sur une grande gamme d'intensité, en limitant les effets de saturation

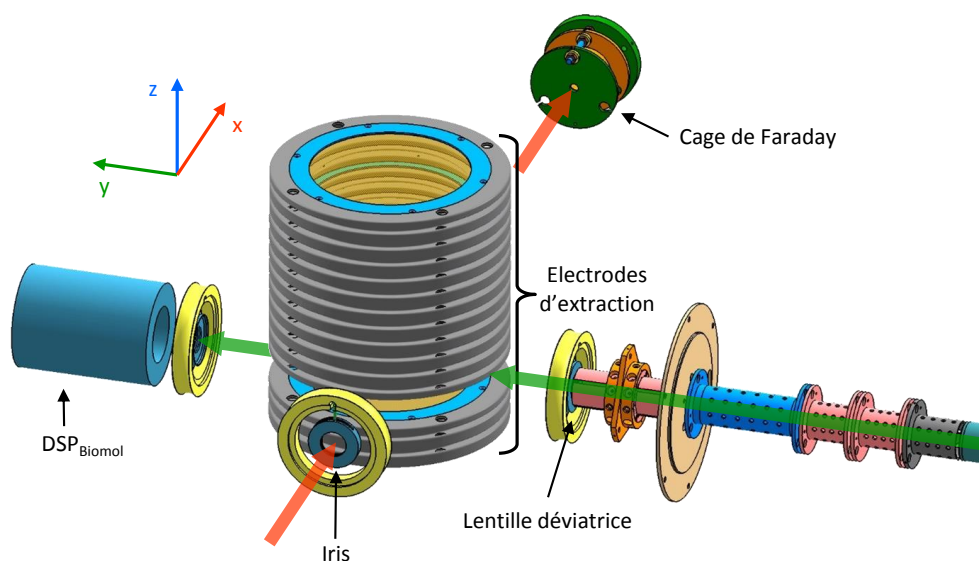


Figure 5.1.6 : Schéma de la zone d'interaction avec le faisceau d'ions moléculaire en vert selon l'axe y et les ions projectile en orange selon l'axe x. La cage de Faraday et le DSP_{Biomol} sont également indiqués.

de détection.

La distribution en énergie du paquet d'ions est aussi mesurée de manière indirecte sur le DSP_{Biomol} selon le principe du champ retardateur [285, 286], en utilisant le jeu de grilles situé devant le détecteur. En laissant les deux grilles externes à la masse, et en appliquant un potentiel U_G sur les deux grilles internes, ces dernières vont agir comme une barrière de potentiel pour les ions possédant une énergie cinétique inférieure à $q \cdot U_G$. En mesurant ainsi le nombre d'ions en fonction de la valeur du potentiel électrique U_G , il est possible de déterminer la distribution en énergie du paquet d'ions moléculaires.

5.1.3 Faisceau d'ions projectiles

Le faisceau d'ions projectiles est créé par une source d'ions Mono1000 [287], présentée sur la figure 5.1.7, qui a été développée au GANIL. Cette source ECR fonctionne à une fréquence de 2,45 GHz, pour une puissance nominale de 300 W et permet d'obtenir des faisceaux atomiques monochargés à partir de gaz d'hélium ou d'argon. Dans le cadre de cette thèse, nous avons uniquement utilisé un faisceau d'hélium monochargé de 7 keV, et de 100 μA d'intensité dans la zone d'interaction.

Cette source ECR est composée d'une cavité en cuivre, entourée de deux aimants annulaires permanents. Une électrode plasma de 3 mm de diamètre interne est utilisée pour extraire les ions tout en limitant l'émittance du faisceau. Il est à noter que la géométrie de la source, et notamment la distance entre l'électrode plasma et les électrodes d'extraction, limite l'énergie

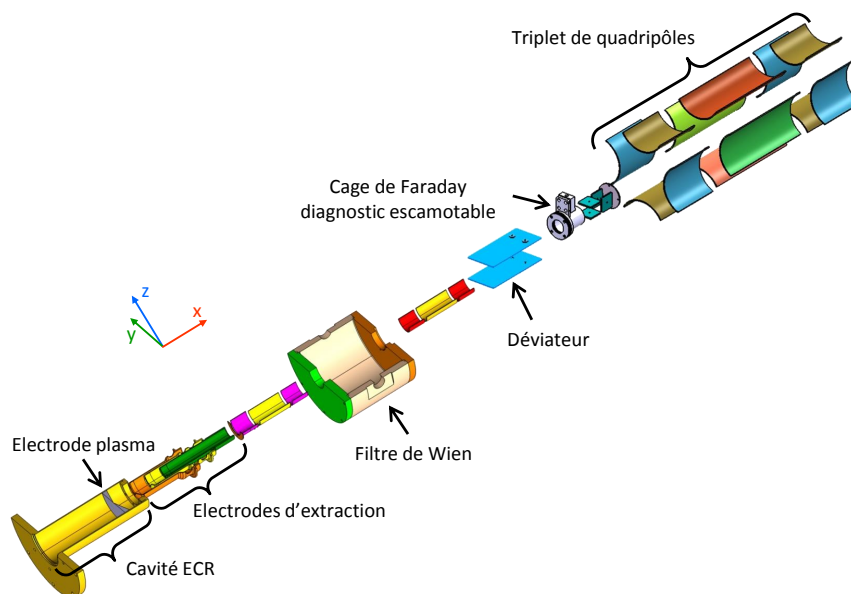


Figure 5.1.7 : Schéma de la ligne de faisceau Mono1000 avec la source ECR et les différentes optiques de guidages pour mettre en forme le faisceau.

du faisceau à 7 keV [287]. A la sortie de la source, trois électrodes d'extraction guident et accélèrent les ions vers un filtre de Wien [288–290].

Ce filtre permet de sélectionner l'ion d'intérêt par sa vitesse. Par application de champs électrique et magnétique perpendiculaires entre eux, ainsi qu'à la direction de propagation du faisceau, seuls les ions d'une vitesse donnée traversent le filtre. Celui-ci nous assure d'avoir un faisceau d'ions atomique d' He^+ .

Une fois sélectionnés, les ions arrivent à un déviateur, composé de deux plaques de 140 mm de long. Celui-ci permet de contrôler le temps d'irradiation, que nous nommerons Δ_{Proj} par la suite. La durée typique d'une irradiation est de quelques μs . Pour dévier le faisceau continu, une des deux plaques est soumise à un potentiel $V = 1000 \text{ V}$, la seconde reste à la masse. A la sortie de ce déviateur, une première cage de Faraday escamotable permet de mesurer l'intensité du faisceau sélectionné.

Les ions traversent ensuite un triplet de quadripôles qui permet de mettre en forme le faisceau dans le plan yOz afin d'obtenir un bon recouvrement avec le faisceau d'ions moléculaires dans la zone d'interaction. Un profileur, composé de 47 fils espacés de 0.5 mm permet de contrôler la forme du faisceau. Il est situé après la ZI, derrière une seconde cage de Faraday escamotable.

5.1.4 Spectromètre de masse à temps de vol

Le spectromètre de masse utilisé pour analyser les produits de l'interaction entre les faisceaux cible et projectile est de type Wiley-McLaren. Il reprend les principes que nous avons déjà

expliqués dans la section 2.3.1. Les ions sont extraits par un champ \vec{E}_{Ext} , puis accélérés par un champ \vec{E}_{Acc} avant d'être séparés selon leur rapport masse sur charge dans la zone de vol libre, jusqu'à atteindre un détecteur. Ces différentes zones sont représentées sur la figure 5.1.8. Lorsqu'une tension de $V_{Ext} = 4$ kV est appliquée sur la première électrode, les champs \vec{E}_{Ext} et \vec{E}_{Acc} possèdent des intensités respectives de 107 et 904 V.cm⁻¹. Nous pouvons également observer que les électrodes d'un miroir électrostatique de réflectron sont également présentes dans le spectromètre, cependant celui-ci n'a pas été utilisé dans le cadre de cette thèse.

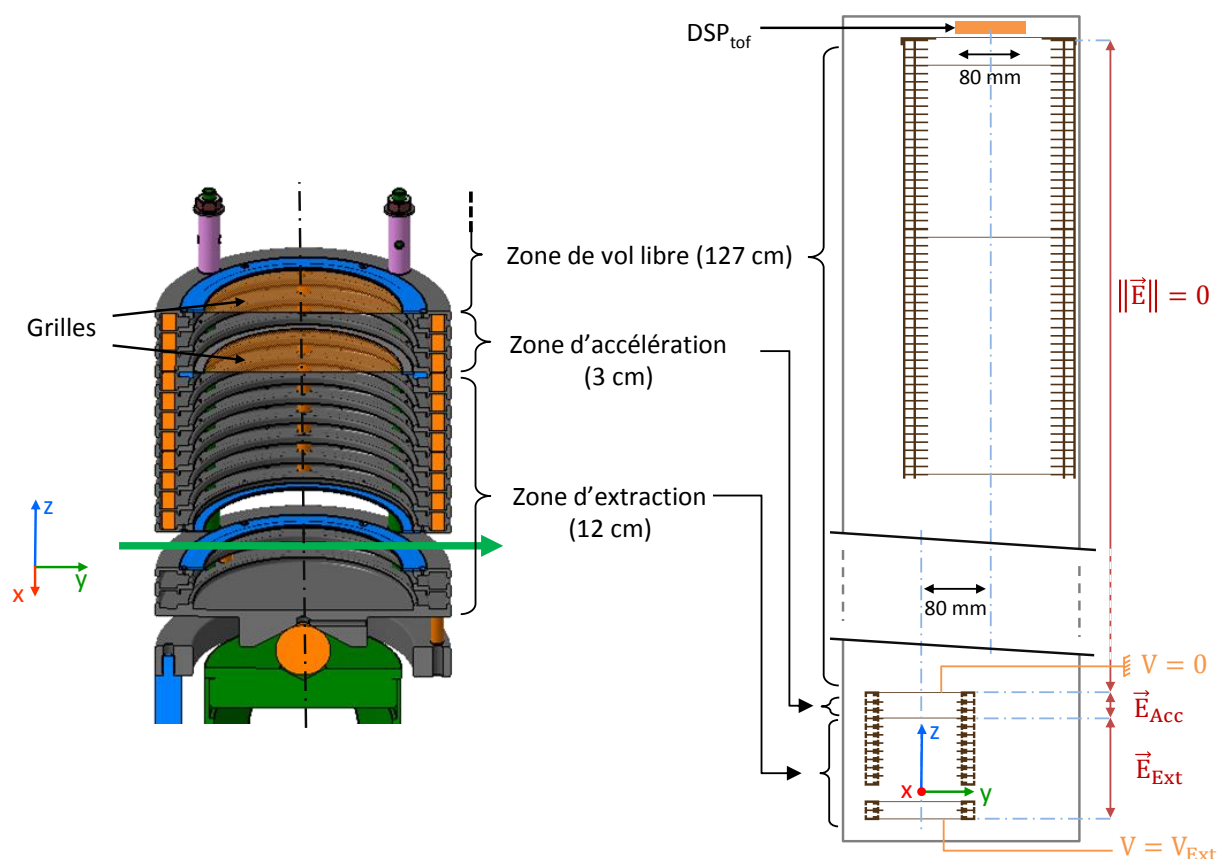


Figure 5.1.8 : Schéma en coupe (à gauche) et à 2 dimensions (à droite) du spectromètre de masse du dispositif PIBALE. Les zones d'extraction, d'accélération et de vol libre sont indiquées.

L'ensemble des zones d'extraction et d'accélération comporte 15 électrodes de 90 mm de diamètre interne. Elles sont espacées les unes des autres de 10 mm, sauf la 3 et la 4, espacées de 20 mm. C'est en effet entre ces deux électrodes que l'interaction des deux faisceaux se réalise. Le champ électrique d'extraction est appliqué sur 12 cm, et celui d'accélération sur 3 cm. Des grilles de 76% de transmissions sont utilisées pour séparer les champs électriques entre les zones d'extraction/accélération, et accélération/vol libre, respectivement. Cette zone de vol libre mesure quand à elle 127 cm.

Ce spectromètre possède une résolution $m/\Delta m = 90$. Il est couplé à un détecteur sensible en position de 80 mm de diamètre. Comme pour le détecteur DSP_{biomol} , deux grilles de 76% de

transmission permettent de séparer la zone de vol libre et le potentiel appliqué sur la face avant de la galette. Afin de tenir compte de la vitesse des ions selon leur axe de propagation, le centre du détecteur DSP_{TOF} est décalé de 80 mm, comme nous pouvons le voir sur la figure 5.1.8 de droite. Cependant, cette géométrie impose à ces derniers d'avoir une énergie cinétique comprise dans une gamme relativement restreinte afin d'atteindre le détecteur, c'est à dire proche de 15 - 25 eV.

Par ailleurs, afin d'éviter que les ions ne soient déviés par le champ électrique \vec{E}_{Ext} en entrant dans la zone d'interaction, celui-ci doit être pulsé. Il est alors appliqué quelques micro secondes après la fin du pulse de faisceau projectile, afin de s'assurer que ce dernier soit bien sorti de la zone d'interaction au moment où les ions moléculaires sont extraits dans le spectromètre. Une synchronisation précise en temps est alors nécessaire entre les différents faisceaux, notamment l'extraction des ions du piège, la création du pulse de faisceau projectile et l'extraction des produits de l'interaction dans le spectromètre de masse par temps de vol.

5.1.5 Cycle d'acquisition

Comme le rapport signal sur bruit attendu lors de l'interaction entre le paquet de biomolécules et le faisceau d'ions projectiles est faible, le spectre de masse obtenu est très sensible aux sources de bruits extérieurs, qui correspondent à tout ce qui n'a pas été produit lors de l'interaction. Dans notre cas, trois sources de pollution ont été identifiées. Tout d'abord, des fragments de la molécule cible produits par CID à l'injection ou l'extraction du piège peuvent être présents dans le paquet d'ions. La seconde contribution est liée au gaz résiduel présent dans la ZI. Celui-ci sera ionisé par le faisceau projectile, et les ions obtenus peuvent être détectés. La dernière contribution est la plus faible des trois, et est due à l'émission de particules neutres par la source ECR. Par exemple, lors de la désexcitation des atomes He* et He⁺⁺, les photons émis peuvent ioniser le gaz résiduel en continu.

Numéro de cycle : Spectre obtenu :	S1 Projectile	S2 Cible	S3 Sans faisceau	S4 Collision
Cible	Non	Oui	Non	Oui
Projectile	Oui	Non	Non	Oui

Tableau 5.1.9 : Descriptif du cycle d'acquisition en quatre temps utilisé lors des interactions entre les faisceaux cible et projectile.

Afin de pouvoir corriger de toutes ces contributions, le cycle d'acquisition se réalise en quatre temps, pour une durée totale de 800 ms (4 × 200 ms), dont le détail est présenté sur le tableau 5.1.9. Tout d'abord, le faisceau projectile est envoyé seul dans la ZI afin de déterminer la contribution de l'ionisation du gaz résiduel. La molécule cible est ensuite amenée seule, afin d'estimer la proportion de fragments dus à la CID. Durant la troisième partie du cycle, aucun

des faisceaux ne traverse la ZI, afin de relever les contributions de gaz résiduel ionisé par les photons et les particules neutres provenant de la source ECR.

Ainsi, pour soustraire ces contributions de bruit lors de l'analyse de l'expérience, les spectres projectile et cible (référéncés S1 et S2 sur le tableau 5.1.9) sont soustraits au spectre de collisions. Comme les photons issus de la source ECR ionisent le gaz résiduel en permanence, cette contribution est présente dans les trois autres parties du cycle. Elle a donc été soustraite deux fois du spectre de collisions. Il est alors nécessaire d'ajouter le spectre numéro 3 au spectre final pour tenir compte de cette source de bruit. Finalement, le spectre final correspond à la somme des spectres : $S4 - S1 - S2 + S3$. Ce cycle en quatre temps présente de plus l'avantage de ne pas être dépendant des fluctuations des faisceaux cible et projectile au cours du temps.

5.2 Développement et optimisation d'un groupeur d'ions

Avec le dispositif PIBALE, tel qu'il était à mon arrivée, les expériences réalisées présentaient un rapport signal sur bruit trop faible pour détecter les produits de l'interaction entre biomolécules et ions projectiles. En effet, comme nous l'avons mentionné précédemment, la taille du paquet d'ions dans le piège et la rampe d'extraction induisent un élargissement de la taille du paquet dans la zone d'interaction. Il est également caractérisé par une large distribution en énergie. Ceci est principalement dû à la charge d'espace créée par les ions dans le piège, qui tend à élargir la taille du paquet de biomolécules de manière non négligeable lorsque le nombre d'ions injectés augmente. Pour un temps d'injection de 100 ms et une intensité du faisceau de biomolécules d'environ 10 pA, il a été estimé que la largeur à mi-hauteur de leur distribution en temps de vol peut dépasser les 20 μ s [66]. Ceci correspond, toujours à mi-hauteur, à une taille de paquet d'environ 65 mm. Pour réaliser l'interaction en faisceaux croisés dans des conditions satisfaisantes, cette taille doit être réduite à environ 15 mm. De cette manière, le recouvrement des deux faisceaux pourra être optimal et la densité du paquet sera plus élevée, favorisant ainsi le rapport signal sur bruit.

Un dispositif électrostatique appelé groupeur d'ions a été développé dans le but de diminuer la taille du paquet d'ions biomoléculaires. Ainsi, dans cette partie nous verrons dans un premier temps les simulations réalisées pour optimiser les paramètres de ce groupeur, puis nous comparerons ensuite les résultats de ces simulations avec des mesures expérimentales.

Pour réaliser ces tests (par simulations, puis expérimentalement), nous avons utilisé le peptide de Leucine-Enképhaline car comme nous l'avons déjà vu lors du chapitre 2, ce peptide a déjà été étudié de nombreuses fois par plusieurs techniques expérimentales, et ses caractéristiques sont donc connues. Nous avons étudié son monomère simplement protoné, de masse 556 Da.

5.2.1 Principe d'un groupeur d'ions

Le groupeur utilisé sur le dispositif PIBALE est situé entre le piège et la zone d'interaction. Comme nous pouvons le voir sur la figure 5.2.1, il est composé de 16 électrodes de 2 mm d'épaisseur, de 20 mm de diamètre interne, et espacées les unes des autres de 2 mm. L'action du regroupement nécessite de pulser les potentiels appliqués sur les différentes électrodes. Cependant cet ensemble d'électrodes peut être utilisé comme une simple lentille si on applique une valeur V_{bias} sur chacune d'entre elles.

Pour rappel, nous avons vu lors de la partie 5.1.2.1 qu'à l'intérieur du piège, le champ électrique d'extraction implique que les ions situés à l'arrière du paquet vont posséder une vitesse légèrement supérieure à ceux situés à l'avant. Des simulations nous ont montré que ces ions les plus rapides rattrapent et dépassent les plus lents du paquet dans les premiers centimètres à la sortie du piège. Ainsi, dans le groupeur, nous savons que les ions situés à l'avant du paquet sont plus énergétiques que ceux situés à l'arrière, comme illustré sur la figure 5.2.1.

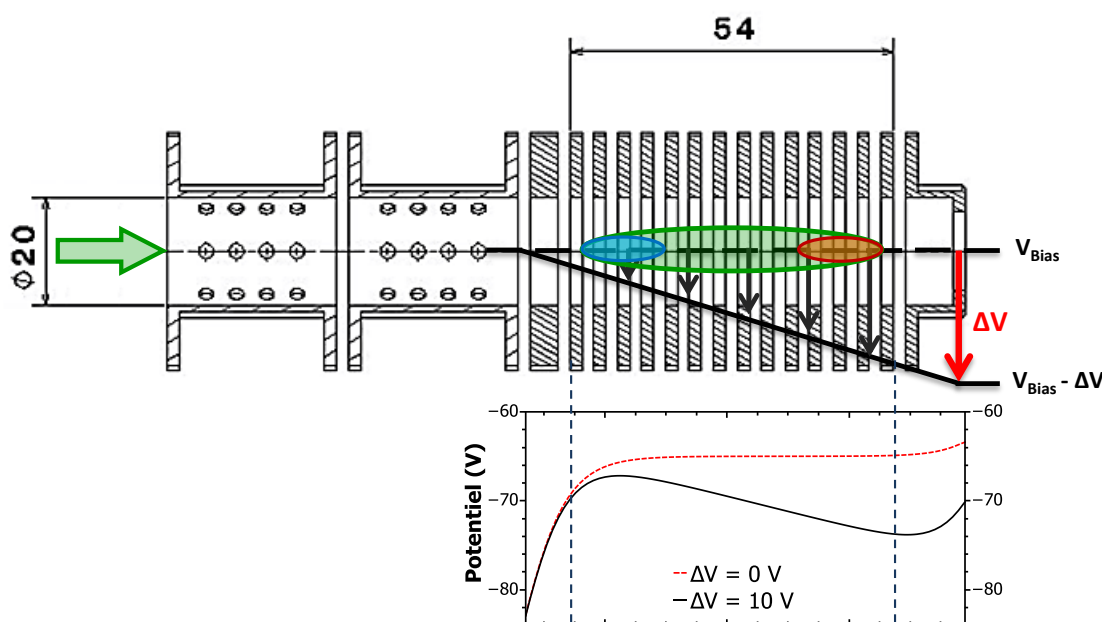


Figure 5.2.1 : Schéma du principe du groupeur lors de l'application d'une rampe de potentiel ΔV . Le paquet d'ions est représenté par l'ovale vert. Dans ce paquet, les ions initialement les plus lents sont situés à l'arrière, en bleu, et les plus rapides, à l'avant, sont représentés en rouge. Sous le schéma du dispositif, le graphique présente le potentiel réel en fonction de la position avant (en pointillés rouges) et après (en noire) application de la rampe $\Delta V = 10$ V, et pour $V_{\text{bias}} = -75$ V. Les lentilles situées avant et après le groupeur sont portées respectivement à des potentiels de -110 et -60 V.

A l'instant où le paquet de biomolécules se situe au centre du groupeur, une rampe de potentiel électrique décroissante est appliquée afin de faire perdre aux ions une quantité d'énergie

qui dépend de leur position dans le groupeur. Ainsi, les ions situés à l'avant vont perdre une énergie plus grande que ceux situés à l'arrière. Ces derniers seront désormais les plus énergétiques. Sur le graphique situé sous le schéma du dispositif de la figure 5.2.1, nous pouvons observer le potentiel réel appliqué en fonction de la position. Le cas en pointillé rouge correspond au potentiel avant application de la rampe, toutes les électrodes sont soumises à un potentiel $V_{\text{bias}} = -75 \text{ V}$ et le groupeur agit comme une lentille. La courbe noire correspond au cas de l'application d'une rampe de $\Delta V = 10 \text{ V}$. Cette rampe est déformée à l'entrée et à la sortie du groupeur, suite aux potentiels appliqués sur les optiques qui l'entourent. Par exemple, la lentille située avant le groupeur est portée à un potentiel de -110 V , et induit ces effets de bords à l'entrée. Le champ électrique au centre du groupeur reste quasiment homogène. En ajustant la valeur de ce champ électrique, il est finalement possible de focaliser le paquet d'ions en temps de vol au centre de la zone d'interaction.

Par ailleurs, nous souhaitons conserver la même vitesse moyenne du paquet d'ions dans la zone d'interaction, indépendamment de l'utilisation du groupeur. Or, pour l'application d'une rampe de potentiel de ΔV , le centre du paquet d'ions subit une perte d'énergie équivalente à $\frac{q \cdot \Delta V}{2}$. Afin de compenser cette perte, toutes les tensions appliquées en amont sur les électrodes depuis l'ESI jusqu'au groupeur sont augmentées de $\frac{\Delta V}{2}$.

Deux paramètres sont alors à ajuster pour l'utilisation du groupeur : la valeur de la rampe de potentiel ΔV et l'instant t_{switch} auquel cette dernière est appliquée.

5.2.2 Mise en place des simulations

Le développement du groupeur a été réalisé par le biais de simulations à l'aide du logiciel SIMION [291]. Avec ce dernier, il est possible de recréer la géométrie du dispositif en trois dimensions afin de tester l'influence des potentiels appliqués aux électrodes sur la trajectoire et le temps de vol des ions.

En partant du principe de fonctionnement précédemment détaillé, nous avons fait varier les paramètres du groupeur dans SIMION afin de chercher le minimum de largeur à mi-hauteur en temps de vol lorsque le paquet d'ions est situé au centre de la zone d'interaction. La figure 5.2.2a représente cette largeur à mi-hauteur en temps de vol en fonction de la rampe de potentiel appliquée sur le groupeur. Nous pouvons directement observer une région où le gain en largeur à mi-hauteur semble optimum, autour de 21 V .

L'évolution de la largeur à mi-hauteur est directement dépendante de la valeur de la rampe de potentiel ΔV , et par conséquent, de la quantité d'énergie perdue par les ions dans le groupeur. En effet, ceux situés à l'arrière du paquet lors de leur entrée dans le groupeur étaient initialement les plus lents. Ils deviennent cependant les plus rapides à la sortie, et la différence de vitesse entre les ions respectivement situés à l'avant et à l'arrière du paquet dépend de ΔV . Ainsi, pour une valeur de rampe donnée, les ions initialement à l'arrière vont rattraper les autres ions au niveau du point de focalisation, puis les dépasseront et se trouveront finalement à l'avant du paquet. La valeur de ΔV de 21 V correspond à une focalisation au centre de la ZI.

Sans groupeur, aucune focalisation n'est faite. En appliquant une très faible rampe, et en augmentant progressivement ΔV , le point focal se crée à grande distance et se rapproche, diminuant ainsi la largeur à mi-hauteur du paquet d'ions dans la ZI. A l'inverse, pour des rampes dont la valeur est supérieure à 21 V, le point focal se situe avant le centre de la ZI. Plus ΔV augmente, plus il se rapproche de la sortie du groupeur. C'est pour cette raison que l'on observe de nouveau une augmentation de la largeur à mi-hauteur au centre de la ZI.

La figure 5.2.2b présente les distributions en temps de vol des ions au centre de la zone d'interaction pour les cas sans (en noir) et avec (en rouge) utilisation du groupeur. Nous pouvons observer que la largeur à mi-hauteur initiale est de $7.3 \mu\text{s}$, contre $0.3 \mu\text{s}$ lors de l'utilisation du groupeur. Comme leur énergie moyenne est de 25 eV, les ions de Leucine-Enkephaline (556 Da) ont une vitesse avoisinant les $3 \text{ mm} \cdot \mu\text{s}^{-1}$. Nous pouvons en déduire la largeur à mi-hauteur de la distribution en taille du paquet d'ions. Le groupeur permet donc de passer de 22 à 1 mm pour une rampe de 21 V.

Ces résultats caractérisent des ions dans le centre de la zone d'interaction, puisque c'est en ce point que l'on souhaite que le paquet soit le plus dense possible. Cependant, expérimentalement, nous ne pourrions caractériser les ions que sur le détecteur DSP_{Biomol}, éloigné d'environ 30 cm. A 25 eV, les ions parcourent cette distance en près de $100 \mu\text{s}$. Pendant ce laps de temps, la dispersion en temps de vol du paquet varie et les informations que nous allons récupérer ne seront pas directement les caractéristiques du paquet au centre de la zone d'interaction. Il s'avère donc intéressant de quantifier les différences d'optimisation obtenues sur ce détecteur, en comparaison avec les résultats précédents pour la zone d'interaction. Dans le cas d'une focalisation sur le détecteur, comme la distance parcourue par les ions est plus grande, nous pouvons nous attendre à ce que la différence de potentiel optimal ΔV soit plus faible.

La figure 5.2.2c présente la variation de largeur à mi hauteur de la distribution en temps de vol du paquet d'ions, toujours en fonction de la rampe de potentiel appliquée. Celle-ci est directement comparable à la figure 5.2.2a. Nous pouvons observer que l'optimum en largeur à mi-hauteur est effectivement atteint pour une valeur de rampe plus basse que lors d'une focalisation dans la zone d'interaction. L'optimum étant ici situé autour de 11 V, permettant ainsi de passer d'une largeur à mi-hauteur de $13.5 \mu\text{s}$ à $0.8 \mu\text{s}$. Ces valeurs correspondent à des tailles de paquet respectives de 40.5 et 2.5 mm.

Finalement, et comme nous pouvons le voir sur les figures 5.2.2b et d, à l'aide du groupeur nous pouvons obtenir une distribution en temps de vol bien plus fine qu'avant. Il est cependant nécessaire de rappeler que ces simulations correspondent à un cas sans charge d'espace. Comme nous l'avons mentionné précédemment, celle-ci provoque une augmentation non négligeable de la taille du paquet d'ions, et de la largeur à mi-hauteur de sa distribution en temps de vol.

Lors de nos simulations, nous n'avons pas pris en compte ces effets de charges d'espace puisque les trajectoires des ions sont simulées les unes après les autres. Cependant, il pourrait être intéressant de réaliser des simulations complémentaires en créant un paquet d'ions plus large dans le piège par exemple, dans le but de recréer l'effet dû à la charge d'espace. Il serait

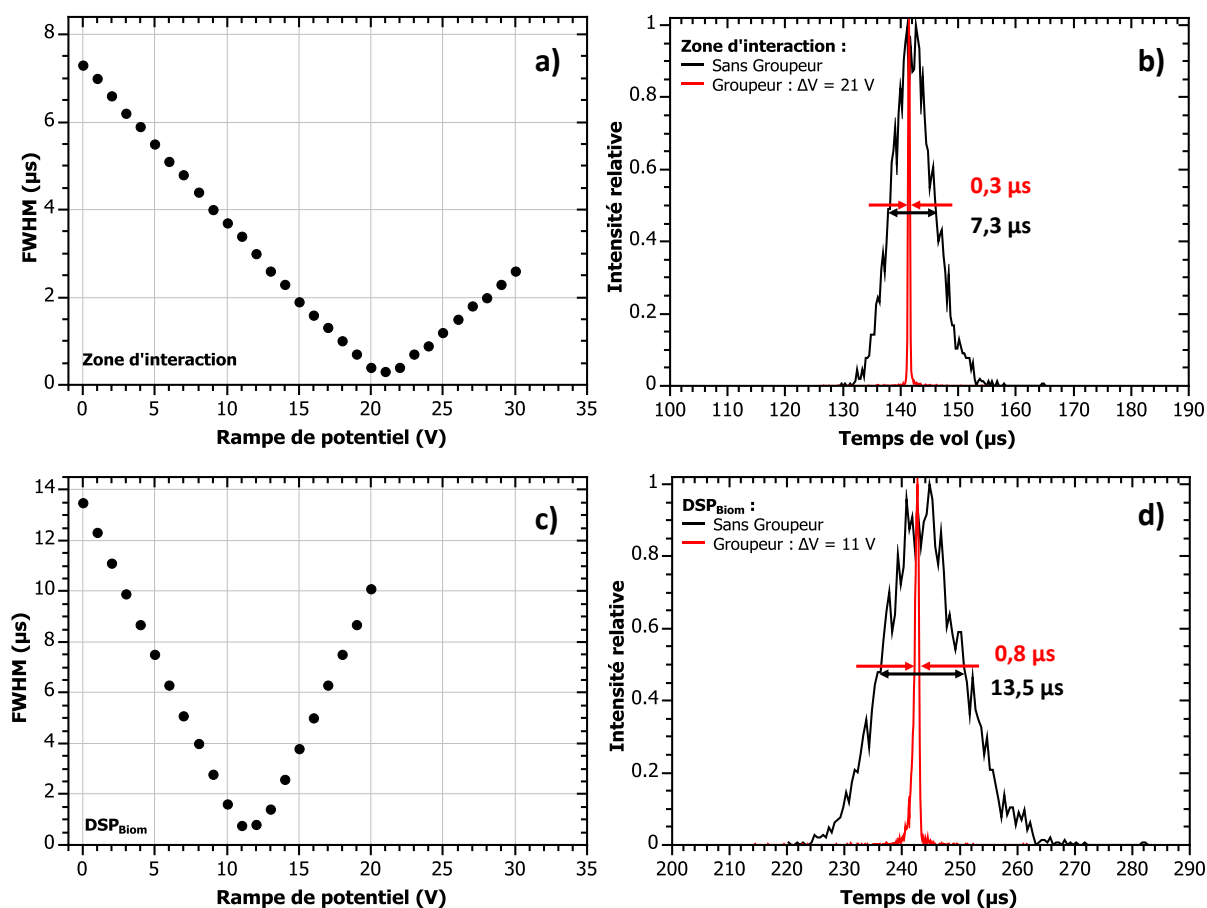


Figure 5.2.2 : Simulations de la largeur à mi-hauteur du temps de vol des ions dans le centre de la zone d'interaction (en (a)) et sur le DSP_{Biomol} (en (c)), en fonction de la valeur de la rampe de potentiel appliquée au groupeur, et pour une tension d'extraction du piège de $V_{ext} = 40$ V. Les spectres de temps de vol des figures (b) et (d) correspondent à la superposition des cas avec et sans groupeur, respectivement dans la ZI et sur le détecteur.

alors possible d'étudier l'apport du groupeur dans cette configuration. Malgré ce point, et au vu des résultats des simulations présentés ci-dessus, l'utilisation du groupeur semble donc apporter une augmentation conséquente sur la densité du paquet d'ions. Il est tout de même nécessaire de comparer ces simulations aux résultats expérimentaux afin de vérifier leur exactitude.

5.2.3 Comparaison des mesures expérimentales et des simulations

Expérimentalement nous ne pouvons pas avoir de visualisation du paquet d'ions au centre de la zone d'interaction. Afin de pouvoir comparer les résultats expérimentaux et ceux issus des simulations, la focalisation du paquet d'ions a été faite sur le détecteur DSP_{Biomol}.

Pour ces tests, nous avons également utilisé la molécule de Leucine-Enképhaline, avec une énergie moyenne de 25 eV, une intensité proche de la dizaine de pA et un temps d'injection

des ions dans le piège de $0,1 \mu\text{s}$ afin d'éviter les effets de charge d'espace. Sur la figure 5.2.3a, la largeur à mi-hauteur du paquet d'ions sur le $\text{DSP}_{\text{Biomol}}$ est représentée pour différentes valeurs de la rampe de potentiel. Nous observons alors un optimum pour 11 V, qui permet ainsi de passer d'une largeur à mi-hauteur sans groupeur de quasiment $15 \mu\text{s}$ (44 mm), à $1 \mu\text{s}$ (3 mm) lors de son utilisation.

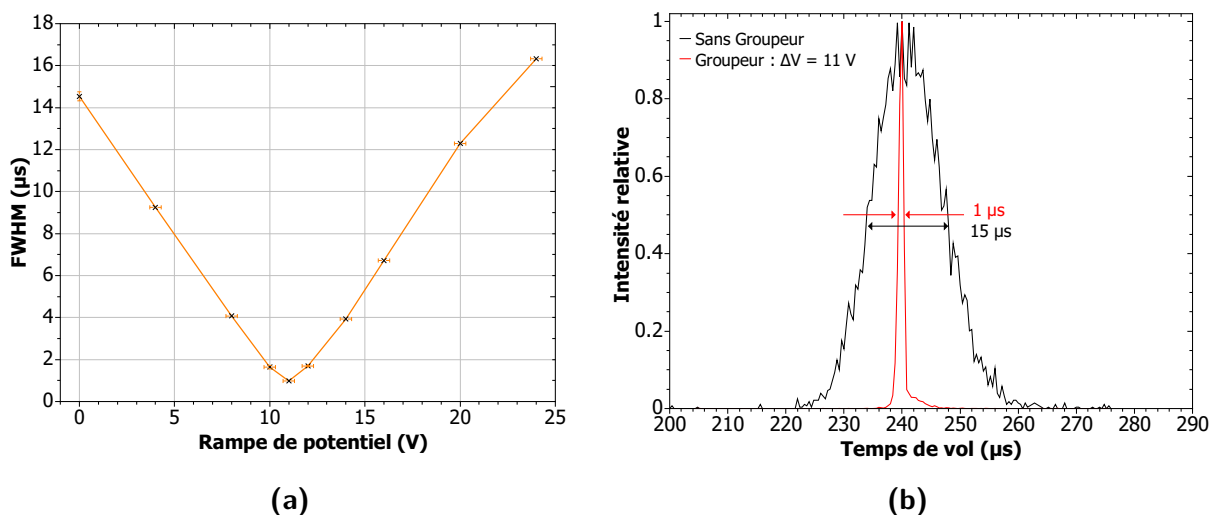


Figure 5.2.3 : (a) : Mesures expérimentales de la largeur à mi-hauteur du paquet d'ions sur le $\text{DSP}_{\text{Biomol}}$ en fonction de la valeur de la rampe de potentiel. (b) : Mesures expérimentales des distributions en temps de vol du paquet d'ions sur le $\text{DSP}_{\text{Biomol}}$ pour les cas sans groupeur (noir) et avec (rouge) pour une rampe de potentiel de 11V.

La figure 5.2.3b représente les distributions expérimentales de temps de vol des ions pour les cas sans groupeur en noir et avec groupeur pour une rampe de potentiel de 11 V en rouge. Ces résultats sont directement comparable avec la figure 5.2.2d présentée précédemment et obtenue lors des simulations. Nous pouvons remarquer que ces distributions sont très similaires, malgré un léger décalage en temps de vol, notamment lorsque nous comparons les distributions avec groupeur. Ceci peut par exemple être dû à l'optimisation expérimentale du groupeur, et notamment à l'instant t_{Switch} d'application de la rampe de potentiel.

Nous pouvons quantifier l'influence de ce temps t_{Switch} sur le temps de vol des ions. Pour une rampe de 11 V, le champ électrique créé dans le groupeur est $0.2 \text{ V}\cdot\text{mm}^{-1}$. Comme les ions de Leucine-Enképhaline de 25 eV possèdent une vitesse de $3 \text{ mm}\cdot\mu\text{s}^{-1}$, si la rampe est appliquée à l'instant $t_{\text{Switch}} \pm 0.5 \mu\text{s}$, les ions sont positionnés 1.5 mm en amont ou en aval du centre du groupeur. Ce décalage induirait alors un gain ou une perte d'énergie de $1.5 \times 0.2 = 0.3 \text{ V}$. Cette légère différence de perte d'énergie des ions modifierait leur temps de vol final de l'ordre d'une μs sur le $\text{DSP}_{\text{Biomol}}$, ce qui est cohérent avec le décalage d'environ $2 \mu\text{s}$ entre nos résultats expérimentaux et simulés. Les mesures sont donc très sensibles à l'instant t_{Switch} , qu'il est beaucoup plus facile d'optimiser lors des simulations. Le résultat de nos mesures expérimentales reste malgré tout en très bon accord avec les simulations.

De plus, les tailles de paquets d'ions avec et sans groupeur sont également légèrement supérieures expérimentalement. Ces différences peuvent s'expliquer par une sous estimation de la taille initiale du paquet d'ions à l'intérieur du piège, par de légères variations sur les tensions appliquées expérimentalement, ainsi que par la vitesse initiale des ions. La cohérence entre les résultats des simulations et ceux obtenus expérimentalement restent malgré tout très bonne, et nous permet donc de nous appuyer sur les simulations pour optimiser les paramètres du groupeur.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, si le paquet de biomolécules est focalisé sur le détecteur DSP_{Biomol}, il ne le sera pas dans le centre de la zone d'interaction. Afin d'accéder à la taille du paquet à cet endroit, nous pouvons obtenir la projection de son image sur le DSP_{ToF} en l'extrayant dans le spectromètre de masse. La figure 5.2.4a représente l'image obtenue sans utilisation du groupeur pour une extraction à 4 kV. Sur cette image, les ions moléculaires traversent de la gauche vers la droite, mais nous constatons que la taille du paquet d'ions est supérieure à celle du détecteur.

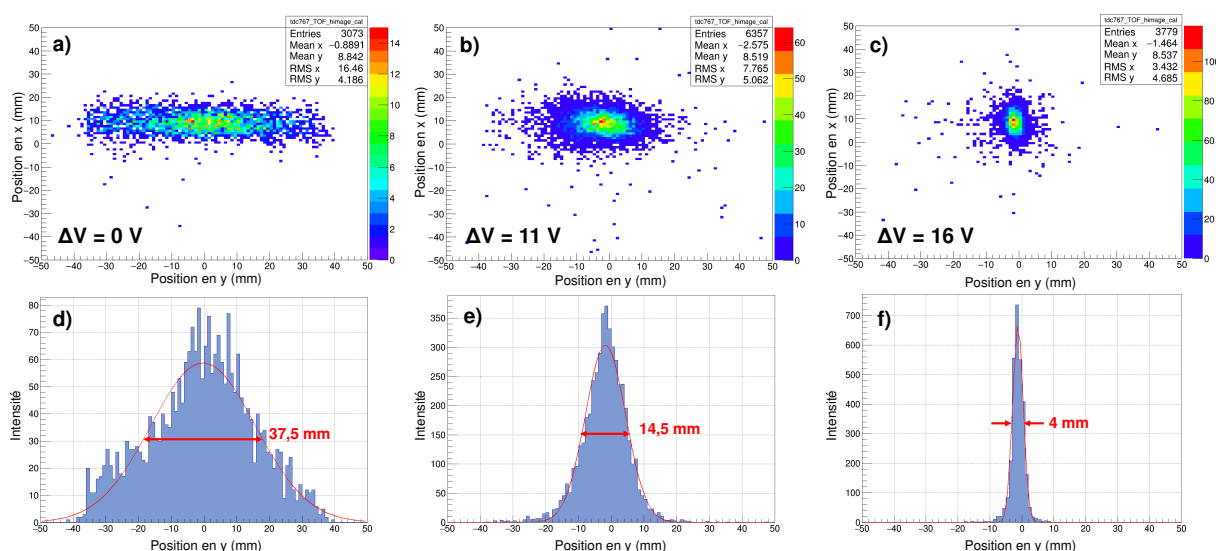


Figure 5.2.4 : (a) : image obtenue avec le spectromètre de masse par temps de vol sans utilisation du groupeur. (b) : cas où le groupeur est optimisé sur le DSP_{Biomol}, avec une rampe de potentiel de 11 V. (c) : utilisation du groupeur avec une rampe de potentiel de 16 V, lorsque celle-ci est optimisée sur le DSP_{ToF}. Ces images ont été réalisées avec une extraction des ions de la zone d'interaction de 4 kV. (d), (e) et (f) : projections des images selon l'axe y.

Les figures 5.2.4b et c correspondent respectivement aux cas où la rampe de potentiel vaut 11 et 16 V. Comme nous nous y attendions, l'optimum obtenu sur le DSP_{biomol} ($\Delta V = 11$ V) ne correspond pas à l'optimum du DSP_{ToF} ($\Delta V = 16$ V). Nous pouvons tout de même mentionner que la rampe de potentiel appliquée pour focaliser les ions sur ce détecteur est plus faible que celle obtenue lors des simulations dans la zone d'interaction ($\Delta V = 21$ V). En effet, les ions parcourent le spectromètre de masse pendant environ $40 \mu\text{s}$ avant d'atteindre le détecteur.

Pendant ce laps de temps, les ions se déplacent d'environ 12 cm selon leur axe de propagation, l'axe y . La valeur optimale de focalisation sur le DSP_{ToF} ($\Delta V = 16$ V) correspond donc à un point de focalisation situé 12 cm après le centre de la ZI. Pour vérifier cette optimisation du groupeur, nous avons réalisé de nouvelles simulations, non présentées ici, sur l'optimisation de ΔV , 12 cm plus loin que le centre de la ZI. Nous avons également obtenu un optimum à $\Delta V = 16$ V, confirmant nos mesures expérimentales.

De plus, les figures 5.2.4d, e et f représentent les projections sur l'axe y de propagation des ions des images 5.2.4a, b et c, respectivement. Dans le cas où $\Delta V = 16$ V, la taille du paquet à mi hauteur est de 4 mm. Ce résultat est tout à fait cohérent avec nos précédentes mesures réalisées sur le DSP_{Biomol} et présentées sur la figure 5.2.3b. L'accord entre les mesures expérimentales et les simulations confirme ainsi que nous pouvons nous fier à ces dernières pour l'optimisation de la rampe de potentiel ΔV , d'autant plus que nous n'avons pas de relecture directe de la taille du paquet au centre de la ZI.

5.2.4 Influence de la charge d'espace sur l'utilisation du groupeur

Nous avons mentionné dans la partie 5.1.2.1 que plus le nombre d'ions injectés est élevé, plus la charge d'espace est importante. Ceci implique que la largeur à mi-hauteur de la distribution en temps de vol du paquet d'ions augmente considérablement. Il est donc nécessaire de vérifier si l'utilisation du groupeur est perturbée par cette charge d'espace, et s'il peut compenser cet effet.

Dans un premier temps, nous avons voulu nous assurer que la transmission au travers du groupeur est bien de 100%. Les mesures présentées par la suite ont été réalisées pour une intensité moyenne de 15 pA, une énergie moyenne des ions de 20 eV et une valeur de la rampe de potentiel du groupeur ΔV de 10 V, toujours pour une tension d'extraction du piège $V_{\text{ext}} = 40$ V.

Ainsi, la figure 5.2.5a représente le nombre d'ions par paquet N_{ions} , en fonction du nombre d'ions injectés dans le piège N_{inj} . Nous pouvons directement remarquer que l'utilisation du groupeur n'induit pas, ou très peu, de perte d'ions. Pour un jeu de paramètre donné (intensité, durée d'injection dans le piège, transmission, ...) le groupeur permet donc de réduire la taille du paquet, et par conséquent d'augmenter sa densité.

Par ailleurs, sur la figure 5.2.5b, nous avons comparé les mesures expérimentales de largeur à mi-hauteur du paquet en fonction du nombre d'ions injectés, obtenues avec et sans utilisation du groupeur. Dans les deux cas, la largeur à mi-hauteur de la distribution en temps de vol augmente avec le nombre d'ions par paquet mais avec utilisation du groupeur, celle-ci est beaucoup moins prononcée. Pour un nombre d'ions injecté de $1,5 \cdot 10^6$ ions dans le piège, la largeur à mi-hauteur tend vers $6,5 \mu\text{s}$ lors de l'utilisation du groupeur, soit environ 17,5 mm, ce qui est presque cinq fois moins que dans le cas sans groupeur.

Ces résultats démontrent que le groupeur permet de compenser efficacement l'effet de charge d'espace créée dans le piège. Nous pouvons observer que nous arrivons à conserver

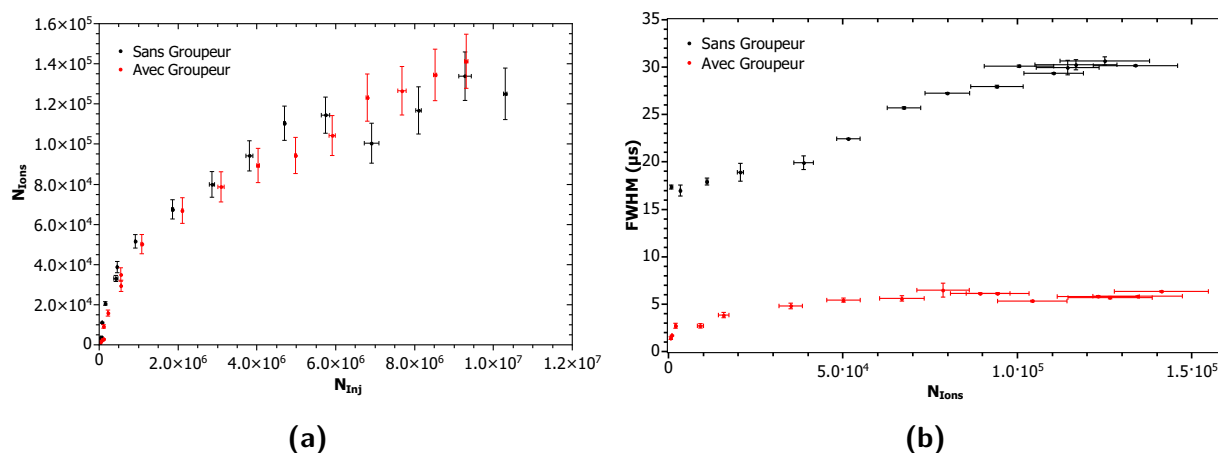


Figure 5.2.5 : (a) : Comparaison du nombre d'ions par paquet N_{ions} en fonction du nombre d'ions injectés dans le piège N_{inj} pour les cas avec et sans utilisation du groupeur. (b) : Comparaison des mesures expérimentales de la largeur à mi-hauteur du pic de temps de vol des ions biomoléculaires en fonction du nombre d'ions par paquet N_{ions} obtenus pour les cas avec et sans utilisation du groupeur.

une taille suffisamment faible, inférieure à 20 mm, pour garantir un bon recouvrement avec le faisceau projectile, et ce, même en présence de charge d'espace.

Nous pouvons tout de même constater que lors de l'utilisation du groupeur, la largeur à mi-hauteur tend vers une valeur limite plus rapidement que dans le cas où les ions ne sont pas regroupés. Ceci peut être dû à la taille du groupeur, et en particulier aux effets de bords observés sur le champ électrique à l'intérieur de celui-ci. Ces effets sont particulièrement présents pour les paquets d'ions les plus gros, ce qui pourrait expliquer la légère baisse de transmission observée sur la figure 5.2.5a.

5.3 Irradiation du peptide Leucine-Enképhaline protoné par un faisceau d'He⁺ à 7 keV

Dans cette partie, nous allons voir en détails les résultats de l'irradiation du peptide de Leucine-Enképhaline par un faisceau atomique d'hélium monochargé à 7 keV. Nous discuterons également les valeurs du taux de comptage des fragments observés.

5.3.1 Présentation du système moléculaire

La Leucine-Enképhaline est un pentapeptide neurotransmetteur composé de la séquence peptidique d'acides aminés Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu, et de masse moyenne 555,62 Da. Sa structure est présentée sur la figure 5.3.1a. Ce peptide est considéré comme modèle pour les expériences de spectrométrie de masse de par sa facilité à être mis en phase gazeuse [269], mais aussi par son comportement sous rayonnements de photons UV à RX, qui a fait l'objet de nombreuses

études [151, 154, 155, 292, 293]. S. Bari *et co.* ont également étudié ce peptide simplement et doublement protoné lors d'interactions avec des ions H^+ , He^+ et He^{2+} et pour des énergies comprises entre 5 et 40 keV [182, 183].

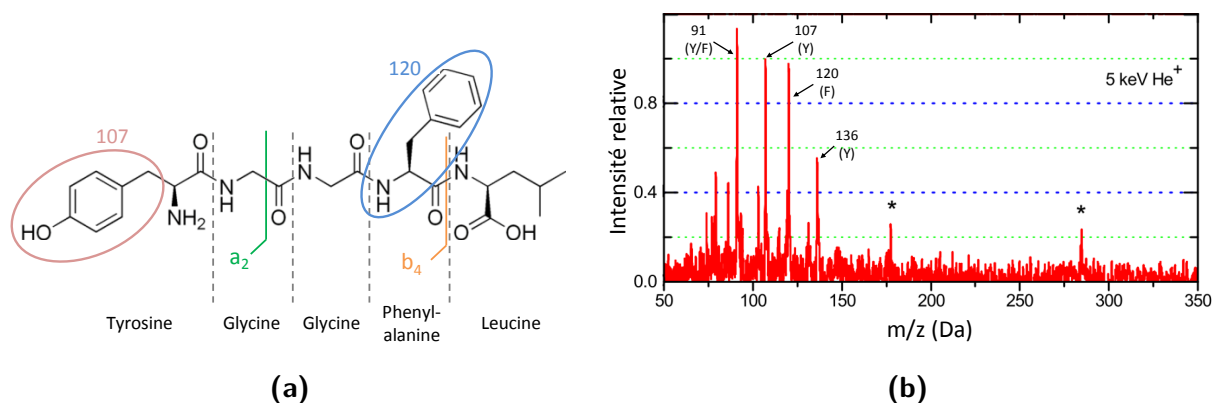


Figure 5.3.1: (a) : Structure de la Leucine-Enképhaline. La séquence des acides aminés qui la composent et les principaux fragments sont également indiqués. (b) : Spectre de masse de la Leucine-Enképhaline après irradiation par un faisceau d' He^+ à 5 keV [182]. Les pics surmontés d'une étoile proviennent du bruit de fond.

Ces dernières expériences ont été réalisées avec le dispositif expérimental Paultje, présenté lors du chapitre 4. Les peptides sont tout d'abord accumulés puis irradiés pendant 100 ms dans un piège de Paul 3D, avant d'être analysés par spectrométrie de masse. Le spectre de la figure 5.3.1b a ainsi été obtenu après irradiation du peptide par un faisceau d' He^+ à 5 keV. Ils ont ainsi observé que la Leucine-Enképhaline ne survit pas après ionisation et subit une forte fragmentation interne, provenant principalement de la Phénylalanine et de la Tyrosine. Ces fragments sont indiqués sur la structure du peptide, sur la figure 5.3.1a. Ce spectre de masse a été normalisé à l'intensité du pic de 107 Da, la chaîne latérale de la Tyrosine, qui est généralement le plus intense des fragments après irradiation.

5.3.2 Analyse des résultats de l'expérience

Sur le dispositif PIBALE, les interactions ont été faites entre les peptides simplement protonés de Leucine-Enképhaline à 25 eV et le faisceau d' He^+ à 7 keV. La densité des paquets d'ions cibles dans cette région a été estimée à $1,65 \cdot 10^5$ ions. cm^{-3} . Pour le faisceau projectile, l'intensité mesurée en continu dans la ZI était de 60 μA ($3,7 \cdot 10^{14}$ ions. s^{-1}), mais lors de l'interaction, le temps d'irradiation était fixé à 3 μs . Les ions cibles et les produits de l'interaction ont été extraits dans le spectromètre de masse, pour une tension $V_{Ext} = 4$ kV appliquée 2 μs après que la fin du pulse de faisceau projectile ait traversé la ZI.

Nous avons appliqué un cycle global de 400 ms, soit 4 fois 100 ms, comme expliqué dans la partie 5.1.5. Une accumulation de données de 8 heures a permis d'acquérir près de 72 000 cycles par spectre.

Le résultat de cette expérience est présenté sur la figure 5.3.2. Nous pouvons observer les quatre spectres (Cible, Projectile, Sans faisceau et Collision) obtenus lors d'une telle acquisition. Le pic parent, correspondant à la Leucine-Enképhaline protonée, est situé à 42 μ s et sature le détecteur suite au nombre important d'ions qui l'atteignent en un temps très court.

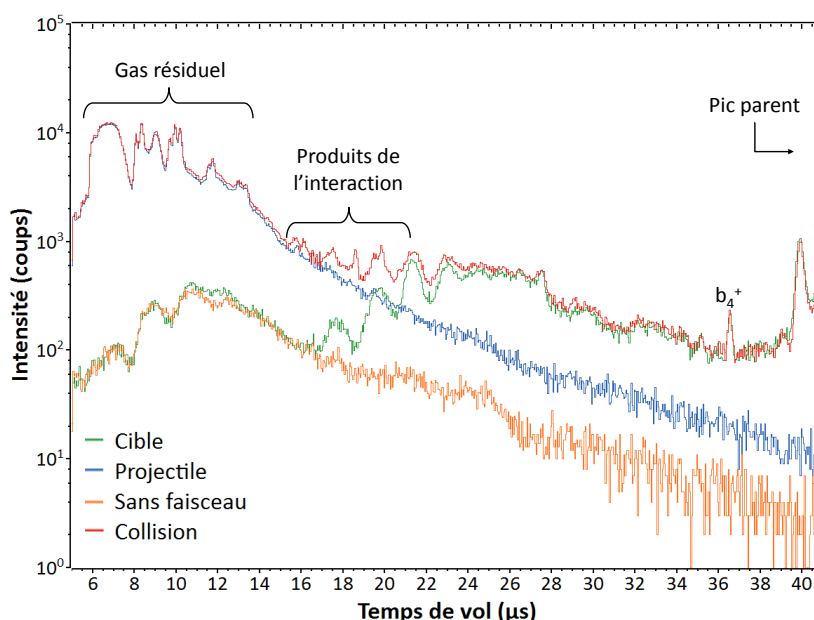


Figure 5.3.2 : Spectres de temps de vol obtenus sur le dispositif PIBALE. Les spectres correspondant aux quatre parties du cycle d'acquisition (Cible, Projectile, Sans faisceau et Collision) sont superposés.

Pour des temps de vol inférieurs à 15 μ s, les spectres sont dominés par l'ionisation du gaz résiduel par le faisceau projectile. Dans cette même gamme de temps de vol, nous pouvons remarquer que le spectre Cible est également contaminé par l'ionisation de ce gaz résiduel, mais cette fois, celle-ci est due aux particules neutres émises de la source ECR, mises en évidence avec le spectre Sans faisceau.

De 15 à 30 μ s le spectre Cible contient de nombreux pics ou structures non identifiés. Ces ions sont probablement produits lors de leur passage à travers les zones d'extraction et/ou d'accélération du spectromètre de masse, lorsque les ions moléculaires percutent les grilles. Le fragment b_4^+ est quant à lui présent dans les spectres Cible et Collision. Il n'est pas produit lors de l'interaction avec le faisceau projectile, mais par CID sur le gaz d'hélium dans le piège, lors de l'injection ou de l'extraction des ions. Le taux de comptage de ce fragment est ici mesuré à 0.06 coups par cycle, donc par paquet. En le comparant au nombre d'ions par paquet ($1,65 \cdot 10^5$ ions), nous pouvons estimer la pureté de la cible à environ 10^{-7} . Cependant nous pouvons malgré tout remarquer que ce fragment contribue de manière non négligeable aux spectres de temps de vol.

Pour les petits temps de vol (en dessous de 15 μ s), le spectre Collision suit la même tendance que le spectre Projectile. A l'inverse, il suit celle du spectre Cible pour les plus hauts

temps de vol (au dessus de 25 μs). Ceci signifie qu'aucun fragment provenant de l'interaction n'est présent dans ces deux régions. Cependant, entre 15 et 21 μs , des pics additionnels dans le spectre de Collision proviennent directement de l'interaction entre les faisceaux cible et projectile. Afin de mieux les caractériser, les différentes sources de bruit ont été soustraites au spectre Collision selon la méthode expliquée dans la partie 5.1.5 : $S_4 - S_1 - S_2 + S_3$.

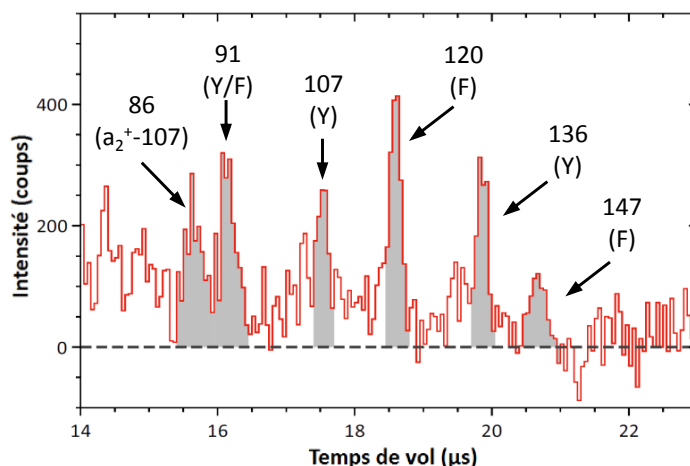


Figure 5.3.3 : Spectre de temps de vol corrigé des spectres Projectile, Cible et Sans faisceau. Les fragments observés sont référencés sur la figure 5.3.1b.

Nous pouvons observer ce spectre corrigé sur la figure 5.3.3 pour la gamme de temps de vol comprise entre 14 et 23 μs . Plusieurs pics correspondant à des fragments internes provenant des acides aminés de tyrosine ($m/z = 136, 107$ et 91) et de phenylalanine ($147, 120, 91$) sont directement identifiables. Il en est de même pour le fragment $[a_7-107]$ ($m/z = 86$). Ces fragments ont été mis en évidence sur le schéma de structure de la Leucine-Enképhaline de la figure 5.3.1a. Ils correspondent également à ceux observés par S. Bari *et co.* lors de leurs précédentes expériences d'irradiation de ce peptide dans un piège [182], comme nous pouvons le voir sur leur spectre de masse présenté sur la figure 5.3.1b. Dans leur cas, les contributions majoritaires étaient les pics de rapport m/z de 91, 107, 120 et 136. Ce sont également ces pics que nous observons le plus intensément, avec des rapports d'intensité similaires. De plus, nous voyons deux pics à $m/z = 86$ et 147 , que nous avons attribués à des fragments du squelette, mais qui n'avaient pas été relevés explicitement par S. Bari *et co.* Le résultat de l'irradiation de la Leucine-Enképhaline sur le dispositif PIBALE est donc similaire à celui obtenu par S. Bari *et co.* avec le dispositif Paultje. Même si la statistique et le rapport signal sur bruit sont relativement faibles, ce premier résultat d'irradiation en faisceaux croisés de peptides protonés sélectionnés en masse et analysés par spectrométrie de masse par temps de vol constitue une preuve de la faisabilité de l'expérience. Nous pouvons désormais discuter du taux de comptage obtenu.

5.3.3 Mesure et estimation du taux de comptage

Par intégration de l'aire des pics des différents fragments, il est possible de déduire le taux de comptage par cycle des produits de l'interaction. Le taux de comptage des pics grisés sur la figure 5.3.3 a été estimé à 0.7 collisions par cycle. Nous pouvons noter que ce taux de comptage n'est qu'un ordre de grandeur supérieur à celui mesuré pour le fragment b₄⁺ produit par CID. Cette comparaison souligne la nécessité d'avoir un paquet d'ions cibles de la plus grande pureté possible.

Nous pouvons comparer ce taux de comptage expérimental à un calcul d'estimation, en prenant en compte l'intensité des deux faisceaux et leur recouvrement. Ainsi, pour des faisceaux continus orthogonaux entre eux, le taux de comptage R en collisions.s⁻¹ est obtenu par la relation suivante [294] :

$$R = \sigma \frac{1}{F} \frac{I_p \cdot I_c}{z_p \cdot z_c} \frac{\sqrt{v_p^2 + v_c^2}}{v_p \cdot v_c} \quad (5.3.1)$$

où σ représente la section efficace totale (m²) de toutes les réactions possibles, $I_{p/c}$, $z_{p/c}$ et $v_{p/c}$ représentent respectivement l'intensité (A), la charge (C) et la vitesse (m.s⁻¹) des projectiles et des cibles. Le facteur de forme F (m) prend en compte le recouvrement des faisceaux selon l'axe orthogonal de leur plan d'intersection. Ainsi, dans le cas de faisceaux gaussiens coplanaires de déviation standard σ_z , F est défini comme :

$$F = \sqrt{\sigma_{zp}^2 + \sigma_{zc}^2} \sqrt{2\pi} \quad (5.3.2)$$

De plus, si $v_p \gg v_c$, l'expression $\sqrt{v_p^2 + v_c^2}/v_p v_c$ se simplifie pour devenir $1/v_c$. L'équation 5.3.1 peut également être modifiée afin de prendre en compte la pulsation des faisceaux. Le paquet d'ions cible a alors une intensité équivalente à :

$$\frac{I_c}{z_c} = \frac{N_{\text{ions}}}{\Delta y_c} v_c \quad (5.3.3)$$

avec N_{ions} le nombre d'ions par paquet défini précédemment, et Δy_c la largeur du paquet selon son axe de propagation. En comparaison avec le cas du faisceau continu, la durée d'irradiation est ici égal à $\Delta_{\text{Proj}}/T_{\text{cycle}}$, où Δ_{Proj} représente la longueur de pulse du faisceau projectile, comme nous l'avons déjà mentionné. Ainsi, l'équation 5.3.1 peut finalement s'écrire :

$$R = \sigma \frac{1}{F} \frac{I_p}{z_p} \frac{\Delta_{\text{Proj}}}{T_{\text{cycle}}} \frac{N_{\text{ions}}}{\Delta y_c} \quad (5.3.4)$$

Cette dernière relation dépend ainsi des paramètres principaux de l'expérience. Cependant, comme nous l'avons déjà mentionné, N_{ions} est limité par les caractéristiques du piège, même si le groupeur permet d'augmenter localement la densité du paquet d'ions pour obtenir une largeur de paquet Δy_c . Le taux de répétition, limité au maximum à 10 Hz, est également limité

par la vitesse de pompage du gaz tampon d'hélium dans le piège. De plus, les pulses de faisceau projectile de durée Δ_{Proj} doivent être suffisamment courts afin de limiter la contribution du gaz résiduel tout en maximisant le recouvrement en temps avec le paquet d'ions cibles. La valeur choisie de $\Delta_{\text{Proj}} = 3 \mu\text{s}$ correspond à un compromis entre un relativement bon taux de comptage absolu, et un rapport signal sur bruit acceptable.

La section efficace totale de collision a été estimée à $\sim 10^{-15} \text{ cm}^2$, d'après une étude d'irradiation d'un gaz neutre de CH_4 par un faisceau d' He^+ à 10 keV [295]. Le taux de comptage peut alors être déterminé à l'aide des grandeurs suivantes :

Faisceau projectile :

- $I_p = 60 \mu\text{A}$
- $z_p = 1e$
- $\Delta_{\text{Proj}} = 3 \mu\text{s}$
- $\sigma_{z_p} = 1.6 \text{ mm}$

Paquet d'ions cibles :

- $N_{\text{Ions}} = 1,65 \cdot 10^5$ ions par paquet
- $\Delta y_c = 5 \text{ mm}$
- $\sigma_{z_c} = 4.3 \text{ mm}$

Finalement, avec $T_{\text{cycle}} = 100 \text{ ms}$, nous obtenons $R \simeq 4 \text{ collisions} \cdot \text{s}^{-1}$, soit $0.4 \text{ collisions} \cdot \text{cycle}^{-1}$. Ce résultat est bien en accord avec le taux de comptage obtenu expérimentalement de $0.7 \text{ collisions} \cdot \text{cycle}^{-1}$ et nous assure ainsi d'avoir un contrôle quantitatif des conditions expérimentales.

Suite à cette expérience qui permet de valider le fonctionnement du dispositif PIBALE pour un peptide de relativement petite taille, nous pouvons désormais étudier d'autres molécules d'intérêt biologique et de taille plus conséquente, comme par exemple, le peptide modèle de collagène.

5.4 Mise en phase gazeuse et irradiation du peptide modèle de collagène

Dans cette partie nous allons voir le résultat de l'irradiation du peptide $(\text{PPG})_{10}$ par le faisceau d'ions projectile produit par la source Mono1000, afin de le comparer à ceux obtenus par irradiation de photons. Nous essayerons ensuite de comprendre l'origine des fragments détectés produits par CID, mais dans un premier temps nous allons étudier le comportement du faisceau de molécules en sortie de source ESI en fonction des paramètres appliqués sur la source et le funnel.

5.4.1 Étude des conditions de source sur le faisceau de molécules

Comme lors de nos précédentes expériences avec le dispositif expérimental Paultje, la poudre du peptide (PPG)₁₀ a été diluée dans une solution d'eau et de méthanol (50/50 en volume), afin d'obtenir une concentration finale de 50 $\mu\text{Mol.L}^{-1}$. Suite à leur mise en phase gazeuse par la source ESI, nous avons fait varier les paramètres de mise en forme du faisceau afin d'observer quelles espèces moléculaires peuvent être produites. Afin de produire les trimères, ou les monomères, les tensions appliquées au capillaire chauffant et aux électrodes du funnel ont été ajustées pour que les ions subissent des collisions plus ou moins énergétiques sur le gaz résiduel.

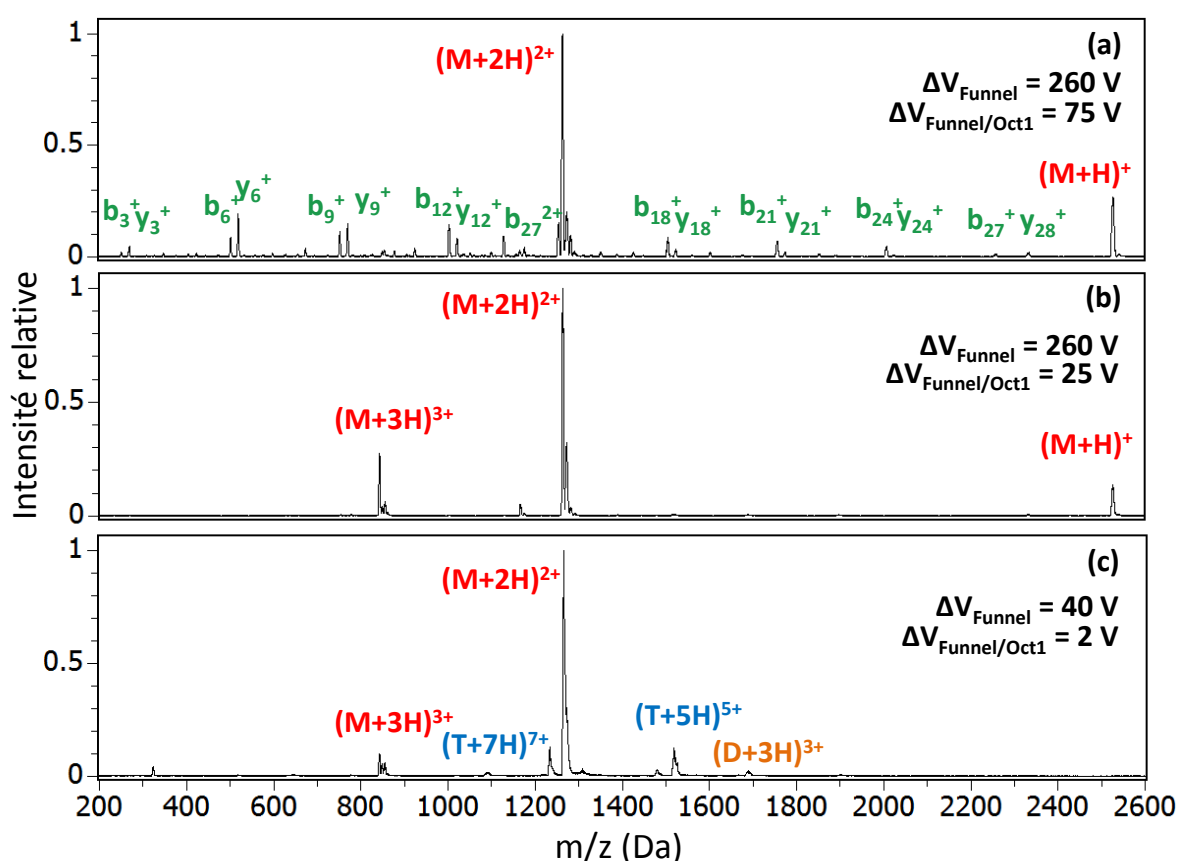


Figure 5.4.1 : Spectres de masse obtenus en sortie de source ESI. La variation des paramètres du funnel permet de modifier l'abondance des différentes espèces produites par la source. Les différences de potentiel entre d'une part le capillaire chauffant et les électrodes de sortie du funnel, et d'autre part l'électrode de sortie du funnel et l'octopôle 1 sont indiquées.

La figure 5.4.1 présente trois spectres de masse correspondant à différents paramètres appliqués sur le capillaire chauffant et le funnel, et obtenus sur le détecteur situé après le QMS. Celui-ci permet de caractériser les espèces produites en sortie de source. Pour ces mesures, les potentiels appliqués après le funnel sont restés inchangés. La différence de potentiel $\Delta_{\text{Funnel/Oct1}}$

entre la dernière électrode du funnel et l'octopôle 1 est donc également indiquée sur les spectres.

Une rampe de potentiel de 260 V a été appliquée entre le capillaire chauffant et la dernière électrode du funnel pour obtenir le spectre 5.4.1a. Cette rampe permet de donner suffisamment d'énergie cinétique aux molécules entre deux collisions sur le gaz résiduel ($P \sim 10^{-1}$ mbar dans le funnel) pour les faire fragmenter. Nous pouvons observer que même si le monomère doublement protoné est majoritaire dans le spectre de masse, de nombreux fragments sont présents. Par ailleurs, ces fragments correspondent aux couples de fragments b_{3n} et y_{3n} observés après photo-absorption, et dus à la rupture de la liaison Gly-Pro. De plus, même si les fragments de petites tailles semblent plus favorisés, nous les observons malgré tout pour $n = 1$ à 9. Ceci signifie que le peptide casse donc sur toute sa longueur, à chacune de ses liaisons Gly-Pro.

Le spectre de masse 5.4.1b correspond également à une différence de potentiel de 260 V. Cependant, les potentiels appliqués sur le capillaire chauffant et les électrodes sont toutes 50 V plus bas que dans le cas de la figure 5.4.1b, comme nous pouvons le voir avec les valeurs de $\Delta V_{\text{Funnel/Oct1}}$. Ces conditions permettent de limiter la fragmentation à la sortie du funnel, tout en favorisant différents états de charge du monomère, de 1 à 3+. Elles donnent malgré tout toujours trop d'énergie au système pour conserver les trimères intacts.

Ce n'est par contre pas le cas pour le spectre 5.4.1c, pour lequel la différence de potentiel est de 40 V. Ces conditions permettent de garantir que l'énergie cinétique gagnée entre deux collisions est suffisamment basse pour ne pas dissocier entièrement les trimères en monomères. En effet, nous pouvons toujours observer les monomères 2 et 3+, mais dorénavant, le dimère 3+, ainsi que les trimères 5 et 7+ apparaissent.

Suite à cette étude, il s'avère que l'espèce produite la plus facilement et la plus intensément est le monomère doublement protoné. Les différents paramètres de mise en forme du faisceau, depuis l'ESI jusqu'au QMS permettent d'obtenir jusqu'à 15 pA d'intensité pour cette espèce. Par ailleurs, il est d'autant plus intéressant d'utiliser un monomère pour les tests sur le dispositif PIBALE, car des systèmes non-covalents (dimères et trimères) sont susceptibles de fragmenter par CID dans le piège et compliquer ainsi l'analyse après irradiation.

5.4.2 Irradiation du peptide (PPG)₁₀ doublement protoné par un faisceau d'ions He⁺

Après optimisation des paramètres du groupeur et du recouvrement des faisceaux, nous avons irradié le monomère 2+ ($m/z = 1266$) par le faisceau d'ions He⁺ à 7 keV.

Le résultat de cette expérience est présenté sur la figure 5.4.2. La figure 5.4.2a correspond à une superposition des spectres [Cible-Sans faisceau] (S2 -S3) et [Collisions-Projectiles] (S4 -S1). Ces spectres sont alors corrigés de la contribution du gaz résiduel situé aux faibles temps de vol. Comme les produits de l'irradiation ne possèdent pas une intensité significative par rapport aux pics de bruit de fond, cette comparaison permet une analyse complémentaire à celle du spectre corrigé des différentes sources de bruits (S4 -S1 -S2 +S3), présenté sur la figure 5.4.2b.

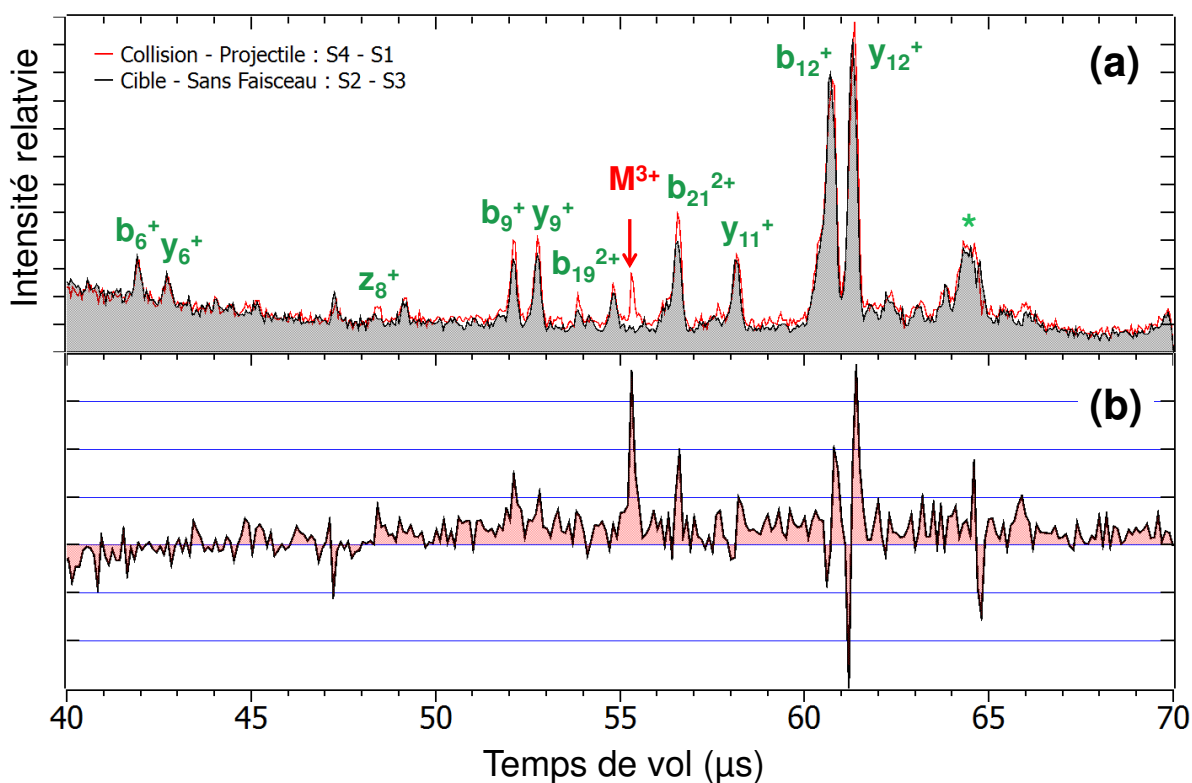


Figure 5.4.2 : (a) : Superposition des spectres de temps de vol (S2 -S3) et (S4 -S1) obtenus avant et après irradiation du monomère doublement protoné du peptide (PPG)₁₀. Le pic correspondant à l'ion parent est situé en dehors de la fenêtre de temps de vol, l'ionisation non-dissociative est présentée en rouge, et les fragments peptidiques en vert. La structure marquée d'une étoile correspond à une pollution. (b) : Spectre de temps de vol obtenu après soustraction des spectres S4-S1-S2+S3.

Le pic correspondant à l'ion parent possède un temps de vol d'environ 72 μs et est donc situé en dehors de la fenêtre en temps présentée sur la figure 5.4.2. Nous n'avons également pas inclus les faibles temps de vol sur ces graphes afin de nous focaliser sur la gamme en temps entre 40 et 70 μs. En effet, en observant la figure 5.4.2a, nous pouvons y relever des fragments présents dans les deux spectres, dus à de la CID, et correspondant principalement aux couples b_{3n} et y_{3n} .

Par ailleurs, nous observons sans ambiguïté l'ionisation non dissociative du monomère doublement protoné, situé à 55 μs. D'après le spectre 5.4.2b, le processus d'ionisation correspond à la contribution majoritaire produite par l'irradiation. Les intensités de certains fragments semblent également plus importantes après irradiation, comme par exemple les fragments b_{12}^+ et y_{12}^+ . Sur la différence des spectres, leurs intégrales apparaissent ponctuellement négatives, mais cet aspect est dû à une légère modification de la forme des pics de temps de vol. Leur intensité globale reste malgré tout positive après correction des différentes contributions du bruit de fond. De même, le fragment b_{21}^{2+} et les b_9^+ et y_9^+ sont légèrement positifs.

Les pics observables à plus faibles temps de vol, tels les b_6^+ et y_6^+ possèdent quant à eux une intensité quasiment nulle après corrections. De même, nous pouvons observer une structure non définie et identifiée par une étoile, vers $64.5 \mu\text{s}$. Son intensité globale est également proche de 0 après calcul de la différence. Cette structure pourrait donc être produite lors de l'extraction des ions dans le spectromètre de masse par collisions sur les grilles, comme nous l'avons déjà mentionné lors de l'analyse de l'irradiation du peptide de Leucine-Enképhaline.

L'irradiation du monomère doublement protoné du peptide $(\text{PPG})_{10}$ par un faisceau d' He^+ semble donc majoritairement induire l'ionisation du système, ainsi que sa fragmentation par rupture de la liaison Gly-Pro. Cet aspect est cohérent avec nos observations après irradiation de ce même peptide par photons VUV et X ou par des ions C^{4+} à 1 MeV/u (cf. figures D.1 et D.2 de l'annexe D). Cependant, à l'inverse du cas du peptide de Leucine-Enképhaline, les fragments produits par CID sont identiques aux fragments produits par l'interaction avec le faisceau d' He^+ . Il s'avère alors d'autant plus important de comprendre l'origine de cette CID afin d'essayer de réduire au maximum ces contributions dans les spectres de masse. Il est de plus intéressant de constater que la production des fragments b_{3n} et y_{3n} augmente avec n , ce qui est contraire à ce que nous avons pu observer lors de toutes nos études sur ce peptide. Nous avons donc réalisé des simulations de temps de vol dans SIMION, pour les différents fragments que nous observons expérimentalement, afin de déterminer à quel endroit du dispositif ces derniers sont produits.

5.4.3 CID des molécules dans le piège de Paul

Pour ces simulations, nous avons souhaité étudier la fragmentation du peptide doublement protoné lors de son injection ou de son extraction du piège. En effet, nous savons que la présence de gaz tampon d'hélium peut induire de la CID des molécules d'études. C'est pour cette raison que 50% du cycle de piégeage est utilisé pour pomper ce gaz. Cependant il peut s'avérer que malgré ce temps d'attente, la pression reste suffisamment élevée pour qu'une faible proportion des molécules subissent de la CID.

Expérimentalement, sur le $\text{DSP}_{\text{Biomol}}$, nous observons plusieurs pics de très faible intensité pour des temps de vol plus courts (et donc de plus petits rapports m/z) que le peptide doublement protoné, comme nous pouvons l'observer sur le spectre de temps de vol (en noir) de la figure 5.4.3. Ces différentes contributions représentées près de 0.3% de l'intégrale du monomère et sont donc loin d'être négligeables. A l'aide d'une calibration en masse, ces fragments ont été majoritairement attribués aux fragments b_{3n}^+ et y_{3n}^+ . La première étape de nos simulations est alors de vérifier que nous arrivons à bien reproduire ces différents temps de vol. Nous avons simulé les fragments suivants pour les mêmes paramètres de tensions que le cas expérimental :

- b_3^+ : $m/z = 252 \text{ Da}$
- b_6^+ : $m/z = 503 \text{ Da}$
- b_9^+ : $m/z = 754 \text{ Da}$
- b_{12}^+ : $m/z = 1006 \text{ Da}$

Sur la figure 5.4.3, Les distributions en temps de vol sur le $\text{DSP}_{\text{Biomol}}$ de ces différents fragments sont superposées à celle du peptide doublement protoné obtenue expérimentalement. Leur intensités relatives ont été ajustées afin de faciliter la comparaison avec le spectre expérimental. Nous pouvons constater une très bonne cohérence entre la mesure expérimentale et les simulations. Ces résultats sont de plus cohérents avec nos précédentes études, où nous avons vu que les intensités des fragments b_{3n} diminuent lorsque n augmente.

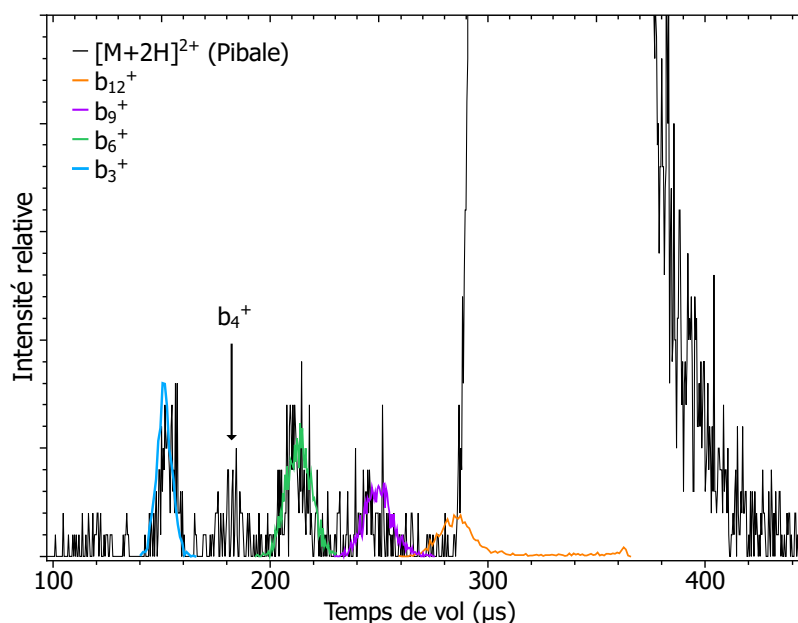


Figure 5.4.3 : Comparaison entre la distribution en temps de vol obtenue expérimentalement du monomère de $(\text{PPG})_{10}$ doublement protoné (en noir) et celles simulées des fragments b_{3n} pour $n = 1, 2, 3$ et 4 .

Nous pouvons directement constater que comme les fragments b_3 , b_6 et b_9 ont un temps de vol beaucoup plus court que le peptide parent, ils ne seront donc pas extraits dans le spectromètre de masse. Par ailleurs, la distribution en temps de vol du fragment b_{12} est beaucoup plus étalée pour des temps de vol plus élevés que celles des autres fragments, et se superpose avec celle du peptide parent. Ceci peut être dû au groupeur. Comme ce fragment possède un rapport masse sur charge relativement proche du monomère doublement protoné ($m/z = 1266$), une partie de ces fragments peut être présente dans le groupeur à l'instant où la rampe de potentiel est appliquée.

Nous avons donc représenté les distributions en position issues des simulations à l'instant t_{Switch} où la rampe du groupeur est appliquée, et ce, pour le monomère et les différents fragments énumérés précédemment. Afin de faciliter l'analyse, un schéma du dispositif provenant du logiciel SIMION est ajouté sous le graphique de la figure 5.4.4. Les traits pointillés rouges représentent la position de début et de fin du groupeur. Nous observons directement que la distribution du monomère est bien comprise et centrée à l'intérieur de celui-ci. Cependant, une partie des ions

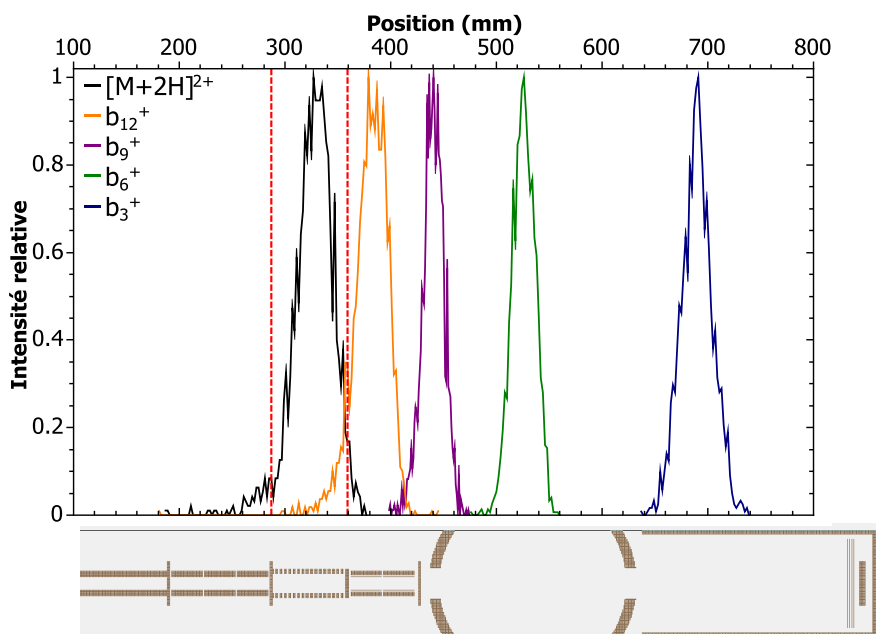


Figure 5.4.4 : Distributions en position du peptide $(PPG)_{10}$ doublement protoné et des fragments b_{3n} à l'instant t_{Switch} où la rampe du groupeur est appliquée. Une vue schématique provenant du logiciel SIMION est présentée sous le graphique. Les traits pointillés rouge représentent le début et la fin du groupeur.

b_{12} est également incluse dans le groupeur à l'instant t_{Switch} . Cette petite proportion d'ions va ainsi subir une perte d'énergie et se trouver au centre de la zone d'interaction au même instant que le monomère.

De la même manière que précédemment, la figure 5.4.5 présente les distributions en position dans la zone d'interaction de ces différents fragments et du monomère de $(PPG)_{10}$ à l'instant d'extraction dans le spectromètre de masse. Les traits pointillés rouges représentent cette fois le début et la fin de la zone d'interaction. Les pointillés gris représentent quand à eux le diamètre intérieur des électrodes d'extraction, également représentée sur le schéma du dispositif. Nous constatons que les fragments les plus légers, les b_3 , b_6 et b_9 , ont déjà traversé la ZI et ne sont donc pas extraits. Cependant, la portion des ions b_{12} qui était dans le groupeur se trouve au centre de la ZI avec le monomère $2+$ et sera par conséquent extraite et détectée sur le DSP_{ToF} .

Finalement, nous avons vu que les ions b_{12} sont beaucoup moins produits que les autres fragments de plus petite masse, que ce soit par photo-absorption et irradiation par des ions C^{4+} (cf. annexe D), ou par CID (cf. 5.4.3 et 5.4.1a). Dans le cas présent, pour les fragments créés dans le piège par CID, seule une faible partie d'entre eux est présente dans le groupeur lorsque la rampe est appliquée, et par conséquent dans la zone d'interaction au moment de l'extraction. C'est donc cette petite partie des ions b_{12} qui contribue majoritairement au bruit de fond présent sur les spectres Cible et Collision mesurés sur le DSP_{ToF} lors des interactions et présentés sur la figure 5.4.2.

Sur ces mêmes spectres, nous avons malgré tout observé des fragments b_{3n} plus petits. Cela signifie que le monomère intact subit également de la fragmentation lors de son extraction dans le spectromètre de masse. En effet, nous avons déjà mentionné que la structure située à $65 \mu\text{s}$ sur le spectre de la figure 5.4.2 pouvait être due à des collisions du peptide sur les grilles des zones d'extraction et d'accélération. Il est également possible que les fragments b_{3n} et y_{3n} observés lors des expériences d'irradiation soient produits lors de ces collisions.

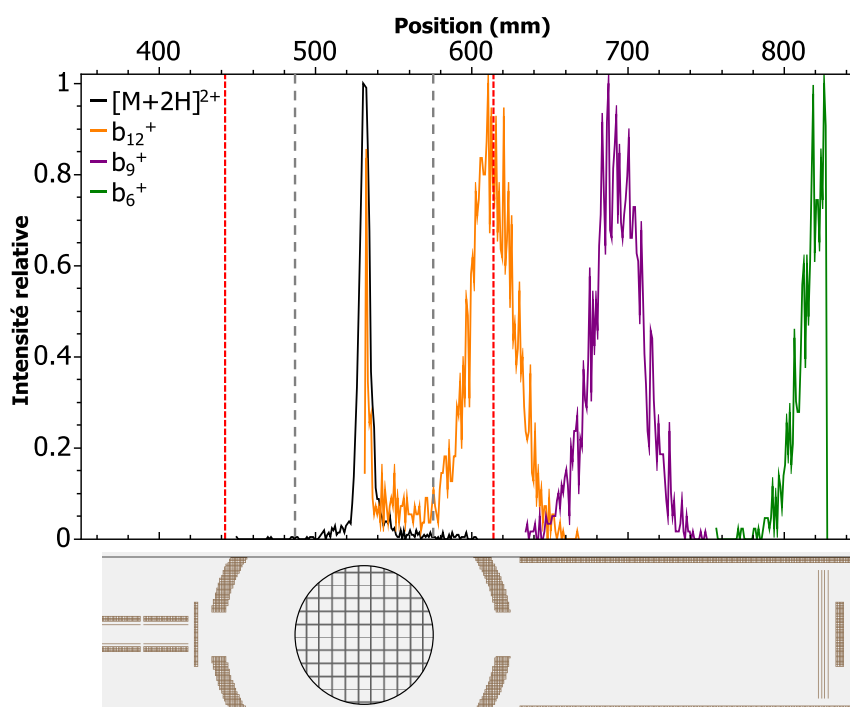


Figure 5.4.5 : Distributions en position du monomère $[(PPG)_{10}+2H]^{2+}$ et des fragments b_{3n} au moment de l'extraction dans le spectromètre de masse. Les traits pointillés rouge représentent le début et la fin du ZI et permettent la comparaison avec la vue schématique provenant du logiciel SIMION. La zone quadrillée et les pointillés gris représentent le diamètre interne des électrodes d'extraction.

5.5 Conclusion

Le dispositif PIBALE a été développé dans le but d'assurer l'irradiation de systèmes moléculaires biologiques isolés et sélectionnés en masse par un faisceau d'ions atomiques. Il permettra, à terme, l'analyse des processus survenant lors de l'interaction par spectrométrie de masse et mesures en coïncidence, mais la faible densité de molécules cibles induit un taux de comptage des produits de l'interaction relativement faible.

Afin de combler cette lacune, le groupeur d'ions a été développé. Celui-ci permet d'augmenter localement la densité d'ions en diminuant jusqu'à un facteur cinq la taille du paquet. La

focalisation des ions moléculaires au centre de la zone d'interaction favorise ainsi un meilleur recouvrement entre les deux faisceaux.

Il a alors été possible de réaliser des mesures d'interactions entre un faisceau de molécules de Leucine-Enképhaline de 25 eV et un faisceau d'ions atomiques He⁺ à 7 keV. L'acquisition de données en 4 cycles d'extraction permet de soustraire les différentes sources identifiées de bruit de fond afin de mettre en avant les produits de l'interaction. La fragmentation observée du peptide est alors cohérente avec de précédentes études de la littérature sur ce même peptide obtenues pour différents faisceaux atomiques d'irradiation. Cette expérience test, ainsi que la comparaison des taux de comptages attendu et expérimentaux ont ainsi permis de valider le fonctionnement du dispositif expérimental.

Nous avons ensuite étudié les interactions entre ce même faisceau projectile et les monomères doublement protonés du peptide (PPG)₁₀. L'ionisation non dissociative du peptide a été observée sans ambiguïté, mais contrairement au cas de la Leucine-Enképhaline les fragments produits par l'interaction des faisceaux sont identiques à ceux créés par CID du peptide, complexifiant ainsi l'analyse. Même si la plus grande partie de cette CID se produit à l'injection ou à l'extraction du piège à ions, seule une très faible proportion des fragments produits est finalement extraite et détectée. La majorité des contributions proviendrait alors de collisions du peptide sur les grilles situées entre les zones d'extraction/accélération, qui permettent l'application des différents champs électriques de manière homogène et la séparation avec la zone de vol libre. Afin de limiter ce phénomène de CID, des mesures ont été réalisées avec des grilles d'environ 95% de transmission (contre environ 80% actuellement) et dont le pas était de l'ordre de 0.5 mm, mais des effets de "micro-lentilles" ont été observés, à cause de l'inhomogénéité des champs électriques entre les zones d'extraction/accélération et accélération/vol libre.

Concernant le dispositif PIBALE, plusieurs aspects peuvent être explorés par la suite. L'étude d'espèces moléculaires cibles plus grosses peut s'avérer intéressante de par leur plus grande section efficace d'interaction, d'autant que plus le système est gros, moins il fragmente par CID à énergie de collision constante. Par ailleurs, l'étude de cibles déprotonées permettrait d'augmenter la section efficace de collision avec le faisceau d'ions projectiles d'He⁺. Cette configuration permettrait également de s'affranchir des contributions provenant du gaz résiduel. Cependant, une telle configuration nécessite des ajustements expérimentaux pour la production des ions cibles par ESI, leur transport et leur détection.

Conclusion

6

La compréhension de l'interaction des rayonnements avec la matière est au cœur de la recherche, fondamentale comme appliquée, et notamment en médecine pour le traitement de certaines tumeurs. Que ce soit par des photons X (radiothérapie) ou par des ions (hadronthérapie), ces traitements thérapeutiques permettent de cibler efficacement la zone à irradier, tout en y déposant une forte dose pour détruire les cellules tumorales. Il est cependant important de connaître les effets secondaires de ce type de traitement. L'équipe de radio-biologistes de notre laboratoire s'intéresse ainsi à l'irradiation du cartilage et aux effets secondaires qui peuvent survenir. De leurs études est née une collaboration avec deux autres équipes du laboratoire, dont la nôtre, l'objectif étant d'étudier l'irradiation des composants de la matrice extracellulaire du cartilage, principalement les fibres de collagène, et ce, à plusieurs échelles temporelles et spatiales. Les radio-biologistes se sont intéressés à l'échelle cellulaire, les chimistes de l'équipe MADIR se sont concentrés sur ces fibres de collagène en phase condensée, et dans l'équipe AMA, nous nous sommes focalisés sur des modèles de la triple hélice et de la première étape de la formation des fibres de collagène. Nos études se sont portées sur des systèmes en phase gazeuse, ce qui permet l'étude de leurs propriétés intrinsèques, dont les processus fondamentaux induits par des rayonnements ionisants.

Jusqu'à maintenant, ces modèles n'avaient jamais été étudiés en phase gazeuse. La première étape de notre étude consistait à vérifier si leur structure particulière en triple hélice est conservée en l'absence de solvant. Les expériences de mobilité ionique en tandem couplée à la spectrométrie de masse que nous avons effectuées en collaboration avec F. Chirot (ISA) et P. Dugourd (ILM) à Lyon nous ont permis de prouver que la triple hélice est bien conservée lorsque le nombre de protons du système est suffisamment important pour que la répulsion coulombienne l'empêche de se replier sur lui-même. Nous avons de plus montré que des agrégats de deux triples hélices peuvent être liés par l'interaction dipôle/dipôle, contrairement aux conclusions de précédentes études en phase condensée. Par ailleurs, nous souhaitons également vérifier si l'hydroxylation des prolines, une modification post-translationnelle abondante dans le collagène, peut accroître la stabilité de la triple hélice en phase gazeuse, comme c'est le cas en phase condensée. En comparant les résultats obtenus pour les modèles de la triple hélice hydroxylés et non-hydroxylés lorsque nous les soumettons à une énergie d'activation, il apparaît que le seuil d'énergie à apporter au système pour induire sa dissociation augmente dans le cas

du modèle hydroxylé. Ce résultat répond à la question du processus de stabilisation du peptide en phase condensée. Puisqu'en phase gazeuse le peptide est isolé de tout solvant, la stabilisation de la triple hélice par l'hydroxylation des prolines est directement liée aux propriétés du système, sûrement induite par des effets stéréoelectroniques et non par des interactions avec des molécules d'eau.

Lors d'une collaboration avec T. Schlathölter (université de Groningen), nous avons également soumis ces modèles à des irradiations de photons ionisants VUV et X, et d'ions C^{4+} à l'énergie du pic de Bragg. Cette énergie est pertinente avec l'hadronthérapie puisqu'elle correspond à celle des ions carbones lorsqu'ils sont dans la tumeur. Avec les photons, les irradiations ont été faites de 14 à 550 eV. L'absorption d'un photon de 14 eV permet de déposer dans le système une énergie légèrement supérieure au seuil d'ionisation des peptides protonés (~ 12 eV) par émission d'un électron d'une orbitale de valence. Le processus d'ionisation non dissociative atteint son maximum pour une absorption de photon de 20 eV. Entre ces deux énergies, la photo-excitation du système est également très présente, et induit sa fragmentation sans ionisation après redistribution de l'énergie dans ses modes de vibration. Cette fragmentation est majoritairement produite par rupture de sites préférentiels : les liaisons Gly-Pro, réparties tout le long du peptide. Ce processus se produit également après ionisation pour des énergies de photon supérieures à 20 eV. Pour les plus hautes énergies de photons X absorbés, nous constatons l'apparition de fragments internes provenant de ruptures de plusieurs liaisons du squelette peptidique, sans doute induites par l'augmentation de l'énergie déposée. Concernant le trimère, ces mêmes processus ont été observés, mais après l'ionisation, le peptide se dissocie d'abord de manière inter-moléculaire, en trois monomères, qui fragmentent de manière intra-moléculaire lorsque l'énergie du photon absorbé augmente, toujours en favorisant la liaison Gly-Pro. Cette fragmentation se trouve tout de même réduite par rapport au cas du peptide isolé, ce qui peut s'expliquer par l'augmentation de la taille du système. En effet, pour une même énergie déposée par le photon, elle se redistribue dans trois fois plus de degrés de liberté. Toutes ces observations vont dans le sens d'une fragmentation statistique, après redistribution de l'énergie déposée dans les degrés de liberté vibrationnels de l'état fondamental du système.

Lors des irradiations par les ions carbones, les spectres de masse sont similaires à ceux obtenus après absorption de rayons-X de 150 eV pour le monomère, et 288 eV pour le trimère. Concernant ce dernier, l'énergie déposée dans le système par les ions est tout de même plus faible que celle déposée par les photons, car nous constatons que les monomères produits après dissociation du système sont présents de manière beaucoup plus abondante dans le cas de l'absorption de photons. Par ailleurs, lors de l'irradiation par des ions, nous avons observé un phénomène nouveau par rapport à l'absorption de photon : le détachement de proton, dont l'abondance augmente avec le nombre de protons du système. Ce processus pourrait dépendre directement de l'acidité du système. Comme il n'a été observé qu'une fois auparavant et n'a pas été expliqué, des études expérimentales et théoriques plus poussées sont nécessaires. Des expériences d'irradiations de protéines de différentes tailles et de différents états de charges par le même faisceau d'ions carbones ont déjà été réalisées et sont actuellement en phase d'analyse.

L'hydroxylation des prolines induit une baisse de la fragmentation des modèles de la triple hélice, que nous avons interprétée comme une stabilisation vis-à-vis de la photo-absorption VUV.

De plus, avec des photons X, nous avons irradié un modèle de la première étape de la formation d'une fibre de collagène, formé de deux triples hélices (hexamère) agrégées par l'interaction dipôle/dipôle. L'hydroxylation de cet hexamère se caractérise par une fragmentation réduite, une abondance plus élevée de l'hexamère ionisé intact, et également par la présence de l'hexamère doublement ionisé intact. Ce dernier est totalement absent des spectres de masses obtenus pour l'hexamère du peptide non hydroxylé, et confirme une fois de plus que l'hydroxylation des prolines stabilise le système.

Ces expériences sur les peptides modèles de la triple hélice du collagène sont, à notre connaissance, les premières réalisées en phase gazeuse sur de tels systèmes. Nous avons pu caractériser leur structure, avant d'étudier leur stabilité sous rayonnements ionisants, tout en déterminant l'effet de la taille du système. Pour la suite, il pourrait être intéressant d'étudier la réponse des agrégats de triples hélices à une irradiation par un faisceau d'ions carbonés à l'énergie du pic de Bragg, afin de déterminer le rôle de la formation de la fibre de collagène. De plus, les irradiations de tous ces différents systèmes par des ions à des énergies plus basses que celle du pic du Bragg impliqueraient d'autres processus d'interactions, comme la capture électronique, et pourraient alors fournir des informations complémentaires sur leur stabilité.

C'est dans cette perspective que le dispositif PIBALE a été développé au laboratoire. L'irradiation de systèmes moléculaires en configuration de faisceaux croisés permettra, à terme, de réaliser des mesures en coïncidences lors de ces interactions, mais représente un challenge expérimental conséquent. Le développement et la mise en place d'un groupeur d'ions a permis d'augmenter localement la densité du paquet d'ions cibles au centre de la zone d'interaction afin d'obtenir un meilleur recouvrement entre les faisceaux. Ce développement a contribué au succès des premières irradiations du peptide de Leucine-Enképhaline. Les produits de l'interaction que nous avons obtenus sont cohérents avec de précédentes expériences d'irradiation de ce peptide par un faisceau d'ions projectile à 5 keV, ce qui permet de valider le fonctionnement du dispositif. Par ailleurs, l'accord entre les taux de comptage mesurés et estimés des fragments nous assure un contrôle quantitatif de l'expérience. Nous avons alors réalisé l'irradiation du peptide modèle de la triple hélice du collagène isolé doublement protoné par le faisceau d'He⁺ à 7 keV. La présence non ambiguë du peptide ionisé intact nous confirme la réussite de l'interaction, mais l'analyse des fragments produits par l'irradiation est rendue complexe par la fragmentation non désirée du peptide parent. Bien qu'encourageants, ces résultats démontrent la nécessité d'accroître le rapport signal sur bruit afin de permettre une analyse plus fine des produits de l'interaction. Une de ces solutions pour être de produire des molécules cibles déprotonées, afin d'augmenter la section efficace de collision et s'affranchir des ions positifs créés par ionisation du gaz résiduel.

Au cours de cette thèse, nous avons exploré les conséquences d'une irradiation par des rayonnements ionisants en termes d'ionisation et de fragmentation, principalement. Cependant, ce ne

sont sans doute pas les seuls processus radio-induits subis par les protéines ou brins d'ADN, qui sont des systèmes flexibles pouvant changer de structure géométrique. Le développement d'un nouveau dispositif permettant une irradiation entre deux étages de mobilité ionique pourrait s'avérer intéressant pour étudier les modifications structurales d'un système, comme sa dénaturation, après sélection en conformation et irradiation par rayonnements ionisants. Finalement, ces travaux de thèse ne sont que la première étape dans la collaboration entre physiciens et biologistes. Nous avons en effet constaté que le vieillissement radio-induit du cartilage entraîne des modifications structurales et l'émission de peptides de différentes tailles. Or, mêmes si les expériences réalisées par les chercheurs de l'équipe MADIR sont toujours en cours d'analyse, leurs premiers résultats semblent confirmer ces propriétés pour la phase condensée. Les biologistes vont donc pouvoir utiliser nos résultats pour connaître les conséquences de ces processus, comme par exemple les modifications cellulaires induites par effet Bystander, qui peuvent alors entraîner une mutation des cellules, leur division, ou leur mort.

Bibliographie

- [1] P. Sigmund. *Particle Penetration and Radiation Effects Volume 2*, volume 179. 2014.
- [2] P. Gagnon. The hidden Face Of Cern. *quantumdiaries*.
- [3] J.D. Grant and J.Y. Chang. Proton-based stereotactic ablative radiotherapy in early-stage non-small-cell lung cancer. *BioMed Research International*, 2014 :1–7, 2014.
- [4] P.C. Lara, J.J. López-Peñalver, V. de Araújo Farias, M.C. Ruiz-Ruiz, F.J. Oliver, and J.M. Ruiz de Almodóvar. Direct and bystander radiation effects : A biophysical model and clinical perspectives. *Cancer Letters*, 356(1) :5–16, 2015.
- [5] A.G. Georgakilas. Bystander and non-targeted effects : A unifying model from ionizing radiation to cancer. *Cancer letters*, 356(1) :6–7, 2014.
- [6] M. Maldonado and J. K. Nam. The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis. *BioMed research international*, 2013 :284873, 2013.
- [7] K. M. Prise and J. M. O'Sullivan. Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, 9(5) :351–360, 2009.
- [8] D. H. Vynios. Metabolism of cartilage proteoglycans in health and disease. *BioMed Research International*, 2014, 2014.
- [9] P. Roepstorff and J Fohlman. Proposal for a Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass Spectra of Peptides. *Biomedical Mass Spectrometry*, 11(11) :1984, 1984.
- [10] K. Biemann. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Bio-medical & environmental mass spectrometry*, 16(1-12) :99–111, 1988.
- [11] K. Biemann. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Methods in Enzymology*, 193(C) :886–887, 1990.
- [12] T. Daubenfeld. *Etude de complexes protéiques non covalents par spectrométrie de masse FT-ICR*. PhD thesis, 2010.
- [13] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, and C.M. Whitehouse. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246(4926) :64–71, 1989.
- [14] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, and C.M. Whitehouse. Electrospray ionization, principles and practice. *Mass Spectrometry Reviews*, 9(1) :37–70, 1990.
- [15] I. Jardine. Electrospray ionization mass spectrometry of biomolecules. *Nature*, 345(21 June) :747–748, 1990.

- [16] C.S. Ho, C.W.K. Lam, M.H.M. Chan, R.C.K. Cheung, L.K. Law, L.C.W. Lit, K F Ng, M W M Suen, and H L Tai. Electrospray ionisation mass spectrometry : principles and clinical applications. *The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*, 24(1) :3–12, 2003.
- [17] L.L.M. Malcolm Dole, L.L. Marck, L. Hines, R.C. Mobley, L.D. Ferguson, and M.B. Alice. Molecular Beams of Macroions. *J Chem.Phys.*, 49(5) :2240–2249, 1968.
- [18] S. Banerjee and S. Mazumdar. Electrospray Ionization Mass Spectrometry : A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2012 :1–40, 2012.
- [19] T. C Rohner, N. Lion, and H. H. Girault. Electrochemical and theoretical aspects of electrospray ionisation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 6(8) :3056–3058, 2004.
- [20] J.V. Iribarne. On the evaporation of small ions from charged droplets. *The Journal of Chemical Physics*, 64(6) :2287, 1976.
- [21] C.A. Lutomski, N.A. Lykтей, Z. Zhao, E.E. Pierson, A. Zlotnick, and M.F. Jarrold. Hepatitis B Virus Capsid Completion Occurs through Error Correction. *Journal of the American Chemical Society*, 139(46) :16932–16938, 2017.
- [22] A.C. Leney and A.J.R. Heck. Native Mass Spectrometry : What is in the Name? *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 28(1) :5–13, 2017.
- [23] M.R. Papantonakis, J. Kim, W.P. Hess, and R.F. Haglund. What do matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectra reveal about ionization mechanisms? *Journal of Mass Spectrometry*, 37(6) :639–647, 2002.
- [24] A.A. Puretzky, D.B. Geohegan, G.B. Hurst, M.V. Buchanan, and B.S. Luky'anchuk. Imaging of vapor plumes produced by matrix assisted laser desorption : A plume sharpening effect. *Physical Review Letters*, 83(2) :444–447, 1999.
- [25] J. Zhou, W. Ens, K.G. Standing, and A. Verentchikov. Kinetic Energy Measurements of Molecular Ions Ejected into an Electric Field by Matrix-assisted Laser Desorption. 6(September) :671–678, 1992.
- [26] V.V. Golovlev, S.L. Allman, W.R. Garrett, and C.H. Chen. Laser-induced acoustic desorption of electrons and ions. *Applied Physics Letters*, 71(6) :852–854, 1997.
- [27] G.A. Czerwieniec, S.C. Russell, C.B. Lebrilla, K.R. Coffee, V. Riot, P.T. Steele, M. Frank, and E.E. Gard. Improved sensitivity and mass range in time-of-flight bioaerosol mass spectrometry using an electrostatic ion guide. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16(11) :1866–1875, 2005.
- [28] M.L. Vestal, P. Juhasz, and S.a. Martin. Delayed Extraction Matrix-assisted Laser Desorption Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 9(July) :1044–1050, 1995.

-
- [29] W. Zhang, S. Niu, and B. Chait. Exploring Infrared Wavelength Matrix- Assisted Laser Desorption / Ionization of Proteins with Delayed-Extraction Time-of- Flight Mass Spectrometry. 0305(98), 1998.
- [30] F. Hillenkamp and M. Karas. Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods in Enzymology*, 193 :280–295, 1990.
- [31] G. Bolbach. Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Analysis of Non-Covalent Complexes : Fundamentals and Applications. pages 2535–2557, 2005.
- [32] F. Song. A Study of Noncovalent Protein Complexes by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18(7) :1286–1290, 2007.
- [33] P. Ryumin and R. Cramer. The composition of liquid atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization matrices and its effect on ionization in mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 1013 :43–53, 2018.
- [34] N. Morgner, H.D. Barth, and B. Brutschy. A new way to detect noncovalently bonded complexes of biomolecules from liquid micro-droplets by laser mass spectrometry. *Australian Journal of Chemistry*, 59(2) :109–114, 2006.
- [35] J. Hoffmann, T.L. Schmidt, A. Heckel, and B. Brutschy. Probing the limits of liquid droplet laser desorption mass spectrometry in the analysis of oligonucleotides and nucleic acids. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 22 :2161–2175, 2008.
- [36] J.Y. Kohno, N. Toyama, and T. Kondow. Ion formation to the gas phase by laser ablation on a droplet beam. *Chemical Physics Letters*, 420(1-3) :146–150, 2006.
- [37] A. Wattenberg, F. Sobott, H.D Barth, and B. Brutschy. Studying noncovalent protein complexes in aqueous solution with laser desorption mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 203(1-3) :49–57, 2000.
- [38] A. Charvat, E. Lugovoj, M. Faubel, and B. Abel. Analytical laser induced liquid beam desorption mass spectrometry of protonated amino acids and their non-covalently bound aggregates. *European Physical Journal D*, 20(3) :573–582, 2002.
- [39] F. Mafuné, Y. Takeda, T. Nagata, and T. Kondow. Formation and ejection of cluster ions from a liquid beam of aniline-ethanol solution by laser photoionization. *Chemical Physics Letters*, 199(6) :615–620, 1992.
- [40] T. Kim, A. V. Tolmachev, R. Harkewicz, D. C. Prior, G. Anderson, H.R. Udseth, R. D. Smith, T.H. Bailey, S. Rakov, and J. H. Futrell. Design and implementation of a new electrodynamic ion funnel. *Analytical Chemistry*, 72(10) :2247–2255, 2000.
- [41] R.T. Kelly, A.V. Tolmachev, J.S. Page, K. Tang, and R.D. Smith. The Ion Funnel : Theory, Implementations, and Applications. *Mass Spectrom Rev.*, 29(2) :294–312, 2010.

- [42] M.E Belov, M.V Gorshkov, H. R. Udseth, G. Anderson, A. V. Tolmachev, David C. Prior, R. Harkewicz, and R. D. Smith. Initial Implementation of an Electrodynamical Ion Funnel With Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. 0305(99), 2000.
- [43] A. Luca, S. Schlemmer, I. Cermak, and D. Gerlich. On the combination of a linear field free trap with a time-of-flight mass spectrometer. *Review of Scientific Instruments*, 72(7) :2900–2908, 2001.
- [44] Jason S. Page, Aleksey V. Tolmachev, Keqi Tang, and Richard D. Smith. Theoretical and experimental evaluation of the low m/z transmission of an electrodynamic ion funnel. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 17(4) :586–592, 2006.
- [45] R.E. March. An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 32(32) :351–369, 1997.
- [46] D. Gerlich. *Inhomogeneous RF Fields : A Versatile Tool for the Study of Processes with Slow Ions*. 1992.
- [47] P. Wolfgang. Electromagnetic Traps For Charged And Neutral Particles. *Reviews of Modern Physics*, 62(3), 1990.
- [48] D. J. Douglas and J. B. French. Collisional focusing effects in radio frequency quadrupoles. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 3(4) :398–408, 1992.
- [49] M.H. Friedman, A.L. Yergey, and J.E. Campana. Fundamentals of ion motion in electric radio- frequency multipole fields. *J. Phys. E. Sci. Instrum.*, 15, 1982.
- [50] F.G. Major, V.N. Gheorghe, and Günther Werth. *Charged Particle Traps, Physics and Techniques of Charged Particle Field Confinement*. 2005.
- [51] P.H. Dawson. Quadrupole Mass Analysers : Performance, design and some recent applications. *Mass Spectrometry Reviews*, 5(c) :1–37, 1986.
- [52] R. Brédy, J. Bernard, L. Chen, G. Montagne, B. Li, and S. Martin. An introduction to the trapping of clusters with ion traps and electrostatic storage devices. *Journal of Physics B : Atomic, Molecular and Optical Physics*, 42(15), 2009.
- [53] T.M. Bernhardt. Gas-phase kinetics and catalytic reactions of small silver and gold clusters. *International Journal of Mass Spectrometry*, 243(1) :1–29, 2005.
- [54] D.J. Douglas, A.J. Frank, and D. Mao. Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 24(1) :1–29, 2005.
- [55] Yishu Song, Guangxiang Wu, Qingyu Song, R. Graham Cooks, Zheng Ouyang, and Wolfgang R. Plass. Novel linear ion trap mass analyzer composed of four planar electrodes. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 17(4) :631–639, 2006.
- [56] J.C. Schwartz, M.W. Senko, and J.E.P. Syka. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 13(6) :659–669, 2002.

- [57] A.V. Tolmachev, H.R. Udseth, and R.D. Smith. Charge capacity limitations of radio frequency ion guides in their use for improved ion accumulation and trapping in mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 72(5) :970–978, 2000.
- [58] O. V. Boyarkin and V. Kopysov. Cryogenically cooled octupole ion trap for spectroscopy of biomolecular ions. *Review of Scientific Instruments*, 85(3), 2014.
- [59] A.G. Marshall, C.L. Hendrickson, and G.S. Jackson. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry : a primer. *Mass spectrometry reviews*, 17 :1–35, 1998.
- [60] V.H. Vartanian, J.S. Anderson, and D.A. Laude. Evolution of trapped ion cells in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 13(6) :234–239, 1994.
- [61] M.B. Comisarow and A.G. Marshall. Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, 25 :282–283, 1974.
- [62] A.G. Marshall and D.C. Roe. Theory of Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry : Response to frequency-sweep excitation. *The Journal of Chemical Physics*, 73(4) :1581–1590, 1980.
- [63] Masse-spec.fr. <https://masse-spec.fr/analyseur-temps-de-vol>.
- [64] W.C. Wiley and I.H. McLaren. Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution, 1955.
- [65] F. Chandezon, B. Huber, and C. Ristori. A new-regime Wiley-McLaren time-of-flight mass spectrometer. *Review of Scientific Instruments*, 65(11) :3344–3353, 1994.
- [66] L. Schwob. Ionisation et fragmentation de biomolécules sélectionnées en masse induites par impact d'ions et photo-absorption. 2017.
- [67] V. P. Glashchenko. Application of a reflector with a nonuniform field in a mass-reflectron. *Technical Physics*, 59(5) :754–761, 2014.
- [68] V. M. Doroshenko and R. J. Cotter. Ideal velocity focusing in a reflectron time-of-flight mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 10(10) :992–999, 1999.
- [69] B.a. Mamyrin. Time-of-flight mass spectrometry (concepts, achievements, and prospects). *International Journal of Mass Spectrometry*, 206 :251–266, 2001.
- [70] S. B. Bimurzaev. A time-of-flight mass reflectron with controlled ion-energy spread in the packet generated by an ion source. *Technical Physics Letters*, 40(2) :108–111, 2014.
- [71] H.E. Revercomb and E.A. Mason. Theory of Plasma Chromatography/Gaseous Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 47(7) :970–983, 1975.
- [72] N.A. Pierson and D.E. Clemmer. An IMS-IMS threshold method for semi-quantitative determination of activation barriers : Interconversion of proline cis - trans forms in triply protonated bradykinin. *International Journal of Mass Spectrometry*, 377(1) :646–654, 2015.

- [73] V. Gabelica, E.S. Baker, M.P. Teulade-Fichou, E. De Pauw, and M.T. Bowers. Stabilization and structure of telomeric and c-myc region intramolecular G-quadruplexes : The role of central cations and small planar ligands. *Journal of the American Chemical Society*, 129(4) :895–904, 2007.
- [74] M.F. Jarrold. Helices and Sheets in vacuo. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 9(14) :1659, 2007.
- [75] L. Chen, Q. Shao, Y.Q. Gao, and D.H. Russell. Molecular Dynamics and Ion Mobility Spectrometry Study of Model β -Hairpin Peptide, Trpzip1. *The Journal of Physical Chemistry A*, 115(17) :4427–4435, 2011.
- [76] F. Albrieux, F. Calvo, F. Chiro, A. Vorobyev, Y.O. Tsybin, V. Lepère, R. Antoine, J. Lemoine, and P. Dugourd. Conformation of polyalanine and polyglycine dications in the gas phase : Insight from ion mobility spectrometry and replica-exchange molecular dynamics. *Journal of Physical Chemistry A*, 114(25) :6888–6896, 2010.
- [77] J. Woenckhaus, Y. Mao, and M.F. Jarrold. Hydration of gas phase proteins : folded +5 and unfolded +7 charge states of cytochrome c. *Journal of Physical Chemistry B*, 101(6) :847–851, 1997.
- [78] F. Canon, R. Ballivian, F. Chiro, R. Antoine, P. Sarni-Manchado, J. Lemoine, and P. Dugourd. Folding of a salivary intrinsically disordered protein upon binding to tannins. *Journal of the American Chemical Society*, 133(20) :7847–7852, 2011.
- [79] S.L. Bernstein, T. Wyttenbach, A. Baumketner, J.-E. Shea, G. Bitan, D.B. Teplow, and M.T. Bowers. Amyloid beta-protein : monomer structure and early aggregation states of Abeta42 and its Pro19 alloform. *Journal of the American Chemical Society*, 127(5) :2075–2084, 2005.
- [80] B.T. Ruotolo, K. Giles, I. Campuzano, A.M. Sandercock, R.H. Bateman, and C.V. Robinson. Biochemistry : Evidence for macromolecular protein rings in the absence of bulk water. *Science*, 310(5754) :1658–1661, 2005.
- [81] B.T. Ruotolo, J.L.P. Benesch, A.M. Sandercock, S.-J. Hyung, and C.V. Robinson. Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes. *Nature Protocols*, 3(7) :1139–1152, 2008.
- [82] C. Uetrecht, I.M. Barbu, G.K. Shoemaker, E. Van Duijn, and A.J.R. Heck. Interrogating viral capsid assembly with ion mobility-mass spectrometry. *Nature Chemistry*, 3(2) :126–132, 2011.
- [83] S. A. McLuckey and M. Mentinova. Ion/neutral, ion/electron, ion/photon, and ion/ion interactions in tandem mass spectrometry : Do we need them all? Are they enough? *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 22(1) :3–12, 2011.
- [84] G. Chen, C.R. Graham, D.M. Bunk, M.J. Welch, and J.R. Christie. Partitioning of kinetic energy to internal energy in the low energy collision-induced dissociations of proton-bound dimers of polypeptides. *International Journal of Mass Spectrometry*, 185 :75–90, 1999.

- [85] I.A. Papayannopoulos. The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides. *Mass spectrometry reviews*, 14(April) :14, 1995.
- [86] T.J.D. Jørgensen, D. Delforge, J. Remacle, G. Bojesen, and P. Roepstorff. Collision-induced dissociation of noncovalent complexes between vancomycin antibiotics and peptide ligand stereoisomers : evidence for molecular recognition in the gas phase. *International Journal of Mass Spectrometry*, 188(1-2) :63–85, 1999.
- [87] B. Balta, V. Aviyente, and C. Lifshitz. Elimination of water from the carboxyl group of GlyGlyH⁺. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 14(10) :1192–1203, 2003.
- [88] T. Vaisar and J. Urban. Probing the proline effect in CID of protonated peptides. *Journal of Mass Spectrometry*, 31(10) :1185–1187, 1996.
- [89] R. L. Beardsley, C. M. Jones, A. S. Galhena, and V. H. Wysocki. Noncovalent protein tetramers and pentamers with "n" charges yield monomers with n/4 and n/5 charges. *Analytical Chemistry*, 81(4) :1347–1356, 2009.
- [90] M.A. Mabud, M. J. Dekrey, and C.R. Graham. Surface-induced dissociation of molecular ions. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 67(3) :285–294, 1985.
- [91] V. Grill, J. Shen, C. Evans, and R. G. Cooks. Collisions of ions with surfaces at chemically relevant energies : Instrumentation and phenomena. *Review of Scientific Instruments*, 72(8) :3149–3179, 2001.
- [92] J.H. Moon, S.H. Yoon, Y.J. Bae, and M.S. Kim. Dissociation kinetics of singly protonated leucine enkephalin investigated by time-resolved photodissociation tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 21(7) :1151–1158, 2010.
- [93] Z.B. Yang, E.R. Vorpagel, and J. Laskin. Experimental and theoretical studies of the structures and interactions of vancomycin antibiotics with cell wall analogues. *Journal of the American Chemical Society*, 130(39) :13013–13022, 2008.
- [94] S. K. Shin and S.-j. Han. Application of Sustained Off-Resonance Irradiation : The Beat Frequency Measurement and Radial Separation of Mass-Selected Ions. 0305(96), 1997.
- [95] K. R. Jennings. The changing impact of the collision-induced decomposition of ions on mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 200(1-3) :479–493, 2000.
- [96] J. Wu and S. A. McLuckey. Gas-phase fragmentation of oligonucleotide ions. *International Journal of Mass Spectrometry*, 237(2-3) :197–241, 2004.
- [97] J. Laskin, Z. Yang, C. Lam, and I. K. Chu. Charge-remote fragmentation of odd-electron peptide ions. *Analytical Chemistry*, 79(17) :6607–6614, 2007.

- [98] A. T. Iavarone, J. C. Jurchen, and E. R. Williams. Effects of solvent on the maximum charge state and charge state distribution of protein ions produced by electrospray ionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11(11) :976–985, 2000.
- [99] B. Barc, M. Ryszka, J.C. Pouilly, E. Jabbour Al Maalouf, Z. El Otell, J. Tabet, R. Parajuli, P.J.M. Van Der Burgt, P. Limão-Vieira, P. Cahillane, M. Dampc, N.J. Mason, and S. Eden. Multi-photon and electron impact ionisation studies of reactivity in adenine-water clusters. *International Journal of Mass Spectrometry*, 365-366 :194–199, 2014.
- [100] P. J. M. van der Burgt, S. Finnegan, and S. Eden. Electron impact fragmentation of adenine : partial ionization cross sections for positive fragments. *The European Physical Journal D*, 69(7) :173, 2015.
- [101] P. J.M. Van Der Burgt, F. Mahon, G. Barrett, and M. L. Gradziel. Electron impact fragmentation of thymine : Partial ionization cross sections for positive fragments. *European Physical Journal D*, 68(6), 2014.
- [102] A. N. Zvilopulo, O. B. Shpenik, and A. S. Agafonova. Electron impact ionization of gas-phase guanine near the threshold. *Journal of Physics B : Atomic, Molecular and Optical Physics*, 42(2), 2009.
- [103] H. Lioe and R.A.J. O’Hair. Comparison of collision-induced dissociation and electron-induced dissociation of singly protonated aromatic amino acids, cystine and related simple peptides using a hybrid linear ion trap-FT-ICR mass spectrometer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(5) :1429–1437, 2007.
- [104] P. Papp, P. Shchukin, J. Kočíšek, and S. Matejčík. Electron ionization and dissociation of aliphatic amino acids. *Journal of Chemical Physics*, 137(10), 2012.
- [105] B.A. Budnik and R.A. Zubarev. MH₂⁺ ion production from protonated polypeptides by electron impact : observation and determination of ionization energies and a cross-section. *Chemical Physics Letters*, 316(1-2) :19–23, 2000.
- [106] B.A. Budnik, Y.O. Tsybin, P. Håkansson, and R.A. Zubarev. Ionization energies of multiply protonated polypeptides obtained by tandem ionization in Fourier transform mass spectrometers. *Journal of Mass Spectrometry*, 37(11) :1141–1144, 2002.
- [107] M.Lj Ranković, A. Giuliani, and A.R. Milosavljevic. Electron impact action spectroscopy of mass/charge selected macromolecular ions : Inner-shell excitation of ubiquitin protein. *Applied Physics Letters*, 108(6), 2016.
- [108] Y. M E. Fung, C. M. Adams, and R.A. Zubarev. Electron ionization dissociation of singly and multiply charged peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 131(29) :9977–9985, 2009.
- [109] K. O. Zhurov, L. Fornelli, M. D. Wodrich, U. A. Laskay, and Y. O. Tsybin. Principles of electron capture and transfer dissociation mass spectrometry applied to peptide and protein structure analysis. *Chemical Society Reviews*, 42(12) :5014, 2013.

- [110] G. Hart-Smith. A review of electron-capture and electron-transfer dissociation tandem mass spectrometry in polymer chemistry. *Analytica Chimica Acta*, 808 :44–55, 2014.
- [111] K. Håkansson, R.R. Hudgins, A.G. Marshall, and R.A.J. O’Hair. Electron Capture Dissociation and Infrared Multiphoton Dissociation of Oligodeoxynucleotide Dications. *J. Am Soc Mass Spectrom*, 14(02) :23–41, 2003.
- [112] K. N. Schultz and K. Håkansson. Rapid electron capture dissociation of mass-selectively accumulated oligodeoxynucleotide dications. *International Journal of Mass Spectrometry*, 234(1-3) :123–130, 2004.
- [113] M.M. Savitski, M.L. Nielsen, and R.A. Zubarev. Side-chain losses in electron capture dissociation to improve peptide identification. *Analytical Chemistry*, 79(6) :2296–2302, 2007.
- [114] H. J Cooper, R. R Hudgins, K. Håkansson, and A. G Marshall. Characterization of amino acid side chain losses in electron capture dissociation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 13(3) :24124–24129, 2002.
- [115] G. Van Der Rest, R. Hui, G. Frison, and J. Chamot-Rooke. Dissociation channel dependence on peptide size observed in electron capture dissociation of tryptic peptides. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 22(9) :1631–1644, 2011.
- [116] J. Simons. Mechanisms for S-S and N-C α bond cleavage in peptide ECD and ETD mass spectrometry. *Chemical Physics Letters*, 484(4-6) :81–95, 2010.
- [117] R. A. Zubarev, N. A. Kruger, E. K. Fridriksson, M. A. Lewis, D. M. Horn, B. K. Carpenter, and F. W. McLafferty. Electron capture dissociation of gaseous multiply-charged proteins is favored at disulfide bonds and other sites of high hydrogen atom affinity. *Journal of the American Chemical Society*, 121(12) :2857–2862, 1999.
- [118] D. M. Horn, K. Breuker, A. J. Frank, and F. W. McLafferty. Kinetic intermediates in the folding of gaseous protein ions characterized by electron capture dissociation mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*, 123(40) :9792–9799, 2001.
- [119] N.A. Kruger, R.A. Zubarev, B.K. Carpenter, N.L. Kelleher, D.M. Horn, and F.W. McLafferty. Electron capture versus energetic dissociation of protein ions. *International Journal of Mass Spectrometry*, (182), 1999.
- [120] H. P. Gunawardena, M. He, P. A. Chrisman, S. J. Pitteri, J. M. Hogan, B. D.M. Hodges, and S. A. McLuckey. Electron transfer versus proton transfer in gas-phase ion/ion reactions of polyprotonated peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 127(36) :12627–12639, 2005.
- [121] S. J. Pitteri, P.A. Chrisman, and S. A. McLuckey. Electron-Transfer Ion/Ion Reactions of Doubly Protonated Peptides : Effect of Elevated Bath Gas Temperature Sharon. *Analytical Chemistry*, 77(17) :5662–5669, 2005.

- [122] P.A. Chrisman, S. J. Pitteri, J. M. Hogan, and S. A. McLuckey. SO₂⁻ · electron transfer ion/ion reactions with disulfide linked polypeptide ions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16(7) :1020–1030, 2005.
- [123] A. Chi, D. L. Bai, L. Y. Geer, J. Shabanowitz, and D. F. Hunt. Analysis of intact proteins on a chromatographic time scale by electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom.*, January 1(259(1-3)) :197–203, 2007.
- [124] J. Liu and S. A. McLuckey. Electron transfer dissociation : Effects of cation charge state on product partitioning in ion/ion electron transfer to multiply protonated polypeptides. *International Journal of Mass Spectrometry*, 330-332 :174–181, 2012.
- [125] K. Gupta, M. Kumar, K. Chandrashekar, K.S. Krishnan, and P. Balaram. Combined electron transfer dissociation-collision-induced dissociation fragmentation in the mass spectrometric distinction of leucine, isoleucine, and hydroxyproline residues in peptide natural products. *Journal of Proteome Research*, 11(2) :515–522, 2012.
- [126] V. Larraillet, R. Antoine, P. Dugourd, and J. Lemoine. Activated-electron photodetachment dissociation for the structural characterization of protein polyanions. *Analytical Chemistry*, 81(20) :8410–8416, 2009.
- [127] J. A. Madsen, R. R. Cheng, T. S. Kaoud, K. N. Dalby, D.E. Makarov, and J. S. Brodbelt. Charge-site-dependent dissociation of hydrogen-rich radical peptide cations upon vacuum UV photoexcitation. *Chemistry - A European Journal*, 18(17) :5374–5383, 2012.
- [128] D. Asakawa and E. De Pauw. Difference of Electron Capture and Transfer Dissociation Mass Spectrometry on Ni²⁺, Cu²⁺, and Zn²⁺-Polyhistidine Complexes in the Absence of Remote Protons. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 27(7) :1165–1175, 2016.
- [129] A. Giuliani, A.R. Milosavljevic, F. Canon, and L. Nahon. Contribution of synchrotron radiation to photoactivation studies of biomolecular ions in the gas phase. *Mass Spectrometry Reviews*, 33(5), 2014.
- [130] J. S. Brodbelt. Photodissociation mass spectrometry : new tools for characterization of biological molecules. *Chem. Soc. Rev.*, 43(8) :2757–2783, 2014.
- [131] D.P. Little, J.P. Speir, M.W. Senko, P.B. O'Connor, and F.W. McLafferty. Infrared Multiphoton Dissociation of Large Multiply Charged Ions for Biomolecule Sequencing. *Analytical Chemistry*, 66(18) :2809–2815, 1994.
- [132] P. K. Sarkar, P. K. Prajapati, V. J. Shukla, B. Ravishankar, and A. K. Choudhary. Toxicity and recovery studies of two ayurvedic preparations of iron. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47(12) :987–992, 2009.
- [133] J. A. Madsen 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*, 20(3) :349–358, 2009.

- [134] M. C. Crowe and J. S. Brodbelt. Infrared multiphoton dissociation (IRMPD) and collisionally activated dissociation of peptides in a quadrupole ion trap with selective IRMPD of phosphopeptides. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15(11) :1581–1592, 2004.
- [135] B. Paizs and S. Suhal. Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrometry Reviews*, 24(4) :508–548, 2005.
- [136] C. E. Crespo-Hernández, B. Cohen, P. M. Hare, and B. Kohler. Ultrafast excited-state dynamics in nucleic acids. *Chemical Reviews*, 104(4) :1977–2019, 2004.
- [137] D. Creed. The Photophysics and Photochemistry of the Near UV Absorbing Amino Acids. *Photochemistry and Photobiology*, 39(4) :577–583, 1984.
- [138] T. Tabarin, R. Antoine, M. Broyer, and P. Dugourd. Specific photodissociation of peptides with multi-stage mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(20) :2883–2892, 2005.
- [139] J.Y. Oh, J.H. Moon, and M.S. Kim. Sequence- and site-specific photodissociation at 266 nm of protonated synthetic polypeptides containing a tryptophanyl residue. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(22) :2706–2712, 2004.
- [140] J.Y. Oh, J.H. Moon, and M.S. Kim. Chromophore effect in photodissociation at 266 nm of protonated peptides generated by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI). *Journal of Mass Spectrometry*, 40(7) :899–907, 2005.
- [141] S. M. Kelly, T. J. Jess, and N. C. Price. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1751(2) :119–139, 2005.
- [142] R. Parthasarathi, Y. He, J. P. Reilly, and K. Raghavachari. New insights into the vacuum UV photodissociation of peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 132(5) :1606–1610, 2010.
- [143] T.Y. Kim, M.S. Thompson, and J.P. Reilly. Peptide photodissociation at 157 nm in a linear ion trap mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(12) :1657–1665, 2005.
- [144] M. Girod, Z. Sanader, M. Vojkovic, R. Antoine, L. MacAleese, J. Lemoine, V. Bonacic-Koutecky, and P. Dugourd. UV photodissociation of proline-containing peptide ions : Insights from molecular dynamics. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 26(3) :432–443, 2015.
- [145] D.F. Hunt, J. Shabanowitz, I. Yates John R, P.R. Griffin, and N.Z. Zhu. Tandem quadrupole spectrometry fourier transform mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 225 :1–10, 1989.
- [146] T.Y. Kim, J.C. Schwartz, and J.P. Reilly. Development of a linear ion trap/orthogonal-time-of-flight mass spectrometer for time-dependent observation of product ions by ultraviolet photodissociation of peptide ions. *Analytical Chemistry*, 81(21) :8809–8817, 2009.

- [147] H. M. Jeong, H. Y. So, and S. K. Myung. Photodissociation of singly protonated peptides at 193 nm investigated with tandem time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(22) :3248–3252, 2005.
- [148] J. P. Reilly. Ultraviolet Photofragmentation Of Biomolecular Ions. *Wiley InterScience*, 2009.
- [149] J. A. Madsen, D.R. Boutz, and J. S. Brodbelt. Ultrafast ultraviolet photodissociation at 193 nm and its applicability to proteomic workflows. *Journal of Proteome Research*, 9(8) :4205–4214, 2010.
- [150] J.B. Shaw and J. S. Brodbelt. Analysis of protein digests by transmission-mode desorption electrospray ionization mass spectrometry with ultraviolet photodissociation. *International Journal of Mass Spectrometry*, 308(2-3) :203–208, 2011.
- [151] S. Bari, O. Gonzalez-Magaña, G. Reitsma, J. Werner, S. Schippers, R. Hoekstra, and T. Schlathölter. Photodissociation of protonated leucine-enkephalin in the VUV range of 8-40 eV. *Journal of Chemical Physics*, 134(2), 2011.
- [152] L. Serrano-Andrés and M. P. Fülcher. Charge transfer transitions in neutral and ionic polypeptides : A theoretical study. *Journal of Physical Chemistry B*, 105(38) :9323–9330, 2001.
- [153] F. Canon, A.R. Milosavljevic, L. Nahon, and A. Giuliani. Action spectroscopy of a protonated peptide in the ultraviolet range. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17(39) :25725–25733, 2015.
- [154] M. L.J. Ranković, F. Canon, L. Nahon, A. Giuliani, and A.R. Milosavljevic. VUV action spectroscopy of protonated leucine-enkephalin peptide in the 6-14 eV range. *Journal of Chemical Physics*, 143(24), 2015.
- [155] A.R. Milosavljevic, V. Z. Cerovski, M. Lj Ranković, F. Canon, L. Nahon, and A. Giuliani. VUV photofragmentation of protonated leucine-enkephalin peptide dimer below ionization energy. *European Physical Journal D*, 68(3) :1–6, 2014.
- [156] T. Schlathölter and R. Hoekstra. Action Spectroscopy of Gas-Phase Peptide Ions With Energetic Photons. *Photophysics of Ionic Biochromophores*, pages 155–180, 2013.
- [157] H. W. Jochims, M. Schwell, H. Baumgärtel, and S. Leach. Photoion mass spectrometry of adenine , thymine and uracil in the 6 22 eV photon energy range. 314 :263–282, 2005.
- [158] O. González-Magaña, G. Reitsma, S. Bari, R. Hoekstra, and T. Schlathölter. Length effects in VUV photofragmentation of protonated peptides. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14(13) :4351, 2012.
- [159] L. Schwob, M. Lalande, D. Egorov, J. Rangama, R. Hoekstra, V. Vizcaino, T. Schlathölter, and J.C. Pouilly. Radical-driven processes within a peptidic sequence of type I collagen upon single-photon ionisation in the gas phase. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017.

- [160] A. Giuliani, A.R. Milosavljevic, F. Canon, L. Nahon, and M. Refregiers. Application of VUV synchrotron radiation to proteomic and analytical mass spectrometry. *Journal of Physics : Conference Series*, 425(PART 12), 2013.
- [161] A. Giuliani, A.R. Milosavljevic, K. Hinsen, F. Canon, C. Nicolas, M. Réfrégiers, and L. Nahon. Structure and charge-state dependence of the gas-phase ionization energy of proteins. *Angewandte Chemie - International Edition*, 51(38) :9552–9556, 2012.
- [162] A.R. Milosavljevic, C. Nicolas, J. Lemaire, C. Dehon, R. Thissen, J.-M. Bizau, M. Réfrégiers, L. Nahon, and A. Giuliani. Photoionization of a protein isolated in vacuo. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 13(34) :15432–15436, 2011.
- [163] A.R. Milosavljevic, F. Canon, C. Nicolas, C. Miron, L. Nahon, and A. Giuliani. Gas-phase protein inner-shell spectroscopy by coupling an ion trap with a soft X-ray beamline. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 3(9) :1191–1196, 2012.
- [164] Y. Zubavichus, A. Shaporenko, V. Korolkov, M. Grunze, and M. Zharnikov. X-ray absorption spectroscopy of the nucleotide bases at the carbon, nitrogen, and oxygen K-edges. *Journal of Physical Chemistry B*, 112(44) :13711–13716, 2008.
- [165] Y. Zubavichus, A. Shaporenko, M. Grunze, and M. Zharnikov. Innershell Absorption Spectroscopy of Amino Acids at All Relevant Absorption Edges. *Society*, pages 6998–7000, 2005.
- [166] Y. Zubavichus, A. Shaporenko, M. Grunze, and M. Zharnikov. Is X-ray absorption spectroscopy sensitive to the amino acid composition of functional proteins? *Journal of Physical Chemistry B*, 112(15) :4478–4480, 2008.
- [167] Y. Zubavichus, A. Shaporenko, M. Grunze, and M. Zharnikov. NEXAFS spectroscopy of biological molecules : From amino acids to functional proteins. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 603(1-2) :111–114, 2009.
- [168] A. Sanchez-Gonzalez, T. R. Barillot, R. J. Squibb, P. Kolorenc, M. Agaker, V. Averbukh, M. J. Bearpark, C. Bostedt, J. D. Bozek, S. Bruce, S. Carron Montero, R. N. Coffee, B. Cooper, J. P. Cryan, M. Dong, J. H.D. Eland, L. Fang, H. Fukuzawa, M. Guehr, M. Ilchen, A. S. Johnsson, C. Liekhus-S, A. Marinelli, T. Maxwell, K. Motomura, M. Mucke, A. Natan, T. Osipov, C. Ostlin, M. Pernpointner, V. S. Petrovic, M. A. Robb, C. Sathe, E. R. Simpson, J. G. Underwood, M. Vacher, D. J. Walke, T. J.A. Wolf, V. Zhaunerchyk, J. E. Rubensson, N. Berrah, P. H. Bucksbaum, K. Ueda, R. Feifel, L. J. Frasinski, and J.P. Marangos. Auger electron and photoabsorption spectra of glycine in the vicinity of the oxygen K-edge measured with an X-FEL. *Journal of Physics B : Atomic, Molecular and Optical Physics*, 48(23), 2015.
- [169] L. Journal, R. Guillemin, A. Haouas, P. Lablanquie, F. Penent, J. Palaudoux, L. Andric, M. Simon, D. Céolin, T. Kaneyasu, J. Viehhaus, M. Braune, W. B. Li, C. Elkharrat, F. Catoire, J. C. Houver, and D. Dowek. Resonant double Auger decay in carbon K

- shell excitation of CO. *Physical Review A - Atomic, Molecular, and Optical Physics*, 77(4) :1–14, 2008.
- [170] J. H.D. Eland, P. Linusson, L. Hedin, E. Andersson, J. E. Rubensson, and R. Feifel. Triple ionisation of methane by double Auger and related pathways. *Chemical Physics Letters*, 485(1-3) :21–25, 2010.
- [171] A.R. Milosavljevic, C. Nicolas, M.L. Ranković, F. Canon, C. Miron, and A. Giuliani. K-Shell Excitation and Ionization of a Gas-Phase Protein : Interplay between Electronic Structure and Protein Folding. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 6(16) :3132–3138, 2015.
- [172] O. Plekan, V. Feyer, R. Richter, M. Coreno, M. de Simone, and K. C. Prince. Photo-fragmentation of guanine, cytosine, leucine and methionine. *Chemical Physics*, 334(1-3) :53–63, 2007.
- [173] R. R.T. Marinho, A. F. Lago, M. G.P. Homem, L. H. Coutinho, G. G.B. de Souza, and A. Naves de Brito. Gas phase photoabsorption and mass spectra of l-alanine and l-proline in the soft X-ray region. *Chemical Physics*, 324(2-3) :420–424, 2006.
- [174] O. Plekan, V. Feyer, R. Richter, M. Coreno, M. de Simone, K. C. Prince, and V. Caravetta. An X-ray absorption study of glycine, methionine and proline. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 155(1-3) :47–53, 2007.
- [175] D. Egorov, L. Schwob, M. Lalande, and R. Hoekstra. Near edge X-ray absorption mass spectrometry of gas phase proteins : the influence of protein size. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18 :26213–26223, 2016.
- [176] D. Vernhet, J.P. Rozet, K. Wohrer, L. Adoui, C. Stiphan, A. Cassimi, and J.M. Ramillon. Excitation in swift heavy ion-atom collisions. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 107 :71–78, 1996.
- [177] J. Tabet, S. Eden, S. Feil, H. Abdoul-Carime, B. Farizon, M. Farizon, S. Ouaskit, and T.D. Märk. 20-150-keV proton-impact-induced ionization of uracil : Fragmentation ratios and branching ratios for electron capture and direct ionization. *Physical Review A - Atomic, Molecular, and Optical Physics*, 81(1), 2010.
- [178] Y.D. Wang, C.D. Lin, N. Toshima, and Z. Chen. Ionization and charge transfer in collisions of highly charged ions with helium at low velocity. 52(4) :2852–2858, 1995.
- [179] J. Tabet, S. Eden, S. Feil, H. Abdoul-Carime, B. Farizon, M. Farizon, S. Ouaskit, and T.D. Märk. Absolute total and partial cross sections for ionization of nucleobases by proton impact in the Bragg peak velocity range. *Physical Review A - Atomic, Molecular, and Optical Physics*, 82(2) :1–5, 2010.
- [180] J. Daligault, F. Chandezon, C. Guet, B. Huber, and S. Tomita. Energy transfer in collisions of metal clusters with multiply charged ions. *Physical Review A*, 66 :1–7, 2002.

- [181] T. Bergen, X. Biquard, A. Brenac, F. Chandezon, B. A. Huber, D. Jalabert, H. Lebius, M. Maurel, E. Monnard, J. Opitz, A. Pesnelle, B. Pras, C. Ristori, and J. C. Rocco. Multiply charged cluster ion crossed-beam apparatus : Multi-ionization of clusters by ion impact. *Review of Scientific Instruments*, 70(8) :3244–3253, 1999.
- [182] S. Bari, R. Hoekstra, and T. Schlathölter. Peptide fragmentation by keV ion-induced dissociation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(14) :3376–3383, mar 2010.
- [183] S. Bari, R. Hoekstra, and T. Schlathölter. Fast side-chain losses in keV ion-induced dissociation of protonated peptides. *International Journal of Mass Spectrometry*, 299(1) :64–70, 2011.
- [184] S. Martin, C. Ortega, L. Chen, R. Brédy, A. Vernier, P. Dugourd, R. Antoine, J. Bernard, G. Reitsma, O. González-Magaña, R. Hoekstra, and T. Schlathölter. Electron capture and deprotonation processes observed in collisions between Xe 8+ and multiply protonated cytochrome-C. *Physical Review A*, 89(1) :012707, jan 2014.
- [185] S. Maclot, D. G. Piekarski, A. Domaracka, A. Mery, V. Vizcaino, L. Adoui, F. Martín, M. Alcamí, B. A. Huber, P. Rousseau, and S. Diaz-Tendero. Dynamics of Glycine Dications in The Gas Phase : Intramolecular Hydrogen Migration vs. Coulomb Repulsion. *J. Phys. Chem. Lett.*, 4 :3903–3909, 2013.
- [186] R. Brédy, J. Bernard, L. Chen, B. Wei, A. Salmoun, T. Bouchama, M. C. Buchet-Poulizac, and S. Martin. Fragmentation of adenine induced by collision with slow F 2+ ions. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B : Beam Interactions with Materials and Atoms*, 235(1-4) :392–396, 2005.
- [187] R. Brédy, J. Bernard, L. Chen, M. C. Buchet-Poulizac, and S. Martin. Dissociation of charge selected biomolecules induced by electronic capture processes in collisions with positive ions. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B : Beam Interactions with Materials and Atoms*, 261(1-2 SPEC. ISS.) :114–117, 2007.
- [188] T. Schlathölter, F. Alvarado, S. Bari, and R. Hoekstra. Ion-induced ionization and fragmentation of DNA building blocks. *Physica Scripta*, 73(4), 2006.
- [189] S. Bari, F. Alvarado, J. Postma, P. Sobocinski, R. Hoekstra, and T. Schlathölter. Kinetic energy releases of small amino acids upon interaction with keV ions. *European Physical Journal D*, 51(1) :81–87, 2009.
- [190] J. Bernard, R. Brédy, L. Chen, S. Martin, and B. Wei. Relative partial cross-sections and target fragmentation in ion-adenine collisions at 56 keV. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B : Beam Interactions with Materials and Atoms*, 245(1) :103–107, 2006.
- [191] B. Li, X. Ma, X.L. Zhu, S.F. Zhang, H.P. Liu, W.T. Feng, D.B. Qian, D.C. Zhang, L. Chen, R. Brédy, G. Montagne, J. Bernard, and S. Martin. High negative ion production yield in 30 keV F 2+ + adenine (C₅H₅N₅) collisions. *Journal of Physics B : Atomic, Molecular and Optical Physics*, 42(7) :075204, 2009.

- [192] J. Tabet, S. Eden, S. Feil, H. Abdoul-Carime, B. Farizon, M. Farizon, S. Ouaskit, and T. D. Märk. Mass spectrometry (fragmentation ratios) of DNA base molecules following 80 keV proton impact with separation of direct ionization and electron capture processes. *International Journal of Mass Spectrometry*, 292(1-3) :53–63, 2010.
- [193] R. Brédy, J. Bernard, L. Chen, G. Montagne, B. Li, and S. Martin. Fragmentation of adenine under energy control. *Journal of Chemical Physics*, 130(11) :1–12, 2009.
- [194] F. Alvarado, J. Bernard, B. Li, R. Brédy, L. Chen, R. Hoekstra, S. Martin, and T. Schlathölter. Precise determination of 2-deoxy-D-ribose internal energies after keV proton collisions. *ChemPhysChem*, 9(9) :1254–1258, 2008.
- [195] S. Maclot, D.G. Piekarski, R. Delaunay, A. Domaracka, A. Méry, V. Vizcaino, J.Y. Chesnel, F. Martín, M. Alcamí, B.A. Huber, L. Adoui, P. Rousseau, and S. Díaz-Tendero. Stability of the glycine cation in the gas phase after interaction with multiply charged ions. *European Physical Journal D*, 68(6) :1–7, 2014.
- [196] A.N. Agnihotri, S. Kasthurirangan, S. Nandi, A. Kumar, M.E. Galassi, R.D. Rivarola, O. Fojón, C. Champion, J. Hanssen, H. Lekadir, P.F. Weck, and L.C. Tribedi. Ionization of uracil in collisions with highly charged carbon and oxygen ions of energy 100 keV to 78 MeV. *Physical Review A - Atomic, Molecular, and Optical Physics*, 85(3), 2012.
- [197] M. C. Bacchus-Montabonel, M. Łabuda, Y. S. Tergiman, and J. E. Sienkiewicz. Theoretical treatment of charge-transfer processes induced by collision of Cq⁺ ions with uracil. *Physical Review A - Atomic, Molecular, and Optical Physics*, 72(5) :1–9, 2005.
- [198] A.N. Agnihotri, S. Kasthurirangan, S. Nandi, A. Kumar, C. Champion, H. Lekadir, J. Hanssen, P.F. Weck, M.E. Galassi, R.D. Rivarola, O. Fojón, and L.C. Tribedi. Absolute total ionization cross sections of uracil (C₄H₄N₂O₂) in collisions with MeV energy highly charged carbon, oxygen and fluorine ions. *Journal of Physics B : Atomic, Molecular and Optical Physics*, 46(18), 2013.
- [199] B. Coupier, B. Farizon, M. Farizon, M. J. Gaillard, F. Gobet, N. V. De Castro Faria, G. Jalbert, S. Ouaskit, M. Carré, B. Gstir, G. Hanel, S. Denifl, L. Feketeova, P. Scheier, and T. D. Märk. Inelastic interactions of protons and electrons with biologically relevant molecules. *European Physical Journal D*, 20(3) :459–468, 2002.
- [200] T. Schlathölter, R. Hoekstra, and R. Morgenstern. Charge driven fragmentation of biologically relevant molecules. *International Journal of Mass Spectrometry*, 233(1-3) :173–179, 2004.
- [201] T. Schlathölter, F. Alvarado, S. Bari, A. Lecointre, R. Hoekstra, V. Bernigaud, B. Manil, J. Rangama, and B.A. Huber. Ion-induced biomolecular radiation damage : From isolated nucleobases to nucleobase clusters. *ChemPhysChem*, 7(11) :2339–2345, 2006.
- [202] L.C. Tribedi, A.N. Agnihotri, M.E. Galassi, R.D. Rivarola, and C. Champion. Ionization of uracil in collisions with fast bare ions. *European Physical Journal D*, 66 :303, 2012.

- [203] J.C. Pouilly, J. Miles, S. De Camillis, A. Cassimi, and J.B. Greenwood. Proton irradiation of DNA nucleosides in the gas phase. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17 :7172–7180, 2015.
- [204] Z. Deng, I. Bald, E. Illenberger, and M.a. Huels. Beyond the bragg peak : Hyperthermal heavy ion damage to DNA components. *Physical Review Letters*, 95(15) :1–4, 2005.
- [205] B. Brodsky and J.A.M. Ramshaw. The collagen triple-helix structure. *Matrix Biology*, 15(8-9) :545–554, 1997.
- [206] M.D. Shoulders and R.T. Raines. Collagen Structure and Stability. *Annu Rev Biochem*, 78(3) :929–958, 2009.
- [207] I. Volonghi, A. Pezzini, E. Del Zotto, A. Giossi, P. Costa, D. Ferrari, and A. Padovani. Role of COL4A1 in Basement-Membrane Integrity and Cerebral Small-Vessel Disease. The COL4A1 Stroke Syndrome. *Current Medicinal Chemistry*, 17(13) :1317–1324, 2010.
- [208] J. Bella, M. Eaton, B. Brodsky, and H. Berman. Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution. *Science*, 266(5182) :75–81, 1994.
- [209] Y. Li and S.M. Yu. Targeting and mimicking collagens via triple helical peptide assembly. *Current Opinion in Chemical Biology*, 17(6) :968–975, 2013.
- [210] A.A. Jalan and J.D. Hartgerink. Pairwise interactions in collagen and the design of heterotrimeric helices. *Current Opinion in Chemical Biology*, 17(6) :960–967, 2013.
- [211] K. Jariashvili, B. Madhan, B. Brodsky, A. Kuchava, L. Namicheishvili, and N. Metreveli. Uv damage of collagen : Insights from model collagen peptides. *Biopolymers*, 97(3) :189–198, 2012.
- [212] N. Metreveli, L. Namicheishvili, K. Jariashvili, G. Mrevlishvili, and A. Sionkowska. Mechanisms of the influence of UV irradiation on collagen and collagen-ascorbic acid solutions. *International Journal of Photoenergy*, 2006 :1–4, 2006.
- [213] F. W. Kotch, I.A. Guzei, and R. T. Raines. Stabilization of the Collagen Triple Helix by O-Methylation of Hydroxyproline Residues. *Journal of the American Chemical Society*, 130 :2952, 2008.
- [214] S. Sakakibara, K. Inouye, K. Shudo, Y. Kishida, Y. Kobayashi, and D.J. Prockop. Synthesis of (Pro-Hyp-Gly)_n of defined molecular weights Evidence for the stabilization of collagen triple helix by hydroxyproline. *BBA - Protein Structure*, 303(1) :198–202, 1973.
- [215] I. Perdivara, L. Perera, M. Sricholpech, M. Terajima, N. Pleshko, M. Yamauchi, and K.B. Tomer. Unusual fragmentation pathways in collagen glycopeptides. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 24(7) :1072–1081, 2013.
- [216] J. Bella, B. Brodsky, and H.M. Berman. Hydration structure of a collagen peptide. *Structure*, 3(9) :893–906, 1995.
- [217] R. Berisio, L. Vitagliano, L. Mazzarella, and A. Zagari. Crystal structure of the collagen triple helix model [(Pro-Pro-Gly)₁₀]₃. *Protein science*, 11(2) :262–270, 2002.

- [218] S.M. Yu, Y. Li, and D. Kim. Collagen mimetic peptides : progress towards functional applications. *Soft Matter*, 7(18) :7927, 2011.
- [219] B. Brodsky, G. Thiagarajan, B. Madhan, and K. Kar. Triple-helical peptides : An approach to collagen conformation, stability, and self-association. *Biopolymers*, 89(5) :345–353, 2008.
- [220] R. Berisio, V. Granata, L. Vitaglieno, and A. Zagari. Characterization of Collagen-Like Heterotrimers : Implications for Triple-Helix Stability. *Biopolymers*, 73(6) :682–688, 2004.
- [221] R. Improta, C. Benzi, and V. Barone. Understanding the role of stereoelectronic effects in determining collagen stability. A quantum mechanical study of proline, hydroxyproline, and fluoroproline dipeptide analogues in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society*, 123(50) :12568–12577, 2001.
- [222] F. Lanucara, S.W. Holman, C.J. Gray, and C.E. Eyers. The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics. *Nature Chemistry*, 6(4) :281–294, 2014.
- [223] S.L. Bernstein, N.F. Dupuis, N.D. Lazo, T. Wyttenbach, M.M. Condrón, G. Bitan, D.B. Teplow, J.E. Shea, B.T. Ruotolo, C.V. Robinson, and M.T. Bowers. Amyloid- β 2 protein oligomerization and the importance of tetramers and dodecamers in the aetiology of Alzheimer's disease. *Nature Chemistry*, 1(4) :326–331, 2009.
- [224] T.N. Le, J.C. Pouilly, F. Lecomte, N. Nieuwjaer, B. Manil, C. Desfrancois, F. Chiro, J. Lemoine, P. Dugourd, G. Van Der Rest, and G. Grégoire. Gas-phase structure of amyloid- β (12 - 28) peptide investigated by infrared spectroscopy, electron capture dissociation and ion mobility mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 24(12) :1937–1949, 2013.
- [225] S.J. Allen, R.M. Eaton, and M.F. Bush. Structural Dynamics of Native-Like Ions in the Gas Phase : Results from Tandem Ion Mobility of Cytochrome c. *Analytical Chemistry*, 89(14) :7527–7534, 2017.
- [226] H. Li, B. Bendiak, W.F. Siems, D.R. Gang, and H.H. Hill. Carbohydrate Structure Characterization by Tandem Ion Mobility Mass Spectrometry (IMMS)2. 25(8) :713–724, 2015.
- [227] B.D. Adamson, N.J.A. Coughlan, P.B. Markworth, R.E. Continetti, and E.J. Bieske. An ion mobility mass spectrometer for investigating photoisomerization and photodissociation of molecular ions. *Review of Scientific Instruments*, 85(12), 2014.
- [228] S.L. Koeniger, S.I. Merenbloom, S.J. Valentine, M.F. Jarrold, H.R. Udseth, R.D. Smith, and D.E. Clemmer. An IMS - IMS Analogue of MS - MS. *Analytical chemistry*, 78(12) :4161–4174, 2006.

- [229] J. Dilger, L. Musbat, M. Sheves, A.V. Bochenkova, D.E. Clemmer, and Y. Toker. Direct measurement of the isomerization barrier of the isolated retinal chromophore. *Angewandte Chemie - International Edition*, 54(16) :4748–4752, 2015.
- [230] S. Poyer, C. Comby-Zerbino, C.M. Choi, L. Macaleese, C. Deo, N. Bogliotti, J. Xie, J.Y. Salpin, P. Dugourd, and F. Chirot. Conformational Dynamics in Ion Mobility Data. *Analytical Chemistry*, 89(7) :4230–4237, 2017.
- [231] I. Czerwinska, A. Kulesza, C. Choi, F. Chirot, A.L. Simon, J. Far, C. Kune, E. de Pauw, and P. Dugourd. Supramolecular influence on cis-trans isomerization probed by ion mobility spectrometry. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18(47) :32331–32336, 2016.
- [232] A.L. Simon, F. Chirot, C.M. Choi, C. Clavier, M. Barbaire, J. Maurelli, X. Dagany, L. MacAleese, and P. Dugourd. Tandem ion mobility spectrometry coupled to laser excitation. *Review of Scientific Instruments*, 86(9), 2015.
- [233] K. Kar, P. Amin, M.A. Bryan, A.V. Persikov, A.M.Y.H. Wang, and B. Brodsky. Self-association of collagen triple helix peptides into higher order structures. *Journal of Biological Chemistry*, 281(44) :33283–33290, 2006.
- [234] R.W. Purves, D.A. Barnett, B. Ells, and R. Guevremont. Investigation of bovine ubiquitin conformers separated by high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry : Cross section measurements using energy-loss experiments with a triple quadrupole mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11(8) :738–745, 2000.
- [235] S. Myung, E.R. Badman, Y.J. Lee, and D.E. Clemmer. Structural transitions of electrosprayed ubiquitin ions stored in an ion trap over 10 ms to 30 s. *Journal of Physical Chemistry A*, 106(42) :9976–9982, 2002.
- [236] S.L. Koeniger, S.L. Merenbloom, and D.E. Clemmer. Evidence for many resolvable structures within conformation types of electrosprayed ubiquitin ions. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(13) :7017–7021, 2006.
- [237] M.F. Bush, Z. Hall, K. Giles, J. Hoyes, C.V. Robinson, and B.T. Ruotolo. Collision cross sections of proteins and their complexes : A calibration framework and database for gas-phase structural biology. *Analytical Chemistry*, 82(22) :9557–9565, 2010.
- [238] D.P. Smith, K. Giles, R.H. Bateman, S.E. Radford, and A.E. Ashcroft. Monitoring Copopulated Conformational States During Protein Folding Events Using Electrospray Ionization-Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18(12) :2180–2190, 2007.
- [239] S. Daly, A. Kulesza, F. Poussigue, A.L. Simon, C.M. Choi, G. Knight, F. Chirot, L. MacAleese, R. Antoine, and P. Dugourd. Conformational changes in amyloid-beta (12 - 28) alloforms studied using action-FRET, IMS and molecular dynamics simulations. *Chemical Science*, 7(2) :1609–1610, 2016.

- [240] L. Konermann and D.A. Simmons. Protein-folding kinetics and mechanisms studied by pulse-labeling and mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 22(1) :1–26, 2003.
- [241] E.G. Marklund, M.T. Degiacomi, C.V. Robinson, A.J. Baldwin, and J.L.P. Benesch. Collision cross sections for structural proteomics. *Structure*, 23(4) :791–799, 2015.
- [242] R.R. Hudgins, M.A. Ratner, and M.F. Jarrold. Design of helices that are stable in vacuo. *Journal of the American Chemical Society*, 120(49) :12974–12975, 1998.
- [243] F. Albrieux, H.B. Hamidane, F. Calvo, F. Chiro, Y.O. Tsybin, R. Antoine, J. Lemoine, and P. Dugourd. Structural preferences of gas-phase M2TMP monomers upon sequence variations. *Journal of Physical Chemistry A*, 115(18) :4711–4718, 2011.
- [244] K. Yoshioka and C.T. O’kanski. Electric properties of macromolecules. IX. Dipole moment, polarizability, and optical anisotropy factor of collagen in solution from electric birefringence. *Biopolymers*, 4(5) :499–507, 1966.
- [245] M.J. Frisch, G.H. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, O. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, and D.J. Fox. Gaussian 09, Revision A.02.
- [246] W.G.J. Hol, P.T. van Duijnen, and H.J.C. Berendsen. The alpha-helix dipole and the properties of proteins. *Nature*, 273 :443–446, 1978.
- [247] D. Sengupta, R.N. Behera, J.C. Smith, and G.M. Ullmann. The α helix dipole : Screened out? *Structure*, 13(6) :849–855, 2005.
- [248] T. Wyttenbach, N.A. Pierson, D.E. Clemmer, and M.T. Bowers. Ion Mobility Analysis of Molecular Dynamics. *Annual Review of Physical Chemistry*, 65(1) :175–196, 2014.
- [249] Y. Tian, L. Han, A.C. Buckner, and B.T. Ruotolo. Collision Induced Unfolding of Intact Antibodies : Rapid Characterization of Disulfide Bonding Patterns, Glycosylation, and Structures. *Analytical Chemistry*, 87(22) :11509–11515, 2015.
- [250] J. Bahrtdt, W. Frentrup, A. Gaupp, M. Scheer, W. Gudat, G. Ingold, and S. Sasaki. A quasi-periodic hybrid undulator at BESSY II. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 467-468 :130–133, 2001.

- [251] P. Baumgärtel and I. Packe. The U125-2 NIM beamline at BESSY II. *Journal of large-scale research facilities JLSRF*, 2(0) :53, 2016.
- [252] G. Reichardt, J. Bahrtdt, J. S. Schmidt, W. Gudat, A. Ehresmann, R. Müller-Albrecht, H. Molter, H. Schmoranzler, M. Martins, N. Schwentner, and S. Sasaki. A 10 m-normal incidence monochromator at the quasi-periodic undulator U125-2 at BESSY II. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 467-468 :462–465, 2001.
- [253] O. Plekan, V. Feyer, R. Richter, M. Coreno, M. De Simone, K. C. Prince, and V. Carra-vetta. Investigation of the amino acids glycine, proline, and methionine by photoemission spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry A*, 111(43) :10998–11005, 2007.
- [254] T. Kachel. The plane grating monochromator beamline U49-2 PGM-1 at BESSY II. *Journal of large-scale research facilities JLSRF*, 2 :A72, 2016.
- [255] K. J.S. Sawhney, F. Senf, and W. Gudat. PGM beamline with constant energy resolution mode for U49-2 undulator at BESSY-II. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 467-468 :466–469, 2001.
- [256] S. Bari. The influence of peptide structure on fragmentation pathways. 2010.
- [257] O. Gonzalez-Magaña. Ionization-induced fragmentation dynamics of isolated complex biomolecules. 2013.
- [258] L. Feketeová and R.A.J. O’Hair. Multiply protonated betaine clusters are stable in the gas phase. *Chemical communications (Cambridge, England)*, (40) :4942–4944, 2008.
- [259] R.N. Grewal, H. El Aribi, A.G. Harrison, K.W.M. Siu, and A.C. Hopkinson. Fragmentation of Protonated Tripeptides : The Proline Effect Revisited. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(15) :4899–4908, 2004.
- [260] C. Bleiholder, S. Suhai, A.G. Harrison, and B. Paizs. Towards understanding the tandem mass spectra of protonated oligopeptides. 2 : The proline effect in collision-induced dissociation of protonated Ala-Ala-Xxx-Pro-Ala (Xxx = Ala, Ser, Leu, Val, Phe, and Trp). *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 22(6) :1032–1039, 2011.
- [261] A.G. Unnithan, M.J. Myer, C.J. Veale, and A.S. Danell. MS/MS of Protonated Polyproline Peptides : The Influence of N-terminal Protonation on Dissociation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18(12) :2198–2203, 2007.
- [262] J. Berkowitz. The Quantum Yield Of Ionisation. *Physics Essays*, 13(2) :248–255, 2000.
- [263] Y. Hatano. Interaction of photons with molecules - cross-sections for photoabsorption, photoionization, and photodissociation. *Radiation and Environmental Biophysics*, 38(4) :239–247, 1999.
- [264] A.P.W. Arachchilage, F. Wang, V. Feyer, O. Plekan, and K.C. Prince. Correlation of electronic structures of three cyclic dipeptides with their photoemission spectra. *Journal of Chemical Physics*, 133(174319), 2010.

- [265] I.A. Topol, G.J. Tawa, R.A. Caldwell, M.A. Eissenstat, and S.K. Burt. Acidity of organic molecules in the gas phase and in aqueous solvent. *Journal of Physical Chemistry A*, 104(42) :9619–9624, 2000.
- [266] S.R. Carr and C.J. Cassady. Reactivity and gas-phase acidity determinations of small peptide ions consisting of 11 to 14 amino acid residues. *Journal of Mass Spectrometry*, 32(9) :959–967, 1997.
- [267] C.J. Cassady. Gas-phase reactivity and molecular modeling studies on triply protonated dodecapeptides that contain four basic residues. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 9(7) :716–723, 1998.
- [268] A. Giuliani, A.R. Milosavljevic, K. Hinsen, F. Canon, C. Nicolas, M. Réfrégiers, and L. Nahon. Structure and charge-state dependence of the gas-phase ionization energy of proteins. *Angewandte Chemie - International Edition*, 51(38) :9552–9556, 2012.
- [269] A.R. Milosavljevic, V. Z. Cerovski, F. Canon, L. Nahon, and A. Giuliani. Nanosolvation-induced stabilization of a protonated peptide dimer isolated in the Gas phase. *Angewandte Chemie - International Edition*, 52(28) :7286–7290, 2013.
- [270] C. Li, P. Salén, V. Yatsyna, L. Schio, R. Feifel, R. Squibb, M. Kamińska, M. Larsson, R. Richter, M. Alagia, S. Stranges, S. Monti, V. Carravetta, and V. Zhaunerchyk. Experimental and theoretical XPS and NEXAFS studies of N-methylacetamide and N-methyltrifluoroacetamide. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18(3) :2210–2218, 2016.
- [271] S. Zagorodskikh, V. Zhaunerchyk, M. Mucke, J. H D Eland, R. J. Squibb, L. Karlsson, P. Linusson, and R. Feifel. Single-photon double and triple ionization of acetaldehyde (ethanal) studied by multi-electron coincidence spectroscopy. *Chemical Physics*, 463 :159–168, 2015.
- [272] S. Maclot, R. Delaunay, D. Piekarski, A. Domaracka, B. Huber, L. Adoui, F. Martín, M. Alcamí, L. Avaldi, P. Bolognesi, S. Diaz-Tendero, and P. Rousseau. Determination of Energy-Transfer Distributions in Ionizing Ion-Molecule Collisions. 117(073201), 2016.
- [273] L. Schwob, M. Lalande, J. Rangama, D. Egorov, R. Hoekstra, R. Pandey, S. Eden, T. Schlathölter, V. Vizcaino, and J.C. Pouilly. Single-photon absorption of isolated collagen mimetic peptides and triple-helix models in the VUV-X energy range. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 19(28) :18321–18329, 2017.
- [274] F. Alvarado, S. Bari, R. Hoekstra, and T. Schlathölter. Quantification of ion-induced molecular fragmentation of isolated 2-deoxy-D-ribose molecules. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 8(16) :1922–1928, 2006.
- [275] R. Brédy, J. Bernard, L. Chen, B. Wei, A. Salmoun, T. Bouchama, M. C. Buchet-Poulizac, and S. Martin. Fragmentation of adenine induced by collision with slow F²⁺ ions. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B : Beam Interactions with Materials and Atoms*, 235(1-4) :392–396, 2005.

-
- [276] F. Alvarado, S. Bari, R. Hoekstra, and T. Schlathölter. Interactions of neutral and singly charged keV atomic particles with gas-phase adenine molecules. *Journal of Chemical Physics*, 127(3), 2007.
- [277] L. Schwob, M. Lalande, J.Y. Chesnel, A. Domaracka, B.A. Huber, S. Maclot, J.C. Pouilly, J. Rangama, P. Rousseau, V. Vizcaino, L. Adoui, and A. Méry. A tandem mass spectrometer for crossed-beam irradiation of mass-selected molecular systems by keV atomic ions. *Review of Scientific Instruments*, 89(4) :043104, 2018.
- [278] S. Pilling, D.P.P. Andrade, R.B. De Castilho, R.L. Cavasso-Filho, A.F. Lago, L.H. Coutinho, G. .B. De Souza, H.M. Boechat-Roberty, and A. N. De Brito. Survival of gas phase amino acids and nucleobases in space radiation conditions. *Proceedings of the International Astronomical Union*, 4(S251) :371–375, 2008.
- [279] O.H.W. Siegmund, M. Lampton, R. Raffanti, and W. Herrick. High resolution delay line readouts for microchannel plates. *Nuclear Inst. and Methods in Physics Research, A*, 310(1-2) :311–316, 1991.
- [280] L.M. Hirvonen, W. Becker, J. Milnes, T. Conneely, S. Smietana, A. Le Marois, O. Jagutzki, and K. Suhling. Picosecond wide-field time-correlated single photon counting fluorescence microscopy with a delay line anode detector. *Applied Physics Letters*, 109(7), 2016.
- [281] W. Becker, L.M. Hirvonen, J. Milnes, T. Conneely, O. Jagutzki, H. Netz, S. Smietana, and K. Suhling. A wide-field TCSPC FLIM system based on an MCP PMT with a delay-line anode. *Review of Scientific Instruments*, 87(9), 2016.
- [282] M. Lampton, O. Siegmund, and R. Raffanti. Delay line anodes for microchannel-plate spectrometers. *Review of Scientific Instruments*, 58(12) :2298–2305, 1987.
- [283] G.W. Fraser. The Ion Detection Efficiency Of Microchannel Plates. 215(October 2001) :13–30, 2009.
- [284] E. Liénard, M. Herbane, G. Ban, G. Darius, P. Delahaye, D. Durand, X. Fléchar, M. Labalme, F. Mauger, O. Naviliat-Cuncic, and D. Rodríguez. Performance of a micro-channel plates position sensitive detector. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section A : Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 551(2-3) :375–386, 2005.
- [285] T. Muro, T. Ohkochi, Y. Kato, Y. Izumi, S. Fukami, H. Fujiwara, and T. Matsushita. Wide-angle display-type retarding field analyzer with high energy and angular resolutions. *Review of Scientific Instruments*, 88(12), 2017.
- [286] I.S. Nedzelskiy, C. Silva, H. Figueiredo, H. Fernandes, and C.A.F. Varandas. Compact retarding field energy analyzer for the tokamak ISTTOK boundary plasma. *Review of Scientific Instruments*, 77(10) :1–5, 2006.
- [287] P. Jardin, C. Barué, C. Canet, M. Dupuis, J-L. Flambard, G. Gaubert, N. Lecesne, P. Lehérissier, F. Lemagnen, R. Leroy, J.-Y. Pacquet, F. Pellemoine-Landré, J-P. Rataud, M. G.

- Saint-Laurent, and A. C. C. Villari. Mono 1000 : A simple and efficient 2.45 GHz electron cyclotron resonance ion source using a new magnetic structure concept. *Review of Scientific Instruments*, 73(2 II) :789, 2002.
- [288] J. Bahng, M.C. Choi, M.S. Won, and B.S. Lee. Development of Wien filter for small ion gun of surface analysis. *Review of Scientific Instruments*, 87(2) :2–5, 2016.
- [289] J. Slim, R. Gebel, D. Heberling, F. Hinder, D. Holscher, A. Lehrach, B. Lorentz, S. Mey, A. Nass, F. Rathmann, L. Reifferscheidt, H. Soltner, H. Straatmann, F. Trinkel, and J. Wolters. Electromagnetic Simulation And Design of a Novel Waveguide RF Wien Filter for Electric Dipole Moment Measurements of Protons and Deuterons. *Nuclear Inst. and Methods in Physics Research, A*, 828 :116–124, 2016.
- [290] J.H Kim and Y.S. Kim. Ray-tracing Analysis of the Wien Velocity Filter for Protons Filter. *Journal of the Korean Physical Society*, 66(3) :389–393, 2015.
- [291] SIMION (TM) 8.0. Scientific Instrument Services, Inc. (SIS).
- [292] G. Reitsma, O. Gonzalez-Magaña, O. Versolato, M. Door, R. Hoekstra, E. Suraud, B. Fischer, N. Camus, M. Kremer, R. Moshhammer, and T. Schlathölter. Femtosecond laser induced ionization and dissociation of gas-phase protonated leucine enkephalin. *International Journal of Mass Spectrometry*, 365-366 :365–371, 2014.
- [293] O. González-Magaña, G. Reitsma, M. Tiemens, L. Boschman, R. Hoekstra, and T. Schlathölter. Near-edge X-ray absorption mass spectrometry of a gas-phase peptide. *Journal of Physical Chemistry A*, 116(44) :10745–10751, 2012.
- [294] K. Rinn, F. Melchert, and E. Salzborn. Measurements of charge transfer in H^+-He^+ collisions. 3783, 1985.
- [295] M.E. Rudd, T.V. Goffe, A. Itoh, and R.D. DuBois. Cross sections for ionization of gases by 10-2000 keV He^+ ions and for electron capture and loss by 5-350 keV He^+ ions. *Physical Review A*, 32(2) :829–835, 1985.

Annexes

Liste des fragments du peptide (PPG)₁₀

A

Les rapports masse sur charges pour des monomères, dimères, trimères et hexamères du peptide (PPG)₁₀ sont présentés sur les quatre tableaux ci-dessous. Les états de charges sélectionnés correspondent à ceux étudiés lors de ces travaux de thèse. La liste des fragments peptidiques est présentée page suivante.

Monomère	Masse/Charge	
	Mono	Moy
(PPG) ₁₀	2529.28	2530.87
[(PPG) ₁₀ +H] ⁺	2530.29	2531.88
[(PPG) ₁₀ +2H] ²⁺	1265.65	1266.44
[(PPG) ₁₀ +3H] ³⁺	844.10	844.63
[(PPG) ₁₀ +4H] ⁴⁺	633.33	633.73

Dimère	Masse/Charge	
	Mono	Moy
[((PPG) ₁₀) ₂ +2H] ²⁺	2530.28	2531.87
[((PPG) ₁₀) ₂ +3H] ³⁺	1687.19	1688.25
[((PPG) ₁₀) ₂ +4H] ⁴⁺	1265.64	1266.43
[((PPG) ₁₀) ₂ +5H] ⁵⁺	1012.71	1013.35
[((PPG) ₁₀) ₂ +6H] ⁶⁺	844.09	844.62

Trimère	Masse/Charge	
	Mono	Moy
[((PPG) ₁₀) ₃ +4H] ⁴⁺	1897.96	1899.15
[((PPG) ₁₀) ₃ +5H] ⁵⁺	1518.57	1519.52
[((PPG) ₁₀) ₃ +6H] ⁶⁺	1265.64	1266.43
[((PPG) ₁₀) ₃ +7H] ⁷⁺	1084.98	1085.66
[((PPG) ₁₀) ₃ +8H] ⁸⁺	949.48	950.08

Hexamère	Masse/Charge	
	Mono	Moy
[((PPG) ₁₀) ₆ +7H] ⁷⁺	2168.95	2170.32
[((PPG) ₁₀) ₆ +8H] ⁸⁺	1897.96	1899.25
[((PPG) ₁₀) ₆ +9H] ⁹⁺	1687.19	1688.25
[((PPG) ₁₀) ₆ +10H] ¹⁰⁺	1518.57	1519.52
[((PPG) ₁₀) ₆ +11H] ¹¹⁺	1380.61	1351.47

A Liste des fragments du peptide (PPG)₁₀

Seq	#	a	b	c	x	y	z	#
P	1	70.11457	98.12467	115.15523	-	2531.87607	2514.84551	30
P	2	167.23125	195.24134	212.27191	2460.75361	2434.75939	2417.72883	29
G	3	224.28316	252.29326	269.32383	2363.63693	2337.64271	2320.61215	28
P	4	321.39985	349.40995	366.44051	2306.58501	2280.59079	2263.56023	27
P	5	418.51653	446.52663	463.55719	2209.46833	2183.47411	2166.44355	26
G	6	475.56845	503.57855	520.60911	2112.35165	2086.35743	2069.32687	25
P	7	572.68513	600.69522	617.72579	2055.29973	2029.30551	2012.27495	24
P	8	669.8018	697.8119	714.84246	1958.18305	1932.18883	1915.15827	23
G	9	726.85372	754.86382	771.89438	1861.06637	1835.07215	1818.04159	22
P	10	823.9704	851.9805	869.01106	1804.01445	1778.02023	1760.98967	21
P	11	921.08708	949.09718	966.12774	1706.89777	1680.90355	1663.87299	20
G	12	978.139	1006.1491	1023.17966	1609.78109	1583.78687	1566.75631	19
P	13	1075.25569	1103.26579	1120.29635	1552.72917	1526.73495	1509.70439	18
P	14	1172.37237	1200.38247	1217.41303	1455.61249	1429.61827	1412.58771	17
G	15	1229.42429	1257.43439	1274.46495	1358.49581	1332.50159	1315.47103	16
P	16	1326.54097	1354.55107	1371.58163	1301.44389	1275.44967	1258.41911	15
P	17	1423.65765	1451.66775	1468.69831	1204.32721	1178.33299	1161.30243	14
G	18	1480.70957	1508.71967	1525.75023	1107.21053	1081.21631	1064.18574	13
P	19	1577.82625	1605.83635	1622.86691	1050.15861	1024.16439	1007.13382	12
P	20	1674.94293	1702.95303	1719.98359	953.04192	927.0477	910.01714	11
G	21	1731.99485	1760.00495	1777.03551	855.92524	829.93103	812.90046	10
P	22	1829.11153	1857.12163	1874.15219	798.87332	772.87911	755.84854	9
P	23	1926.22821	1954.23831	1971.26887	701.75664	675.76243	658.73187	8
G	24	1983.28013	2011.29023	2028.32079	604.63997	578.64575	561.61519	7
P	25	2080.39681	2108.40691	2125.43747	547.58805	521.59383	504.56327	6
P	26	2177.51349	2205.52359	2222.55415	450.47137	424.47715	407.44659	5
G	27	2234.56541	2262.57551	2279.60607	353.35469	327.36046	310.32991	4
P	28	2331.68209	2359.69219	2376.72275	296.30277	270.30854	253.27799	3
P	29	2428.79877	2456.80887	2473.83943	199.18608	173.19187	156.16131	2
G	30	2485.85069	2513.86079	-	102.06941	76.07519	59.04463	1

Liste des fragments du peptide (PHypG)₁₀

B

Les tableaux ci-dessous présentent les rapports masse sur charges pour les monomères, dimères, trimères et hexamères du peptide (PHypG)₁₀. Les états de charges sélectionnés correspondent à ceux étudiés lors de ces travaux de thèse. Le tableau de la page suivante présente quant à lui la liste des fragments peptidiques.

Monomère	Masse/Charge	
	Mono	Moy
(PHypG) ₁₀	2689.28	2690.87
[(PHypG) ₁₀ +H] ⁺	2690.29	2691.88
[(PHypG) ₁₀ +2H] ²⁺	1345.65	1346.44
[(PHypG) ₁₀ +3H] ³⁺	897.43	897.96
[(PHypG) ₁₀ +4H] ⁴⁺	673.33	373.73

Dimère	Masse/Charge	
	Mono	Moy
[((PHypG) ₁₀) ₂ +2H] ²⁺	2690.28	2691.87
[((PHypG) ₁₀) ₂ +3H] ³⁺	1793.85	1794.81
[((PHypG) ₁₀) ₂ +4H] ⁴⁺	1345.64	1346.43
[((PHypG) ₁₀) ₂ +5H] ⁵⁺	1076.71	1077.35
[((PHypG) ₁₀) ₂ +6H] ⁶⁺	897.43	897.96

Trimère	Masse/Charge	
	Mono	Moy
[((PHypG) ₁₀) ₃ +4H] ⁴⁺	2017.96	2019.15
[((PHypG) ₁₀) ₃ +5H] ⁵⁺	1614.57	1615.52
[((PHypG) ₁₀) ₃ +6H] ⁶⁺	1345.64	1346.43
[((PHypG) ₁₀) ₃ +7H] ⁷⁺	1153.55	1154.23
[((PHypG) ₁₀) ₃ +8H] ⁸⁺	1009.48	1010.08

Hexamère	Masse/Charge	
	Mono	Moy
[((PHypG) ₁₀) ₆ +7H] ⁷⁺	2306.10	2307.46
[((PHypG) ₁₀) ₆ +8H] ⁸⁺	2017.96	2019.15
[((PHypG) ₁₀) ₆ +9H] ⁹⁺	1793.85	1794.91
[((PHypG) ₁₀) ₆ +10H] ¹⁰⁺	1614.57	1615.52
[((PHypG) ₁₀) ₆ +11H] ¹¹⁺	1467.88	1468.75

B Liste des fragments du peptide (PHypG)₁₀

Seq	#	a	b	c	x	y	z	#
P	1	70.11457	98.12467	115.15523	-	2691.87607	2674.84551	30
P	2	183.23125	211.24134	228.27191	2620.75361	2594.75939	2577.72883	29
G	3	240.28316	268.29327	285.32383	2507.63693	2481.64271	2464.61215	28
P	4	337.39985	365.40995	382.44051	2450.58501	2424.59079	2407.56023	27
P	5	450.51653	478.52663	495.55719	2353.46833	2327.47411	2310.44355	26
G	6	507.56845	535.57855	552.60911	2240.35165	2214.35743	2197.32687	25
P	7	604.68513	632.69522	649.72579	2183.29973	2157.30551	2140.27495	24
P	8	717.8018	745.8119	762.84246	2086.18305	2060.18883	2043.15827	23
G	9	774.85372	802.86382	819.89438	1973.06637	1947.07215	1930.04159	22
P	10	871.9704	899.9805	917.01106	1916.01445	1890.02023	1872.98967	21
P	11	985.08708	1013.09718	1030.12775	1818.89777	1792.90355	1775.87299	20
G	12	1042.139	1070.1491	1087.17967	1705.78109	1679.78687	1662.75631	19
P	13	1139.25569	1167.26579	1184.29635	1648.72917	1622.73495	1605.70439	18
P	14	1252.37237	1280.38247	1297.41303	1551.61249	1525.61827	1508.58771	17
G	15	1309.42429	1337.43439	1354.46495	1438.49581	1412.50159	1395.47103	16
P	16	1406.54097	1434.55107	1451.58163	1381.44389	1355.44967	1338.41911	15
P	17	1519.65765	1547.66775	1564.69831	1284.32721	1258.33299	1241.30243	14
G	18	1576.70957	1604.71967	1621.75023	1171.21053	1145.21631	1128.18574	13
P	19	1673.82625	1701.83635	1718.86691	1114.15861	1088.16439	1071.13383	12
P	20	1786.94293	1814.95303	1831.98359	1017.04192	991.0477	974.01714	11
G	21	1843.99485	1872.00495	1889.03551	903.92524	877.93103	860.90046	10
P	22	1941.11153	1969.12163	1986.15219	846.87332	820.87911	803.84854	9
P	23	2054.22821	2082.23831	2099.26887	749.75664	723.76243	706.73187	8
G	24	2111.28013	2139.29023	2156.32079	636.63997	610.64575	593.61519	7
P	25	2208.39681	2236.40691	2253.43747	579.58805	553.59383	536.56327	6
P	26	2321.51349	2349.52359	2366.55415	482.47137	456.47715	439.44659	5
G	27	2378.56541	2406.57551	2423.60607	369.35469	343.36046	326.32991	4
P	28	2475.68209	2503.69219	2520.72275	312.30277	286.30854	269.27799	3
P	29	2588.79877	2616.80887	2633.83943	215.18608	189.19187	172.16131	2
G	30	2645.85069	2673.86079	-	102.06941	76.07519	59.04463	1

Distributions des temps d'arrivée des oligomères des peptides $(PPG)_{10}$ et $(PHypG)_{10}$

C

La figure C.1 présente les distributions de temps d'arrivée (DTA) des peptides $(PPG)_{10}$ et $(PHypG)_{10}$ pour différents états de charges de leurs trimères. La figure C.2 présente quand à elle ceux de l'hexamère du $(PPG)_{10}$.

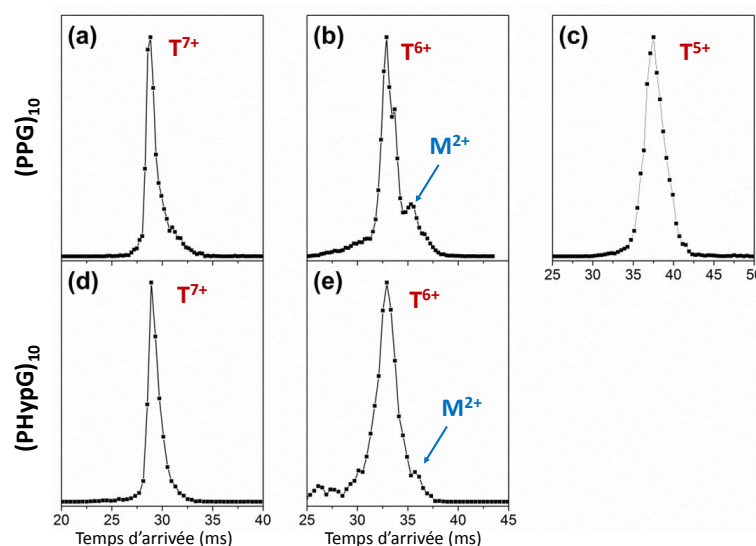


Figure C.1 : DTA des trimères des peptides $(PPG)_{10}$ et $(PHypG)_{10}$. Les contributions des monomères doublement protonés sont indiquées.

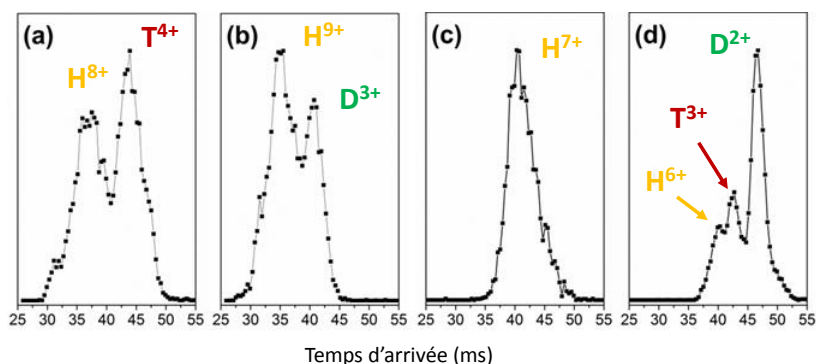


Figure C.2 : DTA des états de charges 6 à 9+ de l'hexamère du peptide $(PPG)_{10}$. Les contributions des dimères et trimères sont également indiquées.

Spectres de masse des peptides (PPG)₁₀ et (PHypG)₁₀ après irradiation par photons VUV et X et par ions C⁴⁺

D

La figure D.1 présente les spectres de masse du peptide [(PHypG)₁₀ + 2H]²⁺ après irradiation par des photons de 14, 22, 32 et 288 eV.

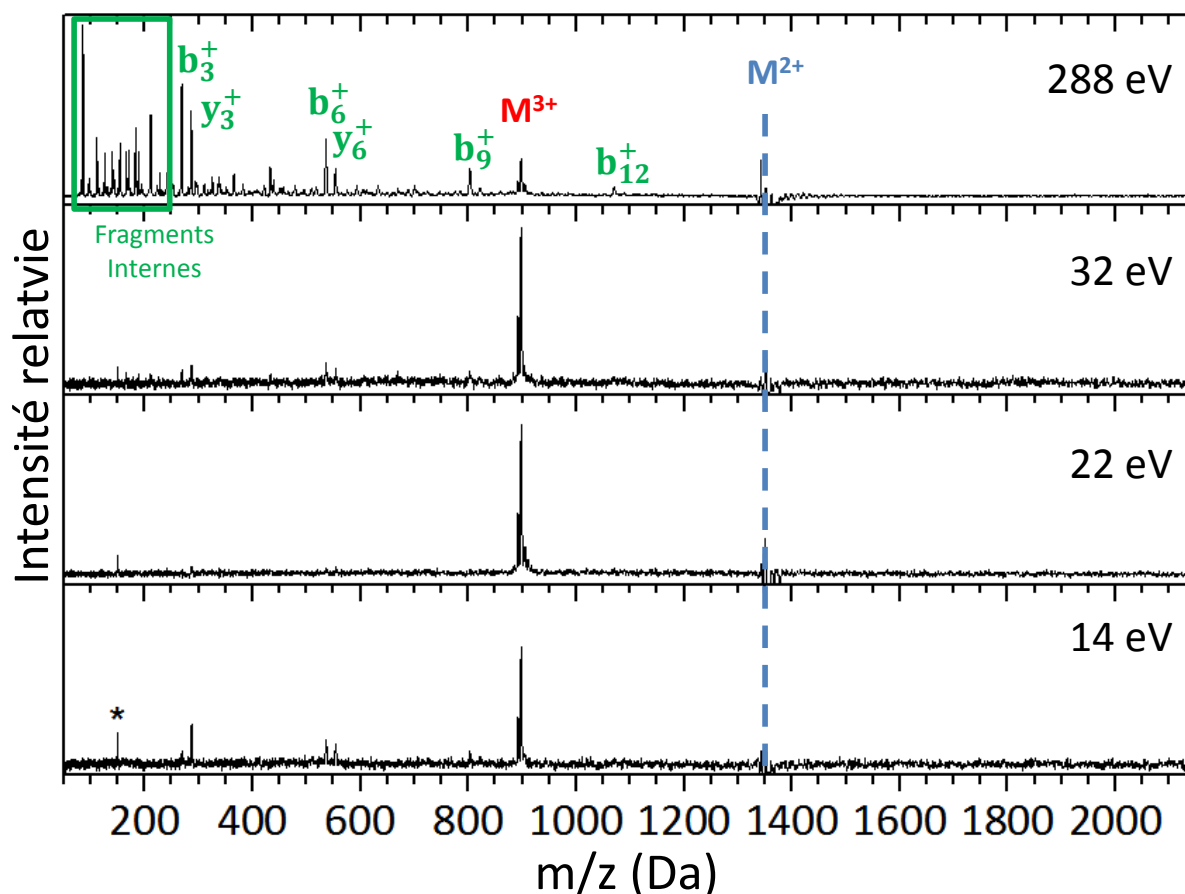


Figure D.1 : Spectres de masse du peptide [(PHypG)₁₀ + 2H]²⁺. La position du pic parent est représentée par la ligne pointillée bleu. Le peptide ionisé intact est indiqué en rouge, les fragments peptidiques sont présentés en vert.

Le spectre de la figure D.2 présente quant à lui le résultat de l'irradiation du peptide $[(PPG)_{10} + 2H]^{2+}$ par des ions C^{4+} . Comme précisé dans le chapitre 2, le détachement de proton ($m/z = 2531.88$) n'est pas visible pour cet état de charge du peptide parent.

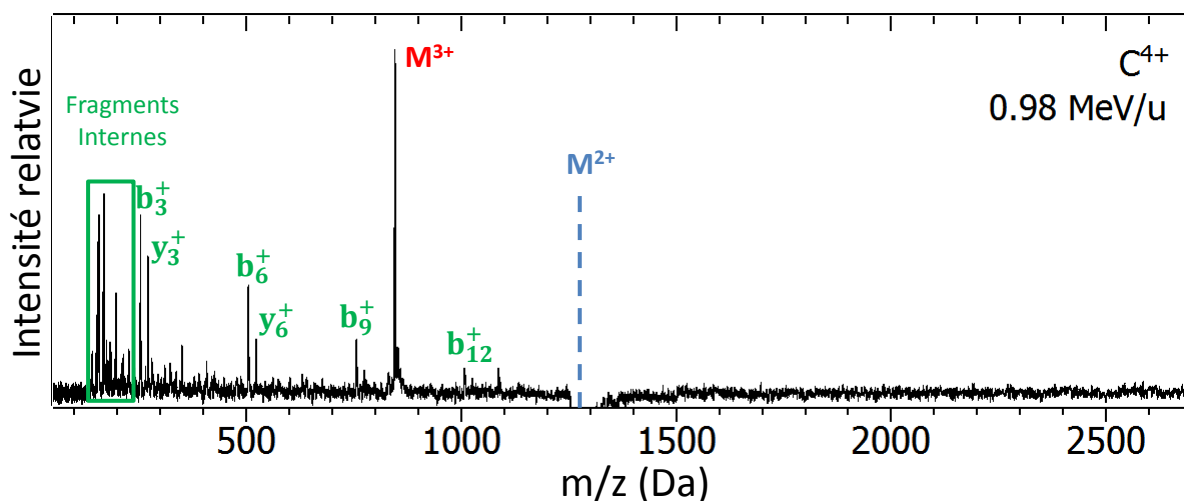


Figure D.2 : Spectre de masse du peptide $[(PPG)_{10} + 2H]^{2+}$ après irradiation par des ions C^{4+} . La position du pic parent est représentée par la ligne pointillée bleue. Le peptide ionisé intact est indiqué en rouge, les fragments peptidiques sont présentés en vert.

La figure D.3 présente les spectres de masse des trimères du peptide $(PPG)_{10}$ 5 et 6 fois protoné après irradiation par un faisceau d'ions C^{4+} à 0.98 MeV/u. D'après nos mesures par mobilité ionique, ces trimères ne sont pas dans des conformations de triple hélice, mais ces spectres nous permettent tout de même d'étudier l'évolution du détachement de proton en fonction de l'état de charge du système. En effet, nous avons vu que pour le trimère $7+$, ce détachement de proton ne pouvait être détecté de manière non-ambigüe. Cependant, pour les états de charges de 5 et $6+$, les pics de T^{4+} et T^{5+} , respectivement induits par le détachement de proton, possèdent des rapports masse sur charge non-ambigüe, et des abondances faibles et difficilement discernables de la ligne de base du spectre de masse. Nous pouvons également mentionner que pour les deux états de charges du peptide parent, le monomère doublement protoné produit par la dissociation du système est confondu avec le trimère $6+$. Par ailleurs, le fait d'observer le monomère $3+$ après irradiation du T^{6+} confirme que celui-ci dissocie après ionisation, si les charges sont uniformément réparties.

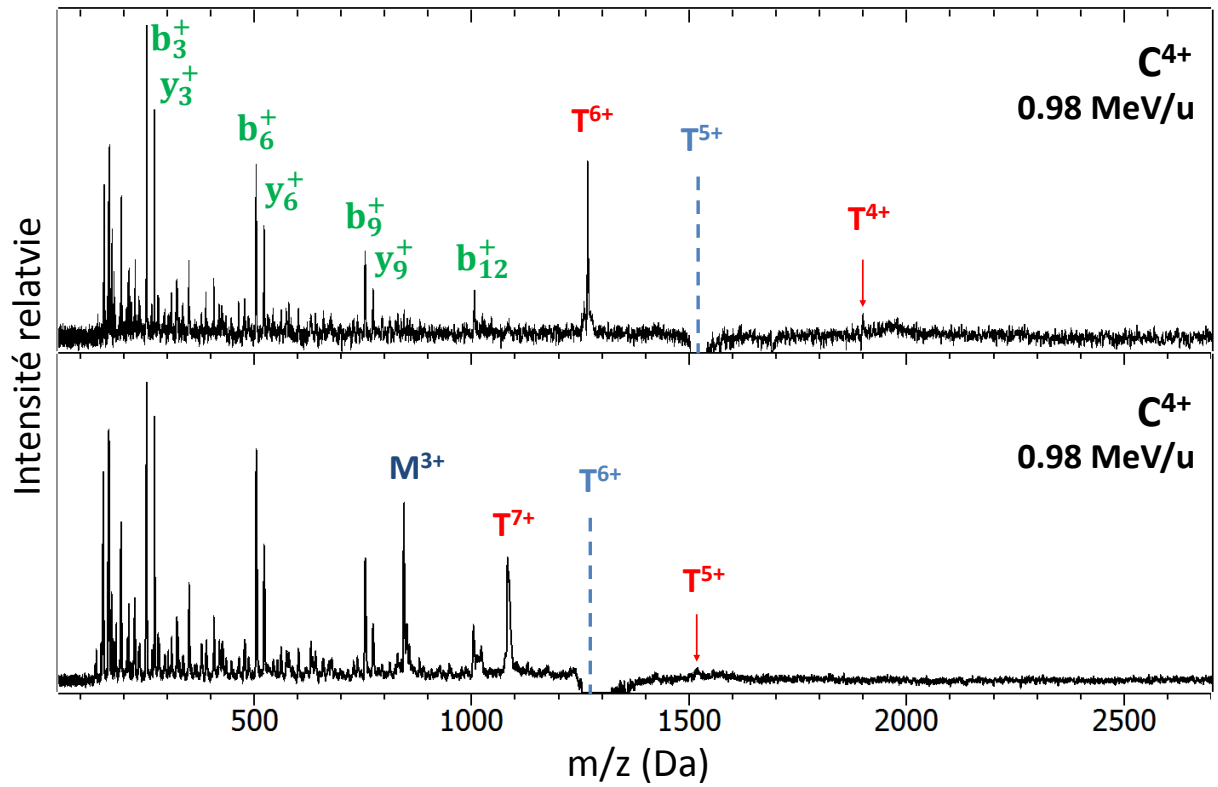


Figure D.3 : Spectres de masse des trimères du peptide $(PPG)_{10}$ pour les états de charges 5+ (en haut) et 6+ (en bas) après irradiation par des ions C^{4+} . La position du pic parent est représentée par la ligne pointillée bleue. Le peptide ionisé intact et celui ayant subi un détachement de proton non dissociatif sont noté en rouge, les fragments peptidiques en vert et les monomères en bleu.

Processus induits par l'irradiation de modèles peptidiques de la triple hélice du collagène en phase gazeuse

Le collagène est la protéine la plus abondante dans les mammifères, et le constituant principal de la matrice extracellulaire du cartilage. Les propriétés mécaniques de ce tissu sont dues à la structure particulière du collagène : la triple hélice. Lors de cette thèse, nous nous sommes intéressés à des peptides modèles de la triple hélice du collagène en phase gazeuse, ce qui permet l'étude de leurs propriétés intrinsèques, dont les processus fondamentaux induits par des rayonnements ionisants. Une étude structurale de ces systèmes par spectrométrie de mobilité ionique a permis de s'assurer qu'ils conservent bien leurs propriétés structurales et de stabilité en l'absence de solvant. De plus, cette stabilité se manifeste aussi lors de l'irradiation par photons ionisants dans un piège à ions. Par ailleurs, nous avons observé, grâce à la spectrométrie de masse, une transition entre photo-excitation et photo-ionisation lorsque l'énergie du photon absorbé augmente dans la gamme VUV-X. Une partie de cette énergie est également redistribuée dans les modes de vibration du système, croît avec l'énergie du photon, et induit la fragmentation inter-puis intramoléculaire de la triple hélice. Nous avons également irradié pour la première fois des peptides en phase gazeuse par un faisceau d'ions carbonés à l'énergie cinétique pertinente dans le contexte de l'hadronthérapie. Un processus non-observé avec les photons a été mis en évidence : le détachement de proton. Enfin, la validation d'un nouveau dispositif expérimental dédié à l'irradiation de protéines et brins d'ADN par des ions en faisceaux croisés, ainsi que les premiers résultats obtenus, seront abordés.

Mots Clefs : Collagène, Triple hélice, Rayonnements ionisants, Phase gazeuse, Photons VUV et X, Ions carbonés, Peptides, Spectrométrie de mobilité ionique, Spectrométrie de masse

Radio-induced processes within peptidic models of the collagen triple helix in the gas phase

Collagen is the most abundant protein in mammals, and the main constituent of the extracellular matrix of cartilage. The mechanical properties of this tissue are due to the particular triple helical structure of collagen. In this thesis, we focused on peptidic models of the collagen triple helix in the gas phase, which allows reaching their intrinsic properties, including fundamental processes induced by ionizing radiations. An ion mobility spectrometry study of these systems proved that they retain their structural and stability properties in the absence of solvent. In addition, these stability properties also play a role after irradiation with ionizing photons in an ion trap. Furthermore, we have observed, thanks to mass spectrometry, a transition between photo-excitation and photoionization as the energy of the absorbed photon increases in the VUV-X range. Part of this energy is also redistributed in the vibration modes of the system, increases with photon energy, and induces intramolecular as well as intramolecular fragmentation of the triple helix. For the first time, we irradiated peptides in the gas phase by a carbon ion beam having a kinetic energy relevant in the context of hadrontherapy. A process that was absent from studies with photons has been observed : proton detachment. In the last chapter, the validation of a new experimental device dedicated to the irradiation of proteins and DNA strands in a cross-beam configuration, as well as the first results obtained, will be reported.

Key Words : Collagen, Triple helix, Ionizing radiations, gas phase, VUV and X-Rays photons, Carbon ions, Peptides, Ion mobility spectrometry, Mass spectrometry

Laboratoire

Centre de recherche sur les Ions, les MATériaux et la Photonique
CIMAP - GANIL
CEA/CNRS/ENSICAEN/Université de Caen Normandie
Boulevard Henri Becquerel, BP5133, 14070 CAEN cedex 5, France