

UNIVERSITÉ PARIS XIII - INSTITUT GALILÉE

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XIII

Discipline : Physique

présentée et soutenue publiquement

par

LÊ THI NGÀ

Soutenue le 11 avril 2014

**Étude structurale de biomolécules de grandes tailles,
en phase gazeuse, par spectroscopie infrarouge,
spectrométrie de mobilité ionique et dissociation
induite par attachement d'électron**

Directeur de thèse : Gilles Grégoire

JURY

Mme. Anne AMY-KLEIN

M. Philippe MAITRE

M. Patrick ROUSSEAU

M. Gilles FRISON

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

M. Gilles GRÉGOIRE

Directeur de thèse

UNIVERSITÉ PARIS XIII - INSTITUT GALILÉE

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XIII

Discipline : Physique

présentée et soutenue publiquement

par

LÊ THI NGÀ

Soutenue le 11 avril 2014

**Étude structurale de biomolécules de grandes tailles,
en phase gazeuse, par spectroscopie infrarouge,
spectrométrie de mobilité ionique et dissociation
induite par attachement d'électron**

Directeur de thèse : Gilles Grégoire

JURY

Mme. Anne AMY-KLEIN

M. Philippe MAITRE

M. Patrick ROUSSEAU

M. Gilles FRISON

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

M. Gilles GRÉGOIRE

Directeur de thèse

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au Laboratoire de Physique des Lasers de l'Université Paris 13. Je remercie les directeurs successifs, Charles Desfrancois et Oliver Gorceix, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je présente mes remerciements à Messieurs Philippe MAITRE et Patrick ROUSSEAU d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, à Madame Anne AMY-KLEIN et M. Gilles FRISON qui ont eu l'amabilité de juger cette thèse et de participer au jury.

Je tiens à remercier chaleureusement Gilles Grégoire d'avoir dirigé mes travaux durant les trois ans de thèse. Son expérience, ses compétences m'ont permis d'avancer dans mon projet.

Je remercie sincèrement mes collègues de l'équipe Biomolécules et Spectroscopie de m'avoir aidée sur l'expérience « gouttelette » : Bruno Manil, Frédéric Lecomte, Daniel Seige Leite, Jean-Pierre Schermann†, Nicolas Nieuwjear. Je remercie sincèrement Charles Desfrancois qui a lu et corrigé mon manuscrit.

Mon travail de thèse est le fruit de plusieurs collaborations avec des collègues que je souhaite sincèrement et chaleureusement remercier : Messieurs Philippe Dugourd et Fabien Chirot (ILM et ISA, Université Lyon 1) pour m'avoir permis de réaliser les expériences de mobilité ionique, M. Guillaume Van der Rest et Mme. Edith Nicol (DCMR, Ecole Polytechnique) pour les expériences ECD et Messieurs Vincent Steinmetz, Philippe Maitre et les opérateurs de CLIO pour leur aide pendant les expériences IRMPD. Je suis reconnaissante à Florent Calvo de nous avoir fourni le programme de simulation REMD.

Je voudrais aussi remercier tous les membres du Laboratoire LPL et plus particulièrement les secrétaires, les mécaniciens, les informaticiens et les thésards pour leur disponibilité.

Enfin, je remercie mes amis et surtout ma famille de leur soutien et de leurs encouragements.

Table de matière

INTRODUCTION.....	5
CHAPITRE I : Méthodologie expérimentale pour l'étude structurale de molécules en phase gazeuse	19
1. Introduction	21
2. Source électrospray	21
3. Spectroscopie infrarouge IRMPD	24
3.1 Introduction	24
3.2 Principe	25
3.3 Dispositif expérimental.....	28
3.3.1 Laser à électrons libres	28
3.3.2 Piège à ions.....	30
4. Spectrométrie de mobilité ionique	31
4.1 Introduction	31
4.2 Principe.....	31
4.3 Théorie.....	32
4.4 Dispositif expérimental.....	34
5. Dissociation induite par capture électronique (ECD)	37
5.1 Introduction	37
5.2 Principe.....	38
5.2.1 Section efficace de capture électronique.....	38
5.2.2 Energétique associée à la capture électronique	39
5.3 Nomenclature des fragments	40
5.4 Mécanismes de fragmentation	41
5.4.1 Le mécanisme de Cornell :	41
5.4.2 Le mécanisme Utah-Washington:	43
5.5 Corrélation entre structures des peptides et distributions d'intensité des fragments c/z	44
5.6 Montage expérimental	44
5.6.1 FT-ICR	45
5.7 Post-excitation par chauffage laser CO ₂ et technique SORI-CID	48
Références	50
CHAPITRE II : Méthodes théoriques	55
1. Méthodologie générale.....	57
2. Exploration de la surface d'énergie potentiel (PES)	59
3. Dynamique moléculaire par échange de répliques (REMD)	60
4. Méthodes théoriques d'optimisation de structures.....	62
4.1 Les champs de forces.....	62
4.2 La méthode AM1	63
4.3 La méthode DFT.....	63
4.4 La méthode hybride ONIOM DFT/AM1	64
5. Calcul de sections efficaces de collision	66
Références	69

CHAPITRE III: Étude structurale de l'Amyloïde β 12-28 en phase gazeuse.....	73
1. Introduction	75
2. Résultats Expérimentaux.....	79
2.1 Mobilité ionique	79
2.2 Spectroscopie IRMPD	82
2.3 Spectres de fragmentation par ECD	84
3. Interprétation des résultats expérimentaux.....	87
3.1 Recherche conformationnelle	87
3.2 Interprétation des sections efficaces de diffusion calculées	91
3.3 Simulations des spectres IRMPD par la méthode ONIOM.....	93
3.4 Interprétation des spectres ECD	98
4. Conclusion.....	105
Références	110
CHAPITRE IV : Etudes structurales des tryptophanes zipper en phase gazeuse TZ1 et TZ4	113
I. Introduction.....	115
II. Etude structurale du tryptophane zipper 1 en phase gazeuse	120
1. Résultats expérimentaux	120
1.1 Expérience de mobilité ionique.....	120
1.2 Expérience ECD.....	121
1.3 Spectre IRMPD	124
2. Interprétation des résultats	125
2.1 Dynamique moléculaire REMD	126
2.2 Analyse des sections efficaces de diffusion calculées	126
2.3 Interprétation du spectre ECD.....	135
2.4 Interprétation du spectre IRMPD	144
3. Conclusion.....	146
III. Etude structurale de $TZ4^{2+}$ et $[TZ4mod]^{2+}$ en phase gazeuse	149
4. Résultats expérimentaux	149
4.1 Expérience de mobilité ionique.....	149
4.2 Expérience ECD.....	151
4.3 Spectres post-ECD	153
4.4 Spectres IRMPD	154
5. Interprétation des résultats	156
5.1 Simulation de REMD.....	156
5.2 Interprétation du spectre ECD.....	162
5.3 Interprétation du spectre IRMPD.....	170
6. Conclusion.....	174
Références	178
CHAPITRE V : Désorption laser sur micro-gouttelettes sous vide	181
1. Principe général de l'expérience	183
1.1 MALDI	184
1.2 Désorption laser sur jet liquide	185
2. Génération de micro-gouttelettes liquides sous vide.....	188
2.1 Générateur de gouttelettes	189
2.2 Laser OPO IR large bande de désorption	191
3. Spectromètre de masse à temps de vol et détection des ions	195
4. Simulations SIMION.....	197

5. Résultats	199
6. Développements expérimentaux en cours.....	202
6.1 Couplage de la désorption laser avec une détente supersonique	202
6.1.1 Le jet supersonique.....	203
6.1.2 Refroidissement rovibrationnel	205
6.2 Trappe à ions quadripolaire (Trappe de Paul)	207
7. Conclusion.....	208
Références	209
 CONCLUSION GENERALE	 213
 Annexe : Dimère TZ4	 221
1. Résultats de l'expérience de mobilité ionique.....	223
2. Calculs des sections efficaces de diffusion	224
3. Conclusion.....	230

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La connaissance de la structure tridimensionnelle de macromolécules biologiques est une donnée essentielle pour établir le lien entre structure et activité biologique. Une protéine bio-active se trouve généralement dans une structure tertiaire ou quaternaire bien spécifique, et son mauvais repliement peut être la cause de dysfonctionnements graves, comme dans le cas des maladies à prion ou d'Alzheimer. De plus, les molécules exercent leurs effets biologiques en se liant à leurs récepteurs spécifiques, interaction qui est gouvernée en partie par leurs structures moléculaires. La grande diversité des biomolécules, leur grande taille et la complexité du milieu cellulaire extrêmement dense sont autant de caractéristiques qui compliquent énormément la compréhension des mécanismes fondamentaux qui peuvent expliquer leur fonction biologique. Le développement de la biologie moléculaire a pour but d'expliquer et de caractériser la fonction des divers composants cellulaires en termes de propriétés intrinsèques et d'interactions entre les sous-unités moléculaires qui composent la cellule. La formation des structures tridimensionnelles ainsi que l'établissement de liaisons non covalentes réversibles impliquées dans la reconnaissance moléculaire d'une molécule bio-active sur son récepteur sont notamment déterminés par les interactions hydrophile, hydrophobe, de liaison hydrogène et de van der Waals. Si une approche « top-down » de l'étude de macromolécules est hors de portée de la physique moléculaire, une approche de type « bottom-up » peut permettre de caractériser, au niveau atomique, les constituants élémentaires des biomolécules en utilisant les techniques expérimentales et théoriques issues de la Physico-Chimie.

La structure des biomolécules et de leurs complexes est le plus souvent obtenue en phase condensée par cristallographie X ou par résonance magnétique nucléaire (RMN). Le portail internet de la Protein Data Bank (PDB) recense début 2014 plus de 97000 structures de biomolécules, dont plus de 90% de protéines. La cristallographie X représente à elle seule plus de 90 % des travaux et permet de révéler la structure de protéines contenant plusieurs milliers d'acides aminés avec une résolution de l'ordre de 2 Å, mais qui est insuffisante pour résoudre la position des atomes d'hydrogène. L'inconvénient principal de cette technique réside dans la difficulté de produire des cristaux de tailles et de qualités suffisantes. Ceci est particulièrement critique pour les protéines hydrophobes membranaires. La RMN est l'autre méthode de choix pour déterminer la structure de biomolécules et elle présente l'avantage de

pouvoir étudier les systèmes en solution native. Pratiquement, la RMN est employée sur des systèmes moléculaires plus petits à cause de l'extrême complexité du traitement des spectres. De plus, cette technique nécessite des solutions concentrées (mM) et donc une quantité de produit importante.

Les techniques spectroscopiques telles que la spectroscopie FT-IR, Raman et le dichroïsme circulaire (CD) peuvent aussi apporter des informations structurales car certaines structures secondaires ont des signatures spectroscopiques spécifiques (Figure 1). Ces techniques ont néanmoins un pouvoir résolutif bien moindre que la cristallographie X ou la RMN. L'analyse repose sur une déconvolution du spectre en sous-bandes attribuables à des structures secondaires bien définies et permettent d'estimer la proportion de chaque motif dans la structure de la protéine, comme illustré sur la Figure 2 pour le lysozyme (129 acides aminés, entrée PDB 4IAS). Ces techniques sont souvent employées pour étudier les changements de conformations des protéines en fonction de la concentration, de la température, de la nature du solvant ou de son pH.

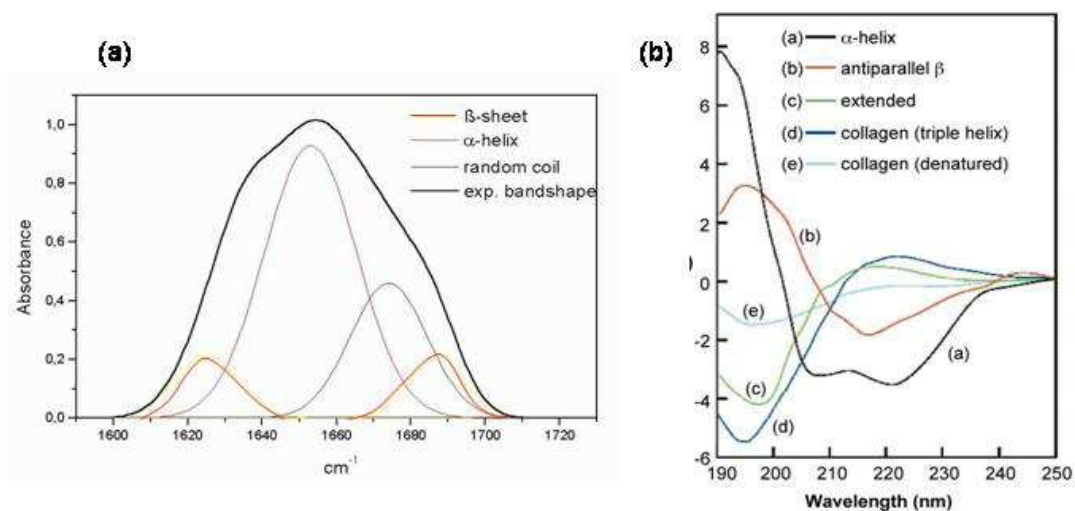


Figure 1 : Signatures spectrales caractéristiques de structures secondaires en hélice α , feuillet β , et globulaire (non structuré) obtenues par (a) spectroscopie FT-IR¹ et (b) dichroïsme circulaire.²

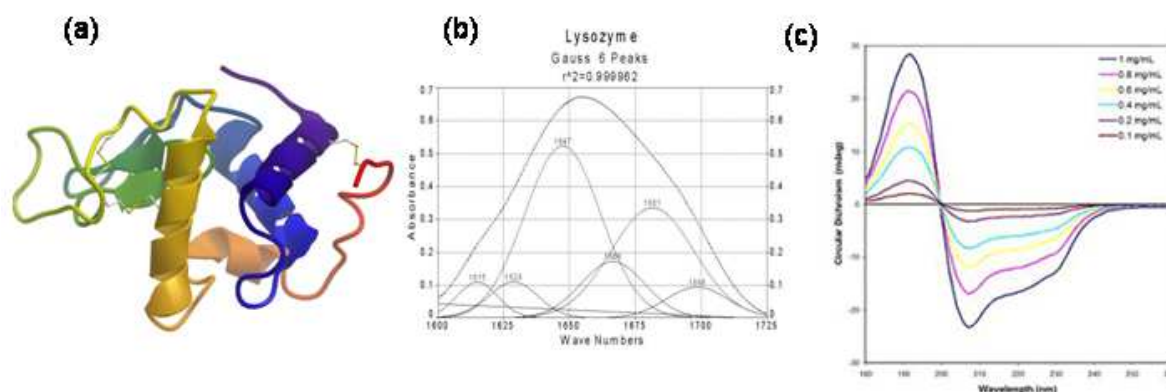


Figure 2 : Spectres expérimentaux (b) FT-IR et (c) CD de la protéine lysozyme (a) qui présente plusieurs motifs bien définis (structure tirée de la PDB entrée 4IAS).

Les spectroscopies optiques en phase condensée sont basées sur l'absorption linéaire du rayonnement incident par la molécule dans l'échantillon. Lorsque la longueur d'onde excitatrice est en résonance avec une transition de la molécule, on enregistre une diminution de l'intensité lumineuse réfléchie ou transmise. En phase gazeuse, la densité des molécules est bien trop faible pour pouvoir détecter des variations d'intensité lumineuse. La spectroscopie en phase gazeuse repose alors le plus souvent sur une spectroscopie d'action, soit d'ionisation (UV ou double résonance IR-UV) pour les molécules neutres, soit par photodissociation (IR/UV) pour les molécules ioniques. Ces études permettent de sonder les propriétés intrinsèques des molécules en l'absence des effets de l'environnement et se comparent donc directement aux calculs.

La spectroscopie laser est la méthode de choix pour sonder les propriétés intrinsèques des molécules isolées en phase gazeuse. L'équipe de D. Levy a pour la première fois en 1986 enregistré la spectroscopie électronique du tryptophane neutre³ avec une précision de l'ordre du cm^{-1} . La combinaison d'un refroidissement efficace des molécules dans une détente adiabatique produite par un jet supersonique avec l'utilisation de lasers affinés et accordables a ouvert de nouvelles perspectives en fournissant des données expérimentales de grandes précisions servant de base pour évaluer les méthodes de chimie quantique utilisées pour interpréter les données expérimentales.⁴ Le développement des études spectroscopiques s'est fait au fil des avancées technologiques portant sur les sources laser accordables de l'IR jusqu'au VUV et sur les sources de production de molécules d'intérêt biologique en phase gazeuse. Par exemple, la spectroscopie de double résonance IR/UV a permis d'étudier les

interactions intra-atomiques qui déterminent l'émergence de structures secondaires en partant d'acides aminés et des peptides simples ou protégés⁵⁻⁸ pour aller vers des modèles de feuillets β ,^{9,10} de coudes β , γ ,^{11,12} et des hélices α .^{13,14} La formation de ces différents motifs se caractérise par l'établissement de liaisons hydrogène entre les carbonyles CO et les amides NH de la liaison peptidique. L'équipe de M. Mons (CEA Saclay) a montré que, par spectroscopie laser IR, il était possible de corréler les déplacements spectraux de la bande amide A (vibration NH) avec le type de la liaison hydrogène C_n (on note C_n une liaison hydrogène formant un cycle à n atomes). Les différentes liaisons C_n ainsi que le décalages spectraux associés sont reportés sur la figure 3.¹⁵

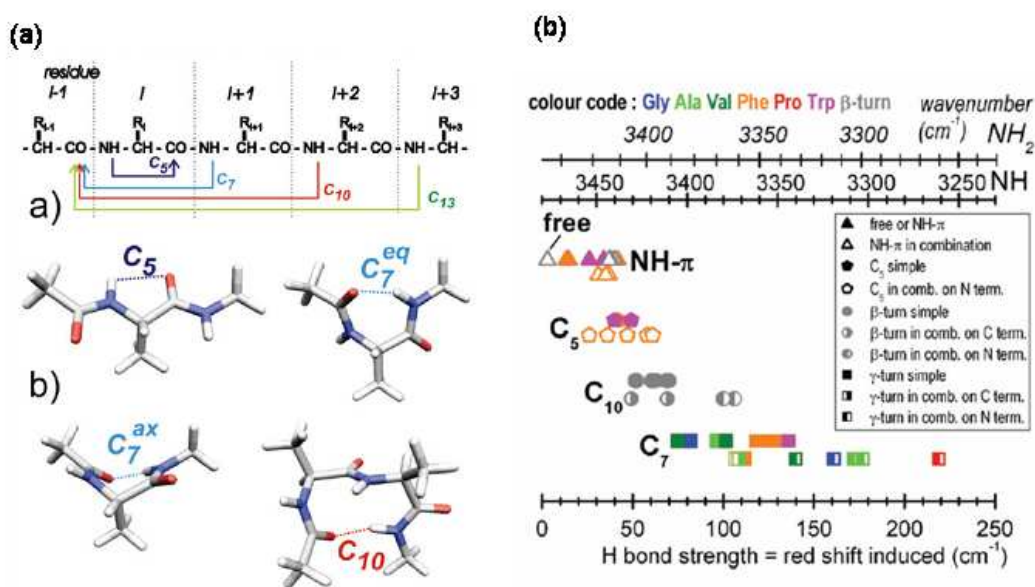


Figure 3 : (a) Types de liaisons hydrogène CO...HN sur une chaîne peptidique impliquées dans la formation de coude γ (C_7), coude β (C_{10}) et hélice α (C_{13}). (b) décalages spectraux associés de la vibration NH. Figures tirées de la ref¹⁵.

Les études en phase gazeuse de molécules d'intérêt biologique de tailles de plus en plus grandes ont émergé depuis une vingtaine d'année grâce au développement de méthodes d'ionisation dites « douces », telles que l'électro-nébulisation (ESI)¹⁶ et la désorption laser assistée par matrice (MALDI).¹⁷ Ces méthodes de mise en phase gazeuse permettent d'étudier les formes ioniques, protonées ou déprotonées, de molécules intactes, non dégradées et isolées. L'intérêt principal de la spectrométrie de masse est de connaître parfaitement la stoechiométrie des complexes moléculaires étudiés, par exemple pour étudier les effets de solvation en contrôlant le nombre de molécules d'eau en interaction avec le soluté. Un

deuxième avantage des études sur les espèces ioniques est de pouvoir les manipuler relativement facilement par des champs électrostatiques, de les piéger dans des pièges à ions afin de les sélectionner en masse, de les thermaliser et de les interroger par spectroscopie laser pendant des échelles de temps allant jusqu'à la seconde. Les premières études couplant spectrométrie de masse et spectroscopie laser ont permis de déterminer les structures de systèmes modèles,¹⁸ tels que les bases nucléiques de l'ADN, les acides aminés et les petits peptides, ainsi que des sucres, et sont maintenant étendues aux systèmes plus grands et complexes tels que de longues chaînes peptidiques,¹⁹ des brins d'ADN,²⁰ ou des complexes non-covalents peptide-ligand.²¹ Ces premières études spectroscopiques sur des systèmes complexes ont notamment pour but de savoir si les structures natives observées en phase condensée sont conservées en phase gazeuse après désolvatation.

Une autre stratégie pour étudier la structure tridimensionnelle d'ions moléculaires de grandes tailles est d'utiliser la spectrométrie de mobilité ionique. Dans ces expériences, les ions traversent une cellule contenant un gaz rare maintenue à température et pression constantes en présence d'un faible champ électrique. Le temps de transit des ions est mesuré et permet d'estimer leur section efficace de diffusion²² qui dépend de leur conformation. Des changements importants de structures secondaires sur des peptides ont ainsi été mis en évidence, notamment le repliement de la protéine cytochrome C en fonction de l'état de charge^{23,24} ou la stabilisation d'hélice α sur des polyalanines en fonction de la taille et de la localisation de la charge en C ou N terminal.²⁵ Il existe d'autres techniques basées sur le principe de la mobilité ionique qui permettent de séparer les conformations des ions mais sans pouvoir mesurer directement les sections efficaces de diffusion. La technique FAIMS (high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry) a été développée dans le groupe de Guevremont²⁶ et permet de filtrer la transmission des ions en fonction des constantes de mobilité dépendantes de l'intensité du champ à travers une petite cellule cylindrique placée entre la source ESI et le capillaire de transfert des ions vers la chambre du spectromètre de masse.²⁷ Cette technique présente l'avantage d'être relativement simple à installer mais a tendance à activer les ions, ce qui induit un dépliement des peptides.²⁸ L'équipe de T. Rizzo a très récemment installé un FAIMS sur leur expérience de spectroscopie laser sur ions froids. Ils ont ainsi pu enregistrer les spectres électroniques de la bradykinine en fonction des conformations sélectionnées dans la source.²⁹ Le couplage de la spectroscopie laser haute résolution avec une sélection en conformation suivant la mobilité des ions ouvre clairement de nouvelles perspectives pour l'étude de systèmes biologiques flexibles et complexes.

C'est dans cette optique que le groupe Biomolécules et Spectroscopie a entrepris depuis quelques années d'étudier la structure de biomolécules de grandes tailles en combinant plusieurs méthodes expérimentales indépendantes : la spectroscopie laser IRMPD et la mobilité ionique. Les expériences sont réalisées indépendamment sur deux montages différents, au centre laser infrarouge d'Orsay (CLIO) pour la spectroscopie et à Lyon dans le groupe de Ph. Dugourd pour la mobilité ionique. L'expérience de mobilité ionique nous donne accès aux paramètres structuraux globaux du système, par la mesure de la section efficace de diffusion, alors que la spectroscopie IR nous permet de sonder plus précisément les interactions (de type liaisons hydrogène) intra- et inter-moléculaires. Ces expériences sont réalisées sur des ions à 300 K qui présentent une hétérogénéité conformationnelle assez grande suivant la flexibilité de la molécule. Ceci se traduit par des spectres vibrationnels peu résolus et des pics de mobilité généralement plus larges que ceux attendus pour une seule conformation. Néanmoins, la combinaison des deux permet de sélectionner parmi les nombreuses structures compatibles avec l'une ou l'autre des données.³⁰

L'un des objectifs de ma thèse a été de compléter cette approche couplant la spectroscopie laser et la mobilité ionique en analysant les spectres de fragmentation induite par capture électronique (ECD) pour obtenir des informations supplémentaires sur la structure adoptée par les peptides. Le but est d'utiliser les informations structurales tirées des expériences de spectroscopie et de mobilité pour, tout d'abord, analyser les spectres ECD de peptides amyloïdes et ensuite de proposer une méthodologie de traitement des spectres ECD pour obtenir des informations sur la structure des peptides tryptophane zipper, indépendamment des deux autres techniques.

La fragmentation induite par capture électronique est une technique complémentaire à la fragmentation induite par collision à basse énergie (CID) qui permet de déterminer la structure primaire des peptides. En CID, on ne peut pas remonter à la structure secondaire des molécules car la fragmentation a lieu après un chauffage « lent » et une redistribution statistique de l'énergie qui induit un changement structural avant fragmentation (modèle du proton mobile).³¹ Par contre, l'ECD est considérée comme une méthode de fragmentation « non statistique » (sujet toujours débattu³²) avec des voies de fragmentation spécifiques à la formation d'espèces radicalaires instables. Par exemple, il a été montré que des liaisons intermoléculaires faibles présentes dans les complexes non-covalents peuvent être préservées après ECD.³³ L'un des enjeux du développement de nouvelles techniques de fragmentation est

de pouvoir relier les spectres de fragmentation avec une information sur la structure tridimensionnelle de biomolécules.

Plusieurs approches ont été entreprises pour interpréter les spectres ECD en termes de structures. Le groupe de F. McLafferty a analysé les spectres de fragmentation (fragments *c/z* associés à la rupture de la liaison N-C α) de l'ubiquitine suivant les conditions d'activation ou de l'état de charge, en essayant de trouver une corrélation avec la structure connue en phase condensée.³⁴ Plus récemment, Tsybin *et al.*³⁵ ont corrélé la distribution d'intensité des fragments *c/z* sur des peptides amphipathiques (contenant des acides aminés polaires et non polaires) qui présente des maxima tous les 3-4 acides aminés. Les auteurs ont suggéré que cette périodicité est compatible avec la structure native du peptide en hélice α (liaison hydrogène C₁₃ impliquant 4 résidus pour former le cycle) et que la position des maxima le long de la séquence peptidique était corrélée à l'hydrophobicité des acides aminés. En sélectionnant les différentes conformations du peptide ubiquitine par FAIMS, le groupe d'E. Williams a montré que la distribution d'intensité des fragments *c/z* dépend de la structure du peptide.³⁶ Sur des systèmes plus petits, une autre approche consiste à corréler les spectres ECD avec les structures issues de recherches conformationnelles par dynamique moléculaire, le plus souvent en utilisant des champs forces classiques.^{37,38} L'analyse des spectres ECD en terme de structures adoptées par les peptides dépend alors de la confiance accordée à la méthode de calcul pour déterminer effectivement les structures les plus probables peuplées dans les conditions expérimentales.

En fait, la plupart des études citées précédemment repose sur une interprétation des résultats expérimentaux en termes de structures par comparaison avec les prédictions tirées de calculs sur les différentes conformations possibles des peptides. Dans le cas des études spectroscopiques sur des systèmes modèles refroidis en jet supersonique, la petite taille des molécules permet d'utiliser des méthodes de chimie quantique fiables pour calculer les spectres vibrationnels avec confiance. Notre groupe et celui de M. Mons ont par exemple montré que, suivant la méthode utilisée et en utilisant des facteurs d'échelle spécifiques à chaque mode, on pouvait atteindre une précision meilleure que 10 cm⁻¹ sur la prédiction des fréquences dans la région amide A, I et II,³⁹⁻⁴¹ ce qui est généralement suffisant pour discriminer les différents types de liaisons hydrogène (Figure 3b). Le calcul des spectres vibrationnels pour les systèmes moléculaires contenant plusieurs centaines d'atomes est, par contre, beaucoup plus compliqué car il n'est plus possible d'utiliser les méthodes bien établies

sur les petits systèmes. Notre équipe a proposé d'utiliser une méthode hybride de type QM/SE (chimie quantique / méthode semi-empirique) pour simuler les spectres vibrationnels de molécules de grandes tailles.⁴² L'incertitude sur la prédiction est plus grande (de l'ordre de 10-15 cm⁻¹), mais reste compatible avec la plus faible résolution des spectres obtenus par IRMPD sur des ions étudiés à température ambiante.

L'un des problèmes cruciaux du traitement théorique des systèmes de grandes tailles repose en fait sur l'exploration de la surface d'énergie potentielle (PES) pour localiser les multiples minima de la surface associés à des structures stables. La complexité de la surface croît grandement avec la taille du système, ce qui impose l'utilisation de méthodes rapides et efficaces. Deux types de recherche peuvent être effectuées, l'une statistique basée sur des algorithmes Monte Carlo et l'autre issue de simulations de dynamique moléculaire à température finie. En collaboration avec F. Calvo de l'ILM (Lyon), nous avons choisi d'utiliser la dynamique moléculaire par échange de réplique (REMD)⁴³ en utilisant le champ de force AMBER. Plusieurs dynamiques à différentes températures (entre 100 et 1000 K) sont propagées simultanément avec la possibilité d'échanger les structures entre deux températures adjacentes. Cette méthode permet d'explorer efficacement des surfaces présentant des barrières de potentiel pour un temps de simulation raisonnable. Les dynamiques génèrent plusieurs milliers de conformations différentes, ce qui nécessite un gros travail d'analyse pour proposer les familles de conformères qui peuvent être effectivement peuplées dans les conditions expérimentales. L'ensemble des conformations trouvées au niveau AMBER sert alors de point de départ pour un traitement théorique avec des méthodes plus sophistiquées, notamment pour prédire les spectres vibrationnels.

Mon manuscrit est divisé en cinq grands chapitres. Les deux premiers présentent les méthodes expérimentales et théoriques utilisées pour ce travail. Les chapitres 3 et 4 sont consacrés à la présentation de l'étude sur les structures adoptées en phase gazeuse par les peptides amyloïdes A β ₁₂₋₂₈ et les tryptophane zippers. Je montrerai que les expériences de mobilité ionique, spectroscopie IRMPD et fragmentation ECD sont complémentaires et permettent de proposer, pour ces systèmes flexibles de relativement grande taille, un nombre limité de structures calculées compatibles avec les mesures expérimentales. Le dernier chapitre sera consacré à la présentation d'un nouveau montage expérimental en cours de développement au laboratoire qui porte sur une désorption laser sur micro-gouttelettes liquide sous vide et détection des espèces ioniques par spectrométrie de masse à temps de vol. C'est

une technique originale, unique en France, de vaporisation de molécules d'intérêt biologique qui devrait permettre d'étudier à terme leurs structures en phase gazeuse dans des conditions au plus proche de celles de la solution.

Références

1. Byler, D. M. & Susi, H. Examination of the Secondary Structure of Proteins by Deconvolved Ftir Spectra. *Biopolymers* **25**, 469-487 (1986).
2. Greenfield, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols* **1**, 2876-2890 (2006).
3. Rizzo, T. R., Park, Y. D., Peteanu, L. A. & Levy, D. H. The Electronic-Spectrum of the Amino-Acid Tryptophan in the Gas-Phase. *Journal of Chemical Physics* **84**, 2534-2541 (1986).
4. de Vries, M. S. & Hobza, P. Gas-phase spectroscopy of biomolecular building blocks. *Annual Review of Physical Chemistry* **58**, 585-612 (2007).
5. Dian, B. C. et al. The infrared and ultraviolet spectra of single conformations of methyl-capped dipeptides: N-acetyl tryptophan amide and N-acetyl tryptophan methyl amide. *Journal of Chemical Physics* **117**, 10688-10702 (2002).
6. Chin, W. et al. Secondary structures of short peptide chains in the gas phase: Double resonance spectroscopy of protected dipeptides. *Journal of Chemical Physics* **122**, 054317 (2005).
7. Reha, D. et al. Structure and IR spectrum of phenylalanyl-glycyl-glycine tripeptide in the gas-phase: IR/UV experiments, ab initio quantum chemical calculations, and molecular dynamic Simulations. *Chemistry-a European Journal* **11**, 6803-6817 (2005).
8. Stearns, J. A. et al. Conformation-specific Spectroscopy and photodissociation of cold, protonated tyrosine and phenylalanine. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 11814-11820 (2007).
9. Gerhards, M., Unterberg, C., Gerlach, A. & Jansen, A. beta-sheet model systems in the gas phase: Structures and vibrations of Ac-Phe-NHMe and its dimer (Ac-Phe-NHMe)₂. *Physical Chemistry Chemical Physics* **6**, 2682-2690 (2004).
10. Fricke, H., Funk, A., Schrader, T. & Gerhards, M. Investigation of secondary structure elements by IR/UV double resonance spectroscopy: Analysis of an isolated beta-sheet model system. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 4692-4698 (2008).
11. Chin, W. et al. Competition between local conformational preferences and secondary structures in gas-phase model tripeptides as revealed by laser spectroscopy and theoretical chemistry. *Physical Chemistry Chemical Physics* **6**, 2700-2709 (2004).
12. Chin, W. et al. Intrinsic folding of small peptide chains: Spectroscopic evidence for the formation of beta-turns in the gas phase. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 707-712 (2005).
13. Brenner, V., Piuze, F., Dimicoli, I., Tardivel, B. & Mons, M. Spectroscopic evidence for the formation of helical structures in gas-phase short peptide chains. *Journal of Physical Chemistry A* **111**, 7347-7354 (2007).
14. Stearns, J. A., Seaiby, C., Boyarkin, O. V. & Rizzo, T. R. Spectroscopy and conformational preferences of gas-phase helices. *Physical Chemistry Chemical Physics* **11**, 125-132 (2009).

15. Chin, W., Piuizzi, F., Dimicoli, I. & Mons, M. Probing the competition between secondary structures and local preferences in gas phase isolated peptide backbones. *Physical Chemistry Chemical Physics* **8**, 1033-1048 (2006).
16. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules. *Science* **246**, 64-71 (1989).
17. Tanaka, K. The origin of macromolecule ionization by laser irradiation (Nobel lecture). *Angewandte Chemie-International Edition* **42**, 3860-3870 (2003).
18. Eyler, J. R. Infrared Multiple Photon Dissociation Spectroscopy of Ions in Penning Traps. *Mass Spectrometry Reviews* **28**, 448-467 (2009).
19. Oomens, J. et al. Charge-state resolved mid-infrared spectroscopy of a gas-phase protein. *Physical Chemistry Chemical Physics* **7**, 1345-1348 (2005).
20. Gabelica, V. et al. Infrared signature of DNA G-quadruplexes in the gas phase. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 1810-+ (2008).
21. Pouilly, J. C. et al. Probing the specific interactions and structures of gas-phase vancomycin antibiotics with cell-wall precursor through IRMPD spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics* **12**, 3606-3615 (2010).
22. Vonhelden, G., Hsu, M. T., Gotts, N. & Bowers, M. T. Carbon Cluster Cations with up to 84 Atoms - Structures, Formation Mechanism, and Reactivity. *Journal of Physical Chemistry* **97**, 8182-8192 (1993).
23. Clemmer, D. E., Hudgins, R. R. & Jarrold, M. F. Naked Protein Conformations - Cytochrome-C in the Gas-Phase. *Journal of the American Chemical Society* **117**, 10141-10142 (1995).
24. Shelimov, K. B., Clemmer, D. E., Hudgins, R. R. & Jarrold, M. F. Protein structure in vacuo: Gas-phase confirmations of BPTI and cytochrome c. *Journal of the American Chemical Society* **119**, 2240-2248 (1997).
25. Hudgins, R. R., Ratner, M. A. & Jarrold, M. F. Design of helices that are stable in vacuo. *Journal of the American Chemical Society* **120**, 12974-12975 (1998).
26. Purves, R. W., Guevremont, R., Day, S., Pipich, C. W. & Matyjaszczyk, M. S. Mass spectrometric characterization of a high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometer. *Review of Scientific Instruments* **69**, 4094-4105 (1998).
27. Purves, R. W., Barnett, D. A. & Guevremont, R. Separation of protein conformers using electrospray-high field asymmetric waveform ion mobility spectrometry-mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* **197**, 163-177 (2000).
28. Shvartsburg, A. A., Li, F., Tang, K. & Smith, R. D. Distortion of ion structures by field asymmetric waveform ion mobility spectrometry. *Analytical Chemistry* **79**, 1523-1528 (2007).
29. Papadopoulos, G., Svendsen, A., Boyarkin, O. V. & Rizzo, T. R. Conformational Distribution of Bradykinin bk+2 H (2+) Revealed by Cold Ion Spectroscopy Coupled with FAIMS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **23**, 1173-1181 (2012).
30. Pouilly, J. C. et al. Combining ion mobility mass spectrometry and infrared multiphoton dissociation spectroscopy to probe the structure of gas-phase vancomycin-Ac(2)(L)K(D)A(D)A non-covalent complex. *International Journal of Mass Spectrometry* **297**, 28-35 (2010).
31. Dongre, A. R., Jones, J. L., Somogyi, A. & Wysocki, V. H. Influence of peptide composition, gas-phase basicity, and chemical modification on fragmentation efficiency: Evidence for the mobile proton model. *Journal of the American Chemical Society* **118**, 8365-8374 (1996).

32. Turecek, F. N-C-alpha bond dissociation energies and kinetics in amide and peptide radicals. Is the dissociation a non-ergodic process? *Journal of the American Chemical Society* **125**, 5954-5963 (2003).
33. Zubarev, R. A. et al. Electron capture dissociation for structural characterization of multiply charged protein cations. *Analytical Chemistry* **72**, 563-573 (2000).
34. Breuker, K., Oh, H. B., Horn, D. M., Cerda, B. A. & McLafferty, F. W. Detailed unfolding and folding of gaseous ubiquitin ions characterized by electron capture dissociation. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 6407-6420 (2002).
35. Ben Hamidane, H. et al. Periodic Sequence Distribution of Product Ion Abundances in Electron Capture Dissociation of Amphipathic Peptides and Proteins. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **20**, 1182-1192 (2009).
36. Robinson, E. W., Leib, R. D. & Williams, E. R. The role of conformation on electron capture dissociation of ubiquitin. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **17**, 1469-1479 (2006).
37. Polfer, N. C., Haselmann, K. F., Langridge-Smith, P. R. R. & Barran, P. E. Structural investigation of naturally occurring peptides by electron capture dissociation and AMBER force field modelling. *Molecular Physics* **103**, 1481-1489 (2005).
38. Patriksson, A. et al. Prediction of N-C(alpha) bond cleavage frequencies in electron capture dissociation of Trp-cage dications by force-field molecular dynamics simulations. *International Journal of Mass Spectrometry* **248**, 124-135 (2006).
39. Bouteiller, Y., Gillet, J. C., Gregoire, G. & Schermann, J. P. Transferable Specific Scaling Factors for Interpretation of Infrared Spectra of Biomolecules from Density Functional Theory. *Journal of Physical Chemistry A* **112**, 11656-11660 (2008).
40. Bouteiller, Y., Pouilly, J. C., Desfrancois, C. & Gregoire, G. Evaluation of MP2, DFT, and DFT-D Methods for the Prediction of Infrared Spectra of Peptides. *Journal of Physical Chemistry A* **113**, 6301-6307 (2009).
41. Gloaguen, E., Pollet, R., Piuze, F., Tardivel, B. & Mons, M. Gas phase folding of an (Ala)₄ neutral peptide chain: spectroscopic evidence for the formation of a beta-hairpin H-bonding pattern. *Physical Chemistry Chemical Physics* **11**, 11385-11388 (2009).
42. Pouilly, J. C., Gregoire, G. & Schermann, J. P. Evaluation of the ONIOM Method for Interpretation of Infrared Spectra of Gas-Phase Molecules of Biological Interest. *Journal of Physical Chemistry A* **113**, 8020-8026 (2009).
43. Sugita, Y. & Okamoto, Y. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. *Chemical Physics Letters* **314**, 141-151 (1999).

CHAPITRE I
Méthodologie expérimentale pour l'étude structurale
de molécules en phase gazeuse

CHAPITRE I

Méthodologie expérimentale pour l'étude structurale de molécules en phase gazeuse

1. Introduction

Les études des systèmes biomoléculaires complexes nécessitent de nouveaux développements dans les techniques expérimentales et théoriques. Notre méthodologie est de combiner trois techniques expérimentales complémentaires, la spectroscopie IRMPD, la spectrométrie de mobilité ionique et la dissociation induite par attachement d'électron ECD, pour caractériser la structure des biomolécules en phase gazeuse. La spectrométrie de mobilité ionique nous donne accès à la structure « globale » du système, alors que la spectroscopie IR nous permet de sonder plus précisément les interactions (de type liaisons hydrogène) intra- et inter-moléculaires. L'ECD est une technique de fragmentation de peptides multiprotonés induite par l'attachement d'un électron surnuméraire qui donne lieu à des fragmentations spécifiques (de type *c/z*) au niveau de la liaison N-C α de la chaîne peptidique. L'originalité de notre approche repose sur l'analyse de la distribution d'intensité des fragments *c/z* obtenus en ECD en relation avec les informations structurales obtenues par mobilité et IRMPD. Le couplage entre ces techniques est un outil prometteur pour l'analyse de structures de biomolécules complexes. Ces expériences sont faites en collaboration avec le groupe de Ph. Dugourd (ILM) et G. Van der Rest (LMR-LCP).

Je vais vous présenter dans ce chapitre, les techniques expérimentales que j'ai utilisées pendant ma thèse: la spectroscopie infrarouge (IRMPD), la spectrométrie de mobilité ionique (IMS), et la dissociation induite par attachement d'électron (ECD). Chaque technique possède ses propres caractéristiques et apporte potentiellement des informations complémentaires pour déduire des informations sur la structure des systèmes biomoléculaires complexes.

2. Source électrospray

Dans toutes les expériences que nous avons réalisées, un système électrospray (ESI) est utilisé comme source de mise en phase gazeuse des ions. L'électrospray est une technique d'ionisation « douce » à pression atmosphérique. Elle permet de produire des ions

moléculaires de grandes tailles protonés ou déprotonés plusieurs fois. En 1984, John B. Fenn développe cette source d'ions qui lui vaudra le prix Nobel en 2002.¹ Ce type de sources d'ions est largement utilisé en spectrométrie de masse.

Un ESI se compose simplement d'une aiguille en face d'un capillaire. Une solution contenant l'analyte est injectée en face d'un capillaire chauffé (100-200 °C) de 100 µm de diamètre dans une région de fort champ électrique (3-5 kV/cm). L'effet de pointe du champ électrique sur le jet liquide génère un spray de gouttelettes hautement chargées qui sont guidées par un gradient de champ et de pression vers l'enceinte du spectromètre de masse. Pendant ce transfert, les gouttelettes réduisent en taille par évaporation du solvant et/ou par fission (explosion coulombienne due à la grande densité de charge des micros gouttelettes)² jusqu'à ce que des ions complètement désolvatés soient produits.³

La mise en phase gazeuse des ions par ESI peut être décomposée en trois étapes : formation des gouttelettes, réduction de leurs tailles et désolvatation complète. Si on applique un potentiel positif sur l'aiguille (pour produire des protonés), les cations en solution migrent vers la contre électrode (capillaire), s'accumulent à la surface ce qui établit un cône de Taylor.⁴ Quand le champ électrique externe est élevé, le cône se transforme en filament et produit des gouttelettes chargées dès lors que la tension de surface devient plus petite que la force exercée par le champ externe (Figure 1). Le diamètre des gouttelettes dépend de plusieurs paramètres, la valeur du champ électrique, le flux d'injection du liquide et la nature du solvant. En général, nous travaillons avec des solutions eau-méthanol (50-50 en volume) et des flux de 10-100 µl/h, le potentiel appliqué est de 3500 V et la température de capillaire est 200 °C.

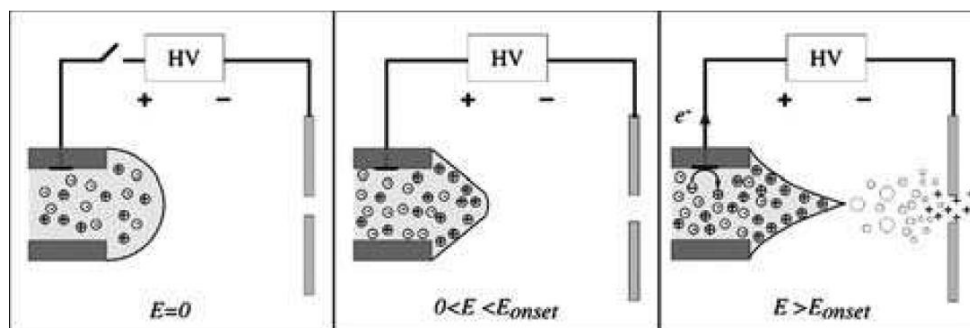


Figure 1: La formation du cône Taylor sous l'effet du champ électrostatique

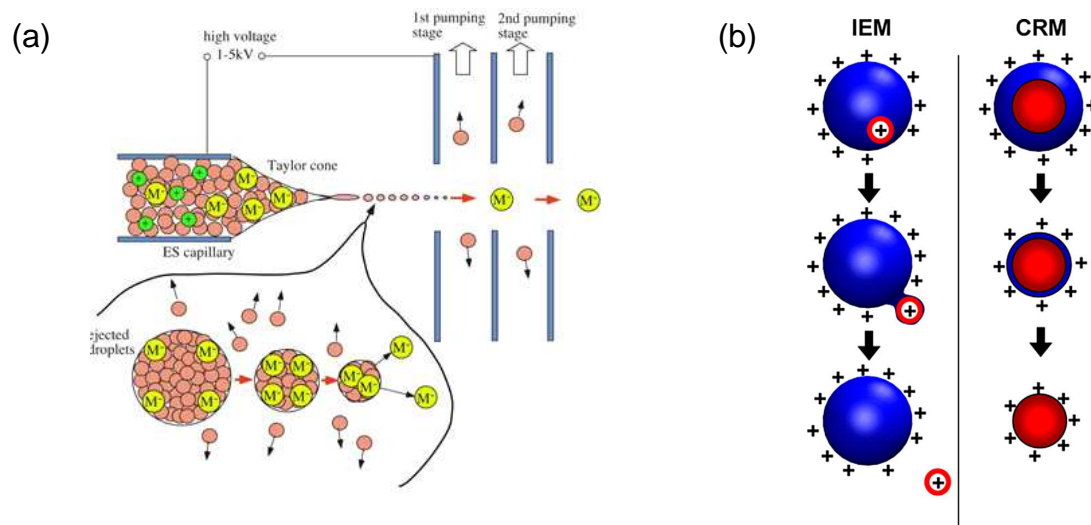


Figure 2: Représentation schématique (a) d'une source ESI couplée à un spectromètre de masse ; (b) des deux modèles CRM et IEM introduits pour la mise en phase gazeuse des ions par ESI.⁵

Deux mécanismes de désolvatation ont été proposés et sont schématiquement présentés à la figure 2b. Konermann *et al.* ont récemment publié un article de revue sur le sujet.⁵ Dans le modèle CRM « charged residue », la répulsion électrostatique due à l'augmentation de la densité de charge à la surface des gouttelettes au cours de l'évaporation du solvant surpasse sa tension de surface (limite de Rayleigh). Il y a fission asymétrique de la gouttelette, c'est l'explosion coulombienne. L'explosion produit une gouttelette principale ainsi qu'une multitude de gouttelettes secondaires. Ces petites gouttelettes atteignent rapidement la limite de Rayleigh, ce qui va accélérer le processus de fission. Ce processus se répète plusieurs fois, la taille de gouttelettes réduit rapidement jusqu'à ce qu'une seule molécule d'analyte chargée soit contenue dans une microgouttelette.⁶

Le second mécanisme repose sur un modèle d'évaporation du solvant IEM.^{7,8} Au cours de l'évaporation, l'augmentation de la densité de charge en surface de la gouttelette induit une répulsion coulombienne qui devient plus grande que l'adhésion des ions à la surface, conduisant à l'expulsion des ions analytes. Il est généralement admis que les ions moléculaires de petites tailles sont produits grâce à ce mécanisme,⁹ alors que les ions moléculaires de grandes tailles et les protéines globulaires sont produits par le processus CRM.¹⁰

3. Spectroscopie infrarouge IRMPD

3.1 Introduction

La spectroscopie IR est historiquement utilisée en physique moléculaire pour mesurer de manière très précise les fréquences des modes de vibrations des molécules. Appliquée aux molécules d'intérêt biologique, dans notre cas les peptides, certains modes de vibrations sont particulièrement importants pour déduire des informations sur la structure des molécules par comparaison avec des calculs de chimie quantique.¹¹ Ces modes d'élongation et de pliage font intervenir les groupements (neutre, protoné ou déprotoné) amide, amine, carbonyle qui sont susceptibles d'être engagés dans des liaisons hydrogène lors de la formation de structures secondaires. Les déplacements spectraux observés peuvent alors être interprétés comme une signature expérimentale d'interaction locale entre ces groupes. En étudiant des systèmes de taille croissante, on peut espérer voir apparaître l'émergence de structures tridimensionnelles, telles que les feuilletts β ,¹² les formes en hélice (α , 3_{10})¹³ avec des boucles de repliements (β -turn, γ -turn).¹⁴ En phase condensée, les études de spectroscopie IR par transformée de Fourier (FT-IR) permettent de déterminer des signatures spectrales spécifiques dès lors que la molécule adopte une structure secondaire bien définie.

En phase gazeuse, la technique de double résonance IR/UV a été appliquée avec succès depuis plus d'une décennie sur des petits systèmes neutres (acide aminé aromatique, di- et tri-peptides, bases nucléiques, sucres simples), refroidis dans une détente supersonique, afin de geler les conformations dans les minima de plus basses énergies et d'affiner le contour rotationnel des bandes vibrationnelles. Récemment, le groupe de T. Rizzo (EPFL) a utilisé cette technique pour l'étude de peptides protonées, sélectionnées en masse et piégées dans une trappe radiofréquence linéaire (22 pôles) couplée à un cryostat à hélium afin de descendre à des températures de l'ordre de 10-20 K.¹⁵⁻¹⁷ La spectroscopie de double résonance IR/UV permet d'enregistrer le spectre IR d'un conformère sélectionné par ionisation résonnante à deux photons UV (R2PI), et peut donc s'interpréter naturellement par comparaison avec des calculs de chimie quantique sur les conformations de plus basses énergies.¹⁸ Par contre, seuls les systèmes possédant un chromophore aromatique peuvent être excités électroniquement avec les lasers UV courants (OPO ou laser à colorant). D'une manière générale, cette méthode s'applique principalement à des systèmes de tailles réduites car elle nécessite de travailler sur

des espèces avec peu d'énergie interne (refroidissement soit dans une détente adiabatique soit par cryogénie) afin d'obtenir une spectroscopie électronique résolue.

A l'inverse, la spectroscopie infrarouge de photodissociation par absorption multiphotonique (IRMPD) peut être considérée comme « universelle » pour l'étude des espèces ioniques car elle s'applique à tous types de molécules.¹⁹ Premièrement, par rapport à la méthode IR/UV, la spectroscopie IRMPD ne nécessite pas de chromophore UV, alors qu'il n'y a que trois acides aminés (Tyr, Trp, Phe) qui procèdent un cycle aromatique. Deuxièmement, la spectroscopie IRMPD n'est pas a priori limitée en taille de systèmes étudiés. Le groupe de J. Oomens a par exemple enregistré le spectre IRMPD du cytochrome C qui possède plus d'une centaine d'acides aminés²⁰ et notre groupe a étudié la formation de quartets de guanine dans la séquence télomérique humaine [TTAGGG]₄ (24 oligonucléotides).²¹

Par contre, la spectroscopie IRMPD a plusieurs inconvénients. Tout d'abord, elle n'est pas sélective en conformation et le spectre enregistré est la somme de toutes les contributions des différentes structures peuplées dans les conditions expérimentales. Deuxièmement, pratiquement toutes les expériences ont été réalisées sur des ions à température ambiante, ce qui entraîne une forte congestion des signatures spectrales (due à la présence de multiples conformations peuplées et à l'élargissement rotationnel) et donc à une perte de sélectivité dans l'attribution des bandes observées. L'étude de systèmes de grandes tailles complique encore davantage l'analyse et les interprétations que l'on peut en faire.

3.2 Principe

La spectroscopie IRMPD est un processus qui met en jeu l'absorption de plusieurs photons. En effet, l'absorption d'un rayonnement de longueur d'onde donnée par une molécule est détectée par la fragmentation de celle-ci. Or l'énergie d'un photon IR est de l'ordre de 1000-2000 cm⁻¹, c'est-à-dire quelques centaines de meV, soit un ordre de grandeur en deçà de l'énergie de liaison d'une liaison covalente, qui est de l'ordre de quelques eV. Une molécule doit donc absorber au minimum une dizaine de photons IR pour que son énergie interne atteigne la limite de dissociation. Cependant, ces photons ne peuvent être absorbés de manière résonnante par un même mode de vibration: la réduction de l'écart entre les niveaux vibrationnels à mesure que l'on augmente le nombre quantique de vibration ν l'empêche,

l'anharmonicité étant responsable de cet effet. À température ambiante, l'énergie interne d'un peptide contenant plusieurs dizaines d'atomes est supérieure à 1 eV. À l'équilibre, les différents modes de vibration sont peuplés selon une distribution de Maxwell-Boltzmann à la température considérée, ici 300 K, ce qui veut dire que la grande majorité des modes auxquels nous nous intéressons, situés entre 1000 et 2000 cm^{-1} , sont dans leur état vibrationnel fondamental.

Le principe de l'IRMPD est présenté sur la figure 3. Une molécule doit absorber plusieurs photons afin que son énergie interne soit supérieure à la limite de dissociation. L'excitation multi-photonique résonnante intervient via un mécanisme d'absorption séquentielle incohérent. On considère que les modes vibrationnels sont tous dans leur niveau fondamental (...0000...). L'absorption d'un premier photon résonnant porte le mode v_i , dans son état excité $v_i=1$, les autres modes restant dans leur état fondamental. L'énergie absorbée est rapidement redistribuée vers les modes couplés de plus basse fréquence par relaxation vibrationnelle intramoléculaire (IVR). Le mode initialement excité $v_i=1$ revient dans son état fondamental et peut réabsorber un nouveau photon issu du même train d'impulsion et donc à la même fréquence de résonance. Ce cycle est répété jusqu'à ce que l'énergie interne devienne supérieure à la limite de dissociation de la molécule, ce qui entraîne sa fragmentation.

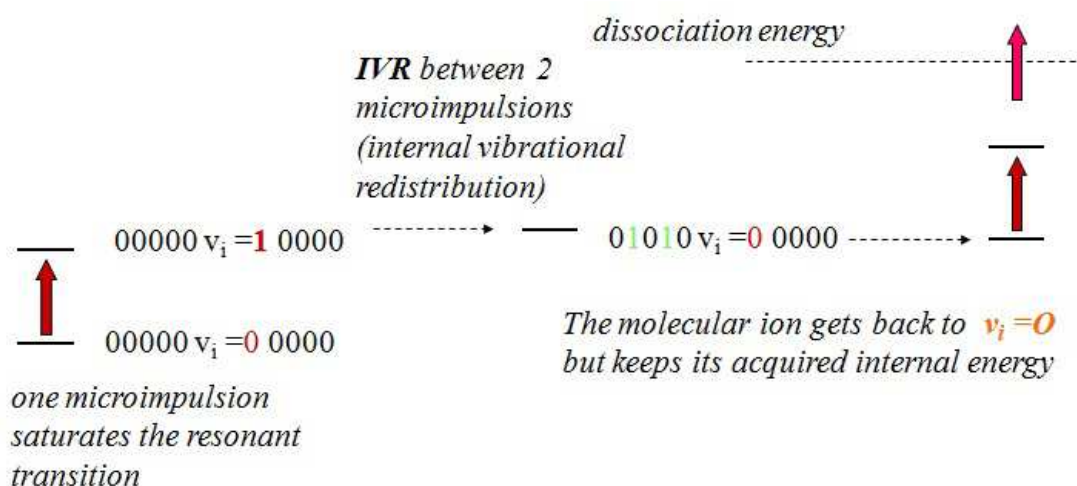


Figure 3 : Mécanisme d'absorption multi photonique et IVR

Le profil temporel d'intensité d'un laser à électrons libres, comme celui que nous avons utilisé, est extrêmement bien adapté à l'IRMPD car c'est une succession de macro-impulsions

de quelques microsecondes de large, composées elles-mêmes de micro-impulsions de quelques picosecondes séparées par quelques nanosecondes (Figure 5): un photon IR peut être absorbé à chaque micro-impulsion car l'IVR a lieu entre deux (ou plusieurs) d'entre elles. Le processus d'IVR a un temps caractéristique qui dépend de la densité de modes à l'énergie d'excitation, qui est généralement bien plus court que la nanoseconde dès que le système possède une dizaine d'atomes. Le taux de relaxation intramoléculaire est souvent de l'ordre de 10^{12} s^{-1} .²²

L'IRMPD est une spectroscopie d'action. On se place dans un régime où l'on sélectionne en masse l'espèce voulue (ion parent) et on détecte la baisse du signal apparaissant à son rapport masse/charge, en même temps que l'apparition de fragments lorsque le laser est réglé sur la fréquence d'une transition du système. La grandeur mesurée est donc un taux de fragmentation. F étant la somme des ions fragments et P le signal d'ion parent, pour une énergie E de photon donnée, le signal de fragmentation est $\frac{F}{F + P} = 1 - \exp[-k(E)t]$, où $k(E)$ est taux de fragmentation et t le temps d'interaction. Le signal de fragmentation étant généralement assez élevé (de l'ordre de 20-50%), nous reportons plutôt $-\ln\left[1 - \frac{F}{F + P}\right]$ qui est proportionnel au taux de fragmentation.

Par sa nature multi-photonique, la spectroscopie IRMPD diffère de la spectroscopie IR d'absorption linéaire, par exemple FT-IR. Dans le cas d'ions moléculaires, les intensités relatives des transitions ne suivent pas toujours celles prédites par les simulations de spectres d'absorption IR. Il existe notamment des effets de seuils qui sont à l'origine de l'absence ou la très faible intensité de certaines bandes, par exemple le mode d'élongation C=O lorsque le groupement est libre, c'est-à-dire lorsqu'il n'est pas lié par interaction électrostatique ou liaison H. La force d'oscillateur de cette transition est plus faible que dans le cas d'un groupement lié et les modes d'élongation des groupements C=O sont moins couplés que les autres modes, aboutissant à un IVR plus long et donc une absorption séquentielle moins efficace.

Même si des réarrangements structuraux peuvent intervenir après absorption de quelques photons mais avant fragmentation et donc détection, la première absorption qui conditionne les suivantes est déterminée par la structure initiale du système. C'est ce qui est extrêmement important et qui permet d'obtenir des informations structurales. Ainsi, on peut

distinguer non seulement les différents groupements chimiques constitutifs du système, mais également les mêmes groupements selon leur environnement. Par exemple, un mode d'élongation C=O d'un groupement COOH libre de toute interaction a une fréquence d'environ 1800 cm^{-1} , mais se décale à 1750 cm^{-1} pour un groupement C=O d'une liaison amide. Celle-ci peut être fortement décalée vers le rouge (les basses fréquences) lorsque le groupement C=O est engagé dans une liaison H (jusqu'à 100 cm^{-1} dans le cas d'un groupement chargé positivement engagé dans une liaison H linéaire).

3.3 Dispositif expérimental

L'expérience d'IRMPD est effectuée au Centre Laser Infrarouge d'Orsay (CLIO), sur le montage expérimental (spectromètre de masse Esquire 3000+, Bruker) du groupe de Philippe Maître du Laboratoire de Chimie Physique.²³ Les ions sont mis en phase gazeuse par une source ESI. Les ions sont entraînés vers le spectromètre de masse de type piège de Paul quadripolaire. Les ions sont piégés, sélectionnés en masse et irradiés par le laser pendant plusieurs dizaines ou centaines de millisecondes, le temps nécessaire pour absorber plusieurs dizaines de photon IR. Je vais présenter les parties importantes du montage expérimental: le laser à électrons libres et le piège.

3.3.1 Laser à électrons libres

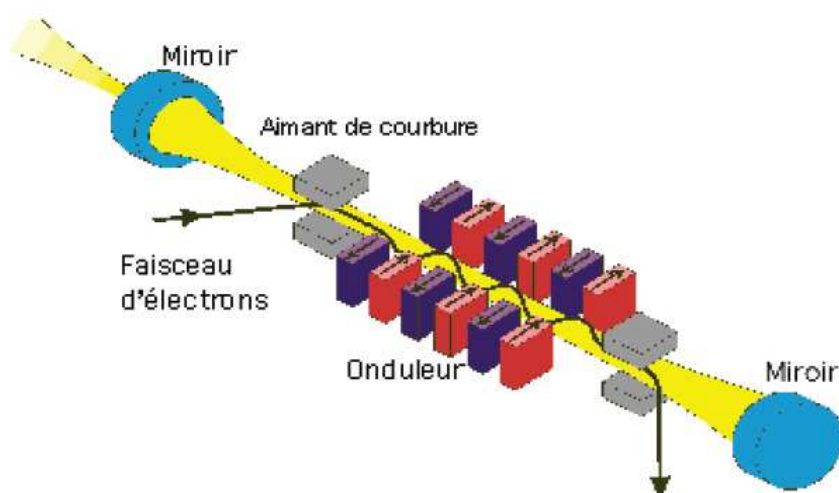


Figure 4: schéma de la cavité du laser à électrons libre CLIO.

La lumière d'un laser à électrons libre (LEL) est obtenue en faisant passer des électrons accélérés à des énergies de 10 à 50 MeV dans un onduleur, constitué d'aimants placés les uns à la suite des autres et dont les polarisations successives sont inverses. L'onduleur est placé dans une cavité laser, ce qui a pour effet de stocker les photons émis par les électrons et ces photons interagissent avec les électrons pour augmenter la cohérence et l'intensité du rayonnement IR (Figure 4). Pour nos applications, l'énergie des électrons est de l'ordre de 42-45 MeV pour obtenir une gamme d'énergie de 900 - 1850 cm^{-1} ou 1200 - 2000 cm^{-1} respectivement.

La longueur d'onde d'un LEL accordable dans le proche et moyen infrarouge 250-2500 cm^{-1} (40 à 4 μm) permet d'enregistrer le taux de fragmentation des ions en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Le profil temporel d'un laser à électrons libre est présenté à la figure 5. Le laser délivre des trains d'impulsion à 25 Hz et chaque macro-impulsion dure 8 μs et est composée de 500 micro-impulsions espacées de 16 nanosecondes. L'énergie moyenne par micro-impulsion est d'environ 60 μJ , celle par macro-impulsion est de 30 mJ. La puissance IR totale est environ 1 W dans la gamme 950-1950 cm^{-1} , et elle diminue à 400 mW pour les hautes et basses longueurs d'onde. La longueur d'onde est mesurée par un monochromateur. La largeur spectrale IR est de l'ordre de 0.5 %. Un miroir sphérique de focale 1m est utilisé pour focaliser le faisceau IR au centre du piège à ions.

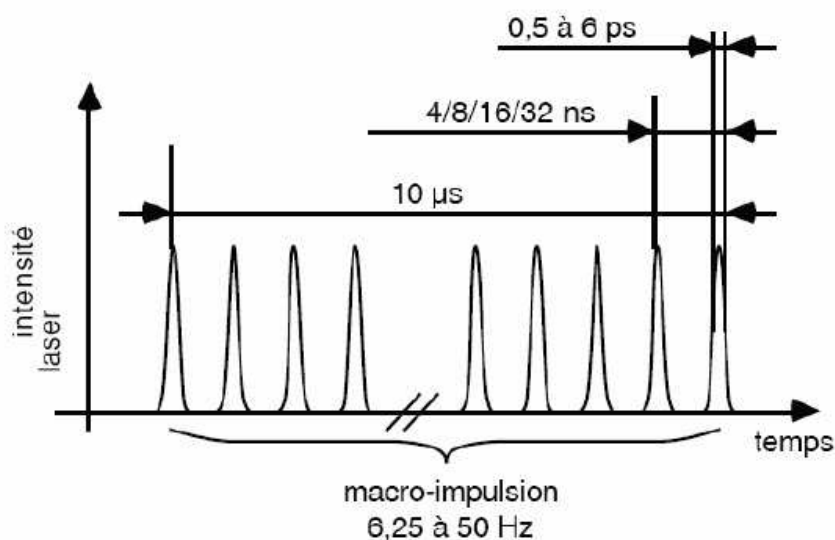


Figure 5: profil temporel du laser à l'électron libre

3.3.2 Piège à ions

Les expériences sont réalisées sur le spectromètre de masse commercial Esquire 3000 (Bruker). Un piège de type quadripolaire (trappe de Paul) est utilisé pour confiner et sélectionner en masse des ions. Il est composé de deux électrodes placées au même potentiel, une d'entrée et une de sortie (en violet sur la figure 6) et d'une troisième électrode annulaire (en orange) dont le potentiel est la somme d'une composante continue et d'une composante radiofréquence. L'électrode annulaire a été percée pour laisser passer le laser IR. Les ions sont thermalisés par un bain d'hélium d'environ 1 mbar à température ambiante.

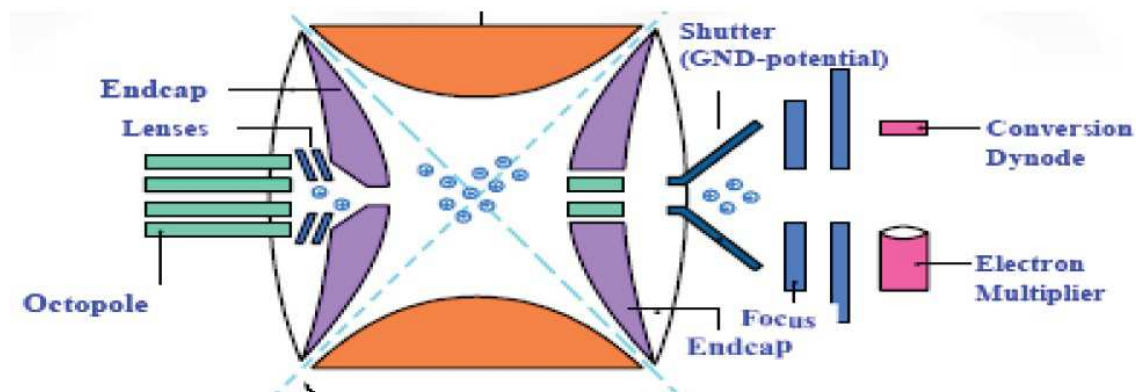


Figure 6: Trappe de Paul (Esquire Bruker)

Le champ radiofréquence est indispensable au stockage, les ions décrivant une trajectoire à l'intérieur d'une sphère de rayon r qui augmente avec le rapport m/z de l'ion (m est la masse, z la charge). La résolution en masse est de l'ordre de quelques milliers, ce qui est suffisant pour les espèces que nous avons étudiées. La sélection en masse se fait en excitant, grâce au champ radiofréquence, les ions de rapport m/z différents de celui qui nous intéresse. Une fois que l'on a isolé ceux-ci, on peut envoyer le laser CLIO qui induit la fragmentation des ions si la fréquence du laser est en résonance avec un mode de vibration de l'ion. On détecte alors les fragments pour en déduire le taux de fragmentation.

4. Spectrométrie de mobilité ionique

4.1 Introduction

La spectrométrie de mobilité ionique a connu un intense développement depuis une dizaine d'années. L'idée de base de la technique est très simple et se rapproche beaucoup de la chromatographie en phase gazeuse : il s'agit de séparer les conformations d'un même ion moléculaire en le faisant passer dans un tube contenant un gaz rare à une pression de quelques millibars. Plus une conformation est étendue, plus elle est ralentie par collision sur les atomes de gaz rare et plus elle mettra de temps à traverser le tube. Ce temps de mobilité est la grandeur physique mesurée directement en mobilité ionique. Des modèles théoriques permettent alors de relier ce temps à la section efficace de collision du système, c'est-à-dire indirectement à sa structure. Les conformations étendues ont une section efficace de collision plus grande que les conformations repliées. Des isomères structuraux, c'est-à-dire ayant la même formule brute et donc la même masse, ont pu ainsi être séparés.²⁴ La mobilité ionique est également capable, notamment grâce au développement d'appareils de haute résolution,²⁵ de distinguer les énantiomères d'une large gamme de composés chiraux d'intérêt pharmaceutique ou biologique.²⁶ Une des premières démonstrations de la puissance de cette technique, pour distinguer différentes structures secondaires de protéines entières isolées, a été fournie en 1995 par l'équipe de D. Clemmer sur le cytochrome C.²⁷ Par la suite, une multitude de groupes ont choisi la mobilité ionique pour étudier les structures et interactions de molécules ou complexes d'intérêt biologique, la plupart avec l'aide de la spectrométrie de masse.²⁸⁻³⁰ Dans notre méthodologie, la technique de mobilité ionique est choisie comme une technique complémentaire à la spectroscopie infrarouge et à la fragmentation induite par capture électronique ECD pour les études structurales de système biomoléculaire en phase gazeuse.

4.2 Principe

Le principe de la spectrométrie de mobilité ionique se base sur la séparation des ions en fonction de leurs sections efficaces de diffusion en mesurant le temps de transfert dans un tube rempli de gaz rare, sous un champ électrique homogène faible (Figure 7). L'ion est entraîné par le champ électrostatique et ralenti par les collisions avec le gaz dans le tube. Une

mesure de mobilité ionique consiste à déterminer le temps nécessaire à un ion pour traverser la longueur du tube. Ce temps de diffusion dépend de la section efficace de collision avec le gaz et donc de la conformation de l'ion : plus sa conformation est déplié, plus sa section efficace de collision est élevée, plus la force de « frottement » sera grande et plus le temps d'arrivée à la sortie du tube sera élevé. Ce temps de mobilité est la grandeur physique mesurée directement en mobilité ionique. La section efficace de collision qui contient les informations sur la structure est calculée en fonction de ce temps de diffusion de l'ion, connaissant la densité de gaz rare et le champ électrique appliqué.

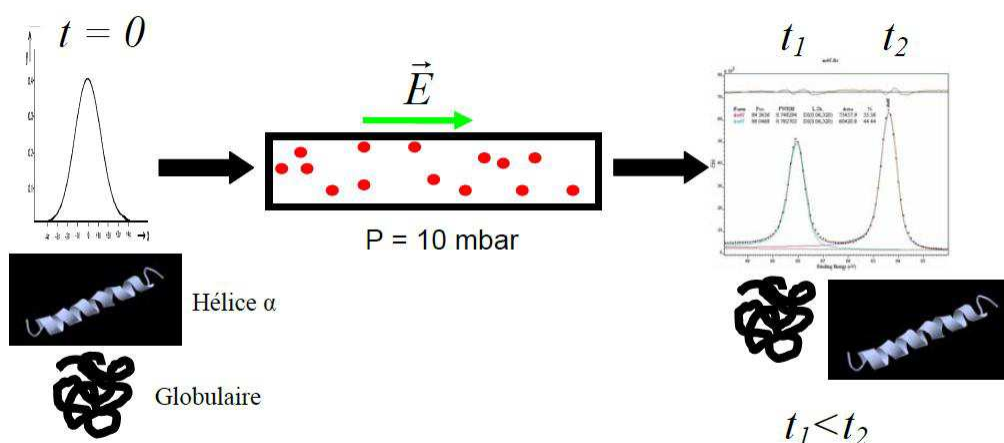


Figure 7: Principe de l'expérience de mobilité ionique

L'information structurale est déduite en comparant la section efficace de collision mesurée et la valeur calculée pour chaque conformation de la molécule. Le calcul des sections efficaces de diffusion est réalisé par le programme Mobcal développé dans l'équipe de M. Jarrold.³¹ Plusieurs méthodes permettent d'obtenir une bonne estimation de la section efficace de diffusion à partir de la vitesse de diffusion. Dans tout mon travail, j'ai utilisé la méthode des trajectoires que je vais décrire dans la partie méthodologie théorique (chapitre 2).

4.3 Théorie

En première approximation, le régime de mobilité est un régime de diffusion, les collisions sont des collisions élastiques. Le temps de dérive d'un ion à travers le tube de mobilité ionique ne dépend que du champ électrique et du nombre de collisions avec le gaz tampon, de la température, de la pression. La vitesse moyenne de mobilité v_m dans le tube est proportionnelle à l'intensité du champ électrique (E), et est définie par la relation suivante :

$$v_m = KE \quad (I.1)$$

où K est la constante de « mobilité » caractéristique de l'ion. Cette grandeur dépend de la température, de la nature du gaz tampon et de la pression. E est l'amplitude du champ électrique moyen vu par l'ion, que l'on suppose égal au champ appliqué sur les électrodes du tube de mobilité. Le temps de dérive est inversement proportionnel à K, on peut donc écrire, où l la longueur du tube, et t_d le temps de dérive dans celui-ci :

$$\frac{l}{t_d} = KE \quad (I.2)$$

Comme c'est la grandeur K qui contient l'information sur la structure de l'ion, il faut donc mesurer t_d . Le temps t_d n'est pas mesuré directement car le temps que l'on mesure est celui qui s'écoule entre le moment où les ions sont injectés dans le tube et le moment où ils sont détectés dans le spectromètre de masse. Il existe un « temps mort » correspondant au temps de parcours entre la sortie du tube et la détection. Pour extraire la section efficace de collision d'une espèce, il faut recommencer l'opération pour plusieurs valeurs du champ électrique afin de tracer une droite de calibration. C'est une droite du temps de dérive (t_d) en fonction de l'inverse du champ électrique (1/E). De cette droite, on peut déduire la constante de mobilité (K).

Les collisions entre les particules sont contrôlées par les forces exercées entre elles et la mobilité dépend essentiellement de la force d'interaction ion-gaz car on néglige les collisions à plus de deux corps et les collisions ion/ion. L'expression de K en fonction de la section efficace de diffusion est alors :

$$K = \frac{\sqrt{18\pi}}{16} \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{m_G} \right)^{1/2} \frac{qe}{\sqrt{kT\Omega N}} \quad (I.3)$$

où m : la masse de l'ion

m_G : la masse d'un atome du gaz rare contenu dans le tube

q : la charge de l'ion

e : la charge élémentaire

k : la constante de Boltzmann

N : la densité du gaz

Ω : la section efficace de diffusion

T : la température effective

La température effective est calculée comme suit :

$$T = T_G + \frac{m_G v_m^2}{3k} \quad (I.4)$$

où T_G : la température du gaz rare dans le tube, mesurée et constante dans l'expérience. Ces expressions viennent de la théorie de Viehland et Mason sur les propriétés de transport des ions moléculaires à travers un gaz.³² La relation entre la mobilité K et la section efficace de collision est valable si la masse de l'ion étudié est très supérieure à la masse du gaz tampon. Les mesures de mobilité ionique sont effectuées en régime de faible champ électrique où K est une constante. Si on est en régime de haut champ, la mobilité K sera dépendante du champ électrique.

4.4 Dispositif expérimental

Toutes les mesures en mobilité ionique ont été faites au LASIM dans le groupe de Ph. Dugourd, Université Lyon I. Je vais décrire les parties principales dans une expérience de mobilité ionique (Figure 8): l'injection d'ions et le tube de mobilité.

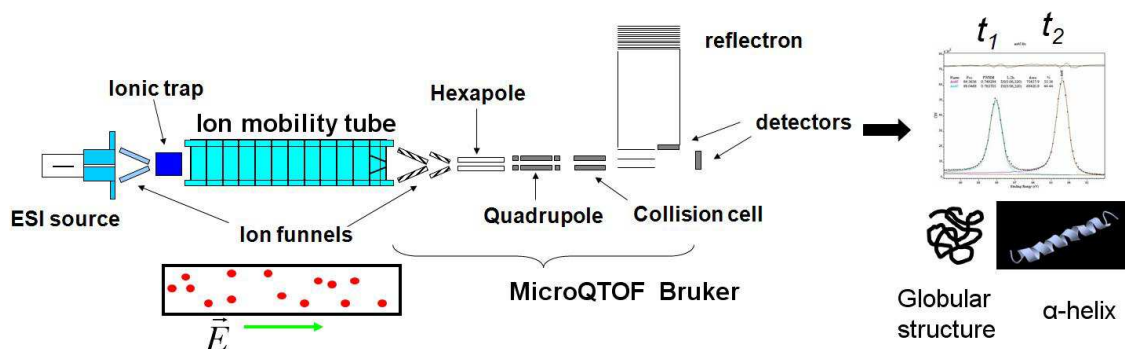


Figure 8: Montage expérimental pour les mesures de mobilité ionique

Les ions sont produits par une source électrospray en amont du tube de mobilité. La pression dans la zone de la source est de l'ordre de 10 Torr, la température de 150°C et le flux d'injection est de 100 $\mu\text{L/h}$. La longueur du tube est de 1 mètre et comporte une série de 101 électrodes cylindriques séparées de 1 cm par des isolants, une résistance étant placée entre chaque électrode. On applique une différence de potentiel de 800 V de part et d'autre du tube,

créant ainsi un champ électrique homogène tout au long du tube. La pression du gaz tampon (10 Torr) et la température (300 K) sont maintenues constantes dans le tube de diffusion. La sortie du tube est couplée à un spectromètre de masse à temps de vol de type microQ-TOF (Bruker). L'analyse par la spectrométrie de masse à temps de vol est réalisée dans un vide de $5 \cdot 10^{-7}$ mbar. L'ensemble est composé d'un double funnel, d'un hexapôle, d'un quadripôle, d'une cellule de collision et d'un réflectron. Les deux funnels servent à transmettre et refocaliser les ions après le tube. Un hexapôle permet de guider les ions à la sortie des funnels jusqu'au quadripôle qui est utilisé comme filtre de masse. Les ions sont extraits et accélérés dans le spectromètre de masse à temps de vol vers le détecteur (galettes à micro canaux) et l'utilisation d'un réflectron permet d'augmenter la résolution en masse en compensant l'élargissement des pics dû à la dispersion initiale d'énergie cinétique. La résolution maximale est de 15000.

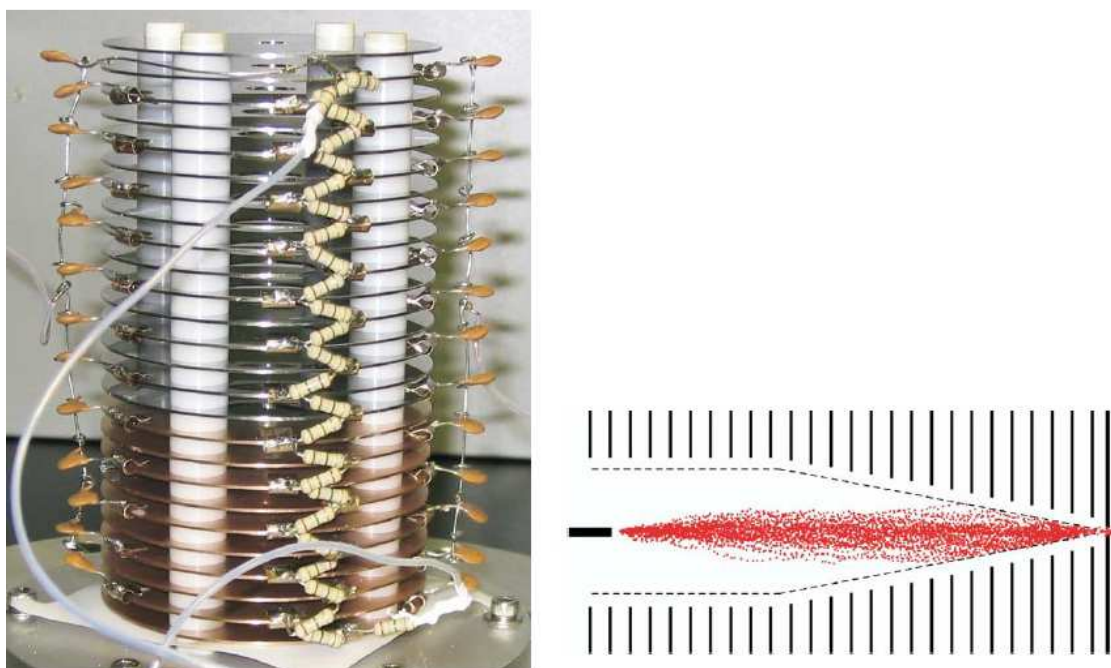


Figure 9 : Entonnoir à ions (Funnel). Le trajectoire des ions simulées.³³

Afin d'obtenir une bonne résolution et augmenter le rapport signal à bruit, il faut envoyer une grande quantité d'ions dans le tube pendant un temps d'injection le plus court possible. Pour faire cela, les ions sont refocalisées dans un funnel et piégés dans une trappe avant d'être introduits dans le tube sous forme d'un paquet d'ion.³⁴ Un funnel est constitué d'une série de lentilles électrostatique séparées par une distance de quelques millimètres, et dont le diamètre interne diminue linéairement (Figure 9). Les ions sont guidés dans le funnel

vers le tube de mobilité par une tension continue DC et une tension radio fréquence RF. Le champ radiofréquence sert à compenser les déviations dues aux collisions avec les atomes de gaz rare. Deux électrodes successives ont une tension RF en opposition de phase pour focaliser les ions. Les ions sont guidés de l'entrée à la sortie du tube par un champ électrique de plusieurs centaines de Volts par mètre. La zone de piège est maintenue à 10 Torr pour les mesures de mobilité ionique.

Pour mesurer le temps de dérive des ions dans le tube de mobilité, il faut contrôler le moment de l'injection. Pour ce but, on a utilisé un piège circulaire. Il est composé de trois électrodes, une à l'entrée et deux à la sortie. Je vais présenter le fonctionnement des pulses du piège (Figure 10).

V1 : La tension pulsée appliquée au funnel d'entrée. Cette tension V1 permet de régler le remplissage des ions dans le piège.

V2 : La tension appliquée à l'entrée du piège annulaire, qui est toujours la même valeur.

V3 : La tension de sortie du piège annulaire

V4 : La tension à l'entrée du tube de mobilité

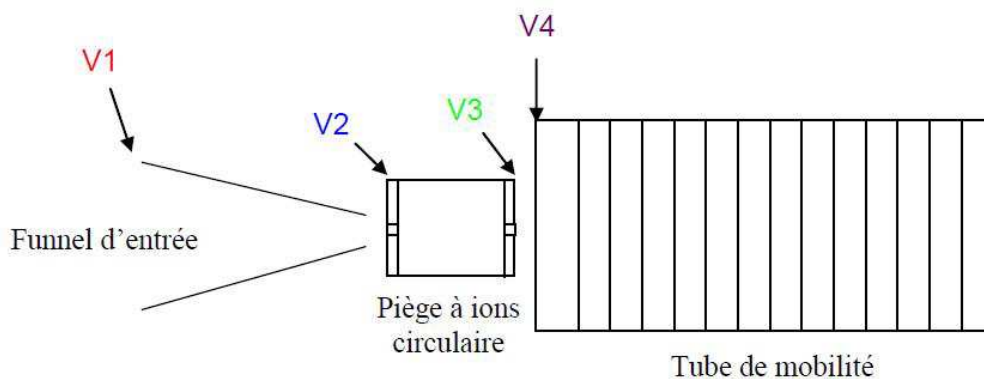


Figure 10: Schéma des potentiels appliqués aux éléments importants pour l'envoi du paquet d'ions dans le tube de mobilité

Le transfert, le stockage des ions dans le piège circulaire, et l'injection des ions dans le tube de mobilité sont trois étapes importantes qui sont réalisées en suivant une séquence précise (Figure 11). Pour injecter les ions dans le piège, une tension V1 est appliquée au funnel d'entrée pendant quelques dizaines de millisecondes (où $V1 > V2$ et $V2, V3, V4$ sont égales). Pour injecter les ions dans le tube, on baisse simultanément les tensions V3 et V4. Les ions sont injectés en un temps très court de quelques millisecondes. La résolution de la mesure dépend de cette durée d'injection dans le tube. L'équipe de Ph. Dugourd a déterminé

les conditions optimales de rapport signal à bruit de leur montage expérimental. Pour un temps d'injection de 1 ms, la résolution théorique sur la mesure du profil de temps de diffusion est $\frac{t}{\Delta t}$ qui est de l'ordre de 50.

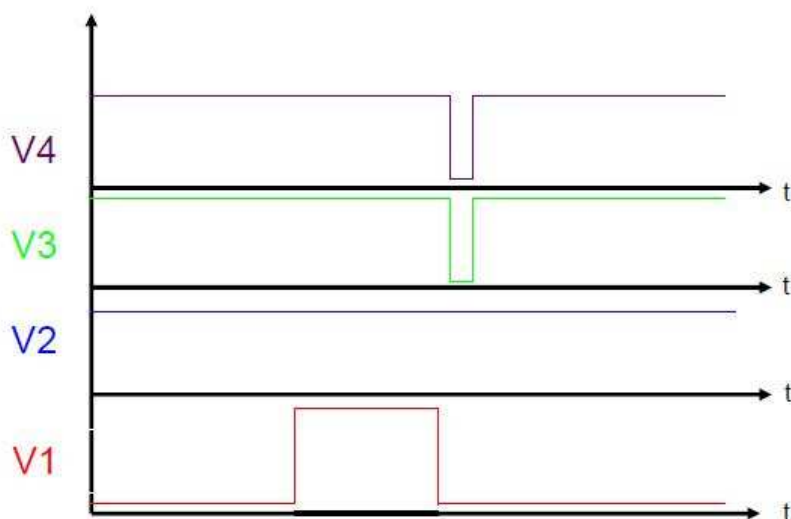


Figure 11: Schéma de la séquence temporelle typique employée pour l'envoi du paquet d'ions

5. Dissociation induite par capture électronique (ECD)

5.1 Introduction

La dissociation induite par capture électronique est une méthode efficace pour fragmenter des peptides multichargés. La capture de l'électron par un système à couche fermée $[M+nH]^{n+}$ (comme l'est un peptide protoné) engendre une espèce radicalaire $[M+nH]^{(n-1)+\bullet}$, instable, qui peut se désexciter suivant plusieurs chemins réactionnels, notamment la perte d'hydrogène ou la rupture des liaisons N-C $_{\alpha}$ ou S-S dans les peptides maintenus par un pont disulfure. C'est une technique de fragmentation complémentaire de celles plus généralement utilisées comme la dissociation induite par collision (CID) ou la photofragmentation UV ou IR. Elle se caractérise par des voies de fragmentation spécifiques, principalement les ions c/z. Historiquement, la technique ECD a été découverte fortuitement dans le groupe de McLafferty en 1996³⁵ en irradiant les peptides par un laser à 193 nm. Il s'est avéré par la suite que les fragments c/z détectés n'étaient pas induits par l'absorption du rayonnement laser mais par des électrons secondaires émis par le laser tapant sur les parois de

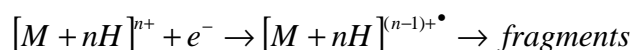
la trappe. La technique ECD a depuis été utilisée par de nombreux groupes principalement pour des applications de séquençage pour obtenir la structure primaire des peptides car elle induit un très grand nombre de ruptures de liaisons N-C α tout le long de la chaîne peptidique. Du point de vue théorique, plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer les mécanismes et les fragmentations spécifiques induites par capture électronique et le débat est encore largement ouvert.

L'ECD peut être vue comme une variante de la réaction de recombinaison dissociative (DR) des ions simplement chargés après neutralisation. La cinétique de la réaction est extrêmement rapide (10^{-15} - 10^{-16} s), et la dissociation intervient donc avant redistribution de l'énergie en excès soit par IVR (10^{-12} - 10^{-13} s), soit par émission radiative (10^{-9} s). Dès lors, il est a priori possible d'obtenir des informations sur la structure initiale du peptide en analysant le spectre de fragmentation ECD. C'est dans cette optique que nous avons proposé d'utiliser la technique ECD sur les peptides que nous avons préalablement étudiés par mobilité ionique et spectroscopie IR.

5.2 Principe

5.2.1 Section efficace de capture électronique

En ECD, la capture d'un électron par un peptide multi-protoné crée une espèce cationique à charge réduite contenant un hydrogène surnuméraire. L'efficacité de capture électronique dépend de l'énergie cinétique des électrons et de la charge de l'ion parent.



Zubarev et al. ont montré que la section efficace de capture électronique σ dépend de l'énergie incidente de l'électron.³⁶ σ est maximale ($\sim 10^{-14}$ cm²) pour des électrons d'énergie quasi nulle (< 0.1 eV) et chute de trois ordres de grandeur pour une énergie cinétique des électrons de 1 eV. Pour les peptides multichargés ne contenant pas de pont disulfure, l'ECD à basse énergie produit quasi exclusivement des fragments de type c/z qui correspondent à la rupture de la liaison N-C α de la chaîne peptidique. Le taux de fragmentation présente un second maxima pour des énergies d'électron entre 4 et 10 eV, gamme dans laquelle la capture

électronique peut induire une excitation vibrationnelle et électronique de l'ion (HECD).³⁷ La section efficace de capture électronique dépend aussi de l'état de charge de l'ion parent suivant une loi en n^2 , où n est la charge.³⁶ Dans nos applications, nous avons exclusivement travaillé avec des électrons d'énergie faible (de l'ordre de l'eV) et sur des peptides doublement et triplement protonés, donc dans des conditions de capture électronique relativement similaires afin de pouvoir analyser les spectres de fragmentation en terme de structures adoptées par les peptides.

5.2.2 Energétique associée à la capture électronique

L'énergétique de la réaction de capture électronique peut être déduite d'un cycle thermochimique simple, où RE est l'énergie de recombinaison ion-électron, $PI(H)$ est le potentiel d'ionisation de l'hydrogène, et AP et AH sont respectivement l'affinité protonique et l'affinité d'un atome d'hydrogène de l'espèce protonée n moins une fois³⁸:

$$RE(n^+) = PI(H) + AH [(M + (n-1)H)^{(n-1)+}] - AP [(M + (n-1)H)^{(n-1)+}]$$

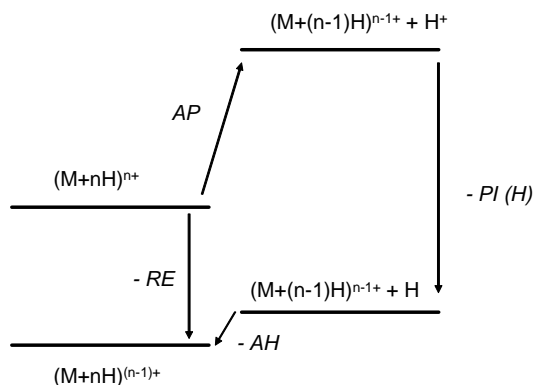


Figure 12: Cycle thermochimique donnant l'exothermicité (RE) de la capture électronique d'un peptide n fois multichargé en fonction de l'affinité protonique (AP) et l'affinité d'un atome d'hydrogène (AH) de l'espèce chargée $n-1$ fois.

On constate que l'exothermicité de la réaction (RE) dépend principalement de l'affinité protonique du peptide et peut être approximée par $RE \approx 14.2 - AP$ (eV), le potentiel d'ionisation de l'hydrogène étant de 13.6 eV et l'affinité d'un atome hydrogène de l'oxygène amide étant de l'ordre de 0.6 eV (figure 12).³⁹ Cette relation est une estimation peu précise, puisque les affinités protoniques des différents groupements d'un peptide ne sont pas connues

précisément. Plus l'affinité protonique d'un groupement est faible, plus grande est l'énergie de recombinaison associée à la capture électronique. Les affinités protoniques standards des acides aminés sont de l'ordre de 9 ± 1 eV, suivant la basicité du résidu. Les affinités protoniques dépendent aussi des interactions locales et de la taille du peptide. L'engagement par liaison hydrogène d'un groupement protoné ou les interactions charge-dipole⁴⁰ augmentent son affinité protonique et abaissent donc RE.

5.3 Nomenclature des fragments

Roepstorff *et al.*⁴¹ ont introduit une nomenclature standard de fragmentation de peptides chargés (figure 13) suivant la rupture des différentes liaisons chimiques le long de la chaîne peptidique. Lorsque la charge est localisée sur la partie N terminale, on note les fragments a_m , b_m et c_m , qui correspondent aux ruptures respectives des liaisons C_α -C, C-N et N- C_α entre les acides aminés m et $m+1$ de la séquence peptidique. Si la charge est localisée sur la partie C terminale, on obtient les fragments complémentaires x_k , y_k et z_k , avec $m+k=n$, n étant le nombre total d'acides aminés. D'une manière générale, un chauffage lent des peptides, comme dans les collisions à basse énergie et en IRMPD, se traduit par la formation d'ions fragments b/y . A l'inverse, les excitations électroniques, telles que les collisions à haute énergie, excitation laser UV et capture électronique, engendrent des fragments spécifiques c/z ou des ruptures des chaînes latérales, comme par exemple une rupture C_α - C_β au niveau d'un résidu aromatique (Phe, Tyr, Trp) après excitation UV.⁴²

Dans nos études, nous avons utilisé la technique ECD pour essayer d'interpréter les spectres de fragmentation, et en particulier la distribution des fragments c/z le long de la chaîne peptidique, en fonction de la structure secondaire initiale du peptide. Comme nous le développerons plus loin dans ce manuscrit, nous cherchons à montrer que les ruptures des liaisons N- C_α peuvent être corrélées à la présence d'une interaction privilégiée entre le carbonyle adjacent (du côté N terminal) avec un groupement ammonium ayant une forte probabilité de capture électronique. Nous avons décidé de changer la nomenclature standard : une rupture de liaison N- C_α entre les résidus i et $i+1$ produit des ions c_i/z_i suivant que la charge finale est portée respectivement du côté N terminal ou C terminal. Ceci nous permet de présenter sous forme d'histogramme les spectres de fragmentation ECD suivant la distribution d'intensité des fragments c_i/z_i le long de la séquence peptidique.

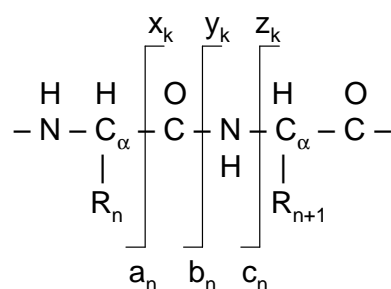


Figure 13: Nomenclature de fragmentation ECD. Les fragments c et z sont majoritaires.

5.4 Mécanismes de fragmentation

Plusieurs mécanismes ont été proposés depuis une dizaine d'année pour expliquer la formation de fragments spécifiques, entre autre c/z, après capture électronique par des peptides multichargés. Les groupes de J. Simons⁴³ et F. Turecek⁴⁴ ont récemment revu les différents modèles de manière critique. Le débat n'est pas clos, et il n'est pas question dans cette thèse de trancher entre les différents processus réactionnels invoqués. Nous ne présentons ici que les processus invoqués pour expliquer la rupture de la liaison N-C_α, puisque nous n'avons pas étudié de systèmes avec des ponts disulfures qui ont aussi une forte tendance à se dissocier en ECD. Nous allons présenter les deux grands mécanismes, celui de Cornell et celui d'Utah-Washington, et montrer que les deux sont compatibles avec notre approche.

5.4.1 Le mécanisme de Cornell :

Les premières expériences ECD ont été réalisées dans le groupe de Mc Lafferty à Cornell. Une série d'interprétations a été donnée pour expliquer l'abondance des fragments c/z observés, principalement basées sur une réaction exothermique de l'ordre de 4 eV^{45,46} de capture électronique d'un groupement chargé, produisant une espèce hypervalente instable de type C-NH₃. Ce centre radicalaire peut alors se désexciter par rupture de la liaison C-N ou perte d'un hydrogène. L'atome d'hydrogène « chaud » peut se recombinaer avec un oxygène carbonyle d'une liaison peptidique (Figure 14). Il paraît néanmoins peu probable que le transfert d'hydrogène vers le carbonyle puisse être efficace si les deux groupements ne sont pas déjà en interaction. L'espèce radicalaire (-[•]COH-NH-C_α) ainsi formée se réarrange en cassant la liaison N-C_α et en formant une double liaison C=N.⁴⁷

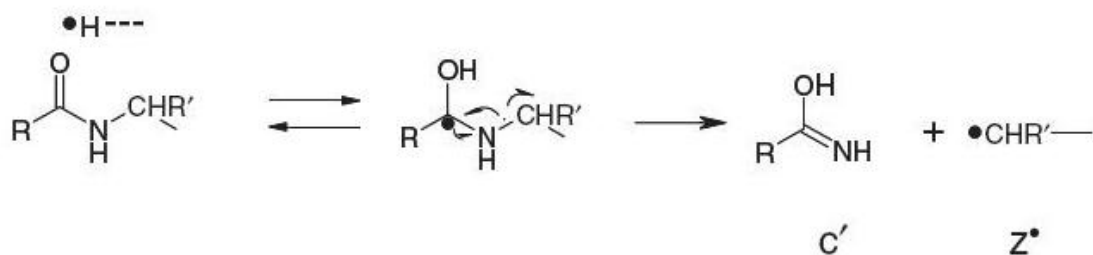


Figure 14: Mécanisme de Cornell de l'hydrogène « chaud »

La section efficace de capture électronique par un groupement ammonium (N terminal, Lysine) ou guanidine (Arginine) étant très grande, ce mécanisme de capture électronique sur un site chargé puis transfert d'hydrogène a semblé être justifié. Néanmoins, plusieurs études (expérimentales et théoriques) ont suggéré que la deuxième étape (celle du transfert d'hydrogène) était peu probable. Demirev a montré que des atomes d'hydrogène d'énergie cinétique inférieure à 1 eV ne s'attachaient pas ou ne fragmentaient pas un peptide,⁴⁸ alors que l'énergie cinétique d'un atome d'hydrogène éjecté d'un radical NH_4 a été mesurée par Porter et al. à 0.2 eV.⁴⁹ Plus récemment, des dynamiques Born-Oppenheimer ont confirmé que la probabilité de capture d'un atome d'hydrogène sur une amide suivie de la rupture de la liaison N-C_α était très faible (3%) par rapport à l'éjection directe de l'hydrogène.⁵⁰ Turecek et al. ont finalement reformulé le mécanisme de Cornell en proposant une réaction concertée de transfert électron-proton entre le groupement ammonium et un groupe amide en interaction.⁵¹ Ce mécanisme implique donc que la rupture de la liaison N-C_α est corrélée à la présence d'une interaction forte entre le groupement ammonium capturant l'électron et le groupement carbonyle adjacent à la liaison N-C_α (Figure 15).

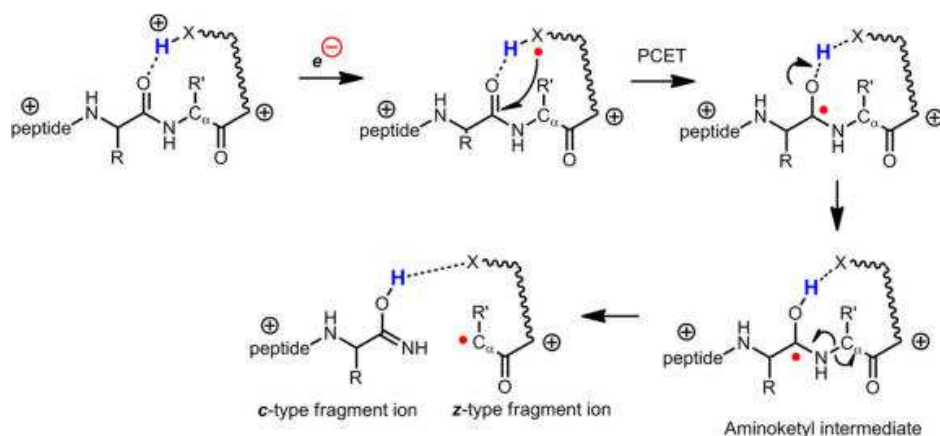


Figure 15: Mécanisme de Cornell révisé : un transfert concerté d'électron/proton (PCET) entre l'ammonium en interaction avec un carbonyle (Figure tirée de⁴⁴).

5.4.2 Le mécanisme Utah-Washington:

Une série d'expérience sur des peptides multichargés non protonés dans le groupe de A.G. Marshall⁵², ou contenant des arginines⁵³ ou des histidines⁵⁴ qui ne sont pas de bons candidats pour transférer un hydrogène, ont mis en défaut le modèle de Cornell. Même en l'absence de groupements ammonium, les auteurs ont observé une distribution de fragments c/z par ECD. Les groupes de J. Simons⁵⁵ (Université d'Utah) et F. Turecek⁵⁶ (Université de Washington) ont indépendamment proposé un autre modèle basé sur la capture de l'électron sur une orbitale anti liante π_{co}^* des carbonyles. Dans le modèle de Washington, la formation des ions c/z suit le même mécanisme que celui introduit dans le modèle de Cornell. Dans le modèle d'Utah, la rupture de la liaison N-C α intervient avant le transfert de proton du groupement protoné, le complexe intermédiaire se réarrange au cours de la dissociation pour former les fragments c/z (Figure16).

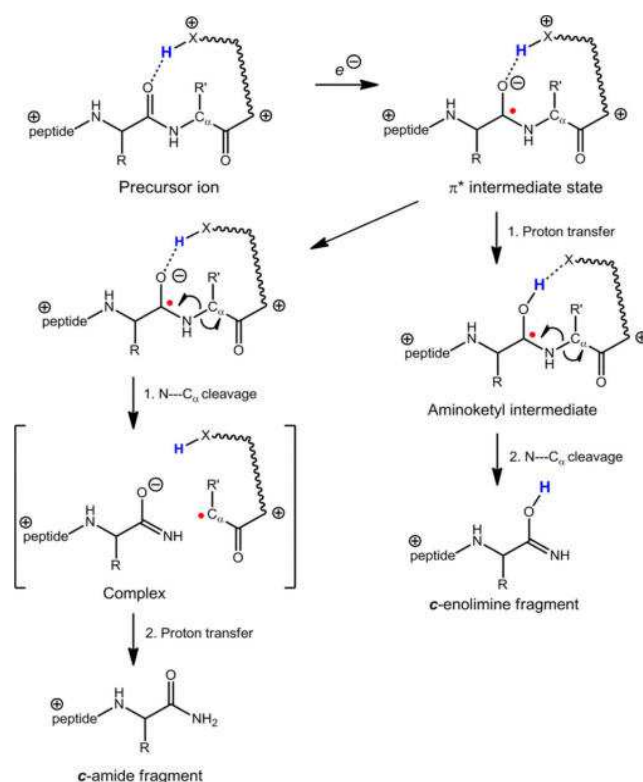


Figure 16: Mécanisme d'Utah-Washington. (Figure tirée de ⁴⁴)

L'attachement électronique sur une orbitale π_{co}^* est endothermique (de l'ordre de 2.5 eV) et ne peut donc pas se produire tel quel. Par contre, en présence d'une charge positive à

proximité du groupement amide, l'énergie de la paire ionique est stabilisée par le potentiel de Coulomb qui peut s'exprimer par $C = -14.4/R$ (eV), où R est la distance entre les deux charges.⁵⁵ Il faut donc que le groupement positif soit à moins de 6 Å pour que l'attachement électronique soit énergétiquement possible. De plus, Simons a montré que l'attachement électronique était beaucoup plus probable (90-99%) sur des orbitales de Rydberg (fondamentale 3s ou excitées) du groupement positif que directement sur l'orbitale π_{co}^* . Pour expliquer la formation des ions c/z sans introduire de transfert d'hydrogène, il faut donc supposer que le transfert de charge vers l'orbitale π_{co}^* soit plus rapide que la cascade non radiative vers l'orbitale de Rydberg 3s (estimé à 10^{-6} s)⁵⁷ à partir de laquelle la perte d'ammoniac ou d'hydrogène a lieu.

5.5 Corrélation entre structures des peptides et distributions d'intensité des fragments c/z

Dans les trois modèles, il faut donc la présence d'un groupement chargé positivement à proximité de l'amide pour que l'attachement électronique soit possible et ainsi induire la fragmentation spécifique c/z. De plus, la section efficace de capture électronique est deux ordres de grandeur plus grande sur le groupement protoné que directement sur le groupement amide. Dans les systèmes que nous avons étudiés (amyloïde, tryptophane zipper), les sites de protonation les plus favorables sont sur les résidus lysines et en N terminal. Ces peptides possèdent donc tous des groupements ammonium ayant une grande section efficace de capture électronique. Nous avons donc choisi de corréler les interactions spécifiques des groupements ammonium avec les CO carbonyles le long de la chaîne peptidique avec la distribution d'intensité des fragments c/z observés en ECD. Ceci nous donne un critère structural supplémentaire pour déterminer les conformations adoptées par les peptides, en complément des résultats tirés des expériences de mobilité ionique et de spectroscopie IRMPD.

5.6 Montage expérimental

L'expérience ECD est effectuée en collaborant avec le groupe de Guillaume Van der Rest à l'école Polytechnique – Palaiseau. L'expérience est composée d'une source nanospray, d'optiques électrostatique de transfert des ions et d'un spectromètre de masse FT-ICR (7-T

APEX III Bruker). Les ions sont tout d'abord transmis dans un quadripôle et piégés pendant 2 s dans un hexapôle, avant le transfert dans la cellule ICR. Une cathode chaude (1.5 A) est utilisée pour générer le faisceau d'électron qui est focalisée dans la cellule ICR (Figure 17). Pour nos expériences, l'énergie cinétique des électrons est ajustée suivant l'intensité du signal de fragment et varie entre 0.7 et 1.5 eV. Le temps d'irradiation est fixé à 80 ms et 100 spectres de masse sont acquis sur une plage de 300-2000 m/z (10^6 points par spectre de masse).

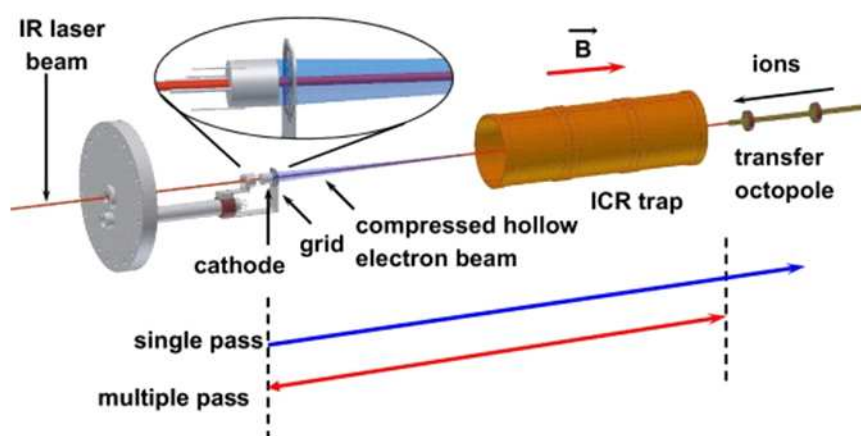


Figure 17: schéma du faisceau d'électron et de la cellule ICR pour les expériences ECD.

Par rapport aux expériences réalisées en mobilité et IRMPD, la concentration des solutions utilisées pour l'ESI sont beaucoup plus faibles, de l'ordre du μM . Ceci est dû à l'extrême sensibilité de la détection par FT-ICR que je vais décrire ci-dessous.

5.6.1 FT-ICR

Le spectromètre de masse à résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR) est composé d'une cellule ionique soumise à un fort champ magnétique constant afin de confiner les ions, à une pression résiduelle basse de l'ordre de 10^{-10} mbar. Un champ magnétique élevé est créé par un aimant supraconducteur de 7 Tesla. Les spectromètres de masse FT-ICR ont une résolution en masse très grande ($> 100\,000$) et sont généralement utilisés pour des applications en chimie analytique.

Son principe de fonctionnement est le suivant. Une particule chargée sous un champ magnétique uniforme B (généralisé par une bobine supraconductrice) subit la force de Lorentz :

$$\vec{F} = q\vec{v} \wedge \vec{B}$$

Si on considère que le champ magnétique B est suivant l'axe z , la force de Lorentz fait subir à l'ion au mouvement circulaire dans le plan perpendiculaire xy (Figure 18). C'est le mouvement cyclotronique d'une charge q de masse m dans un champ magnétique B avec une période angulaire ω qui ne dépend que du rapport m/z des ions et est indépendante de la vitesse initiale des ions. La détermination des fréquences cyclotroniques permet de déterminer les masses présentes dans la cellule ICR.

$$\omega = \frac{qB}{m}$$

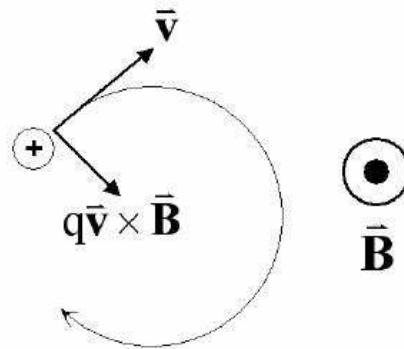


Figure 18: Mouvement d'un ion dans un champ magnétique

Le champ magnétique seul ne permet pas de piéger les ions dans la direction z . Pour utiliser une cellule ICR comme piège à ion, il faut donc appliquer une tension continue sur les électrodes d'entrée et de sortie qui sont perpendiculaires à l'axe du champ magnétique. Après le piégeage, le mouvement des ions est incohérent car ils sont piégés à des temps différents et peuvent avoir des énergies cinétiques différentes. Pour rendre la détection possible, il faut passer par une séquence d'excitation-détection. Les ions piégés dans la cellule sont excités par une pulse radiofréquence (à la fréquence cyclotronique résonnante de l'ion) via des plaques d'excitation qui ferment la boîte ICR (Figure 19). Cette excitation conduit à une mise en phase du mouvement des ions dans la cellule qui oscille alors sur une même orbite, au plus proche des plaques de détection. Le mouvement des ions excités induit un courant dans les plaques de détection. Le signal enregistré est l'évolution en temps du courant induit. Il se

caractérisé par une sinusoïde exponentielle amortie (Figure 20). La sinusoïde reflète le mouvement circulaire des ions qui s'approchent et s'éloignent périodiquement des plaques de détection. L'amortissement est une conséquence de la perturbation de la trajectoire des ions dans la cellule par des collisions successives avec le gaz résiduel.

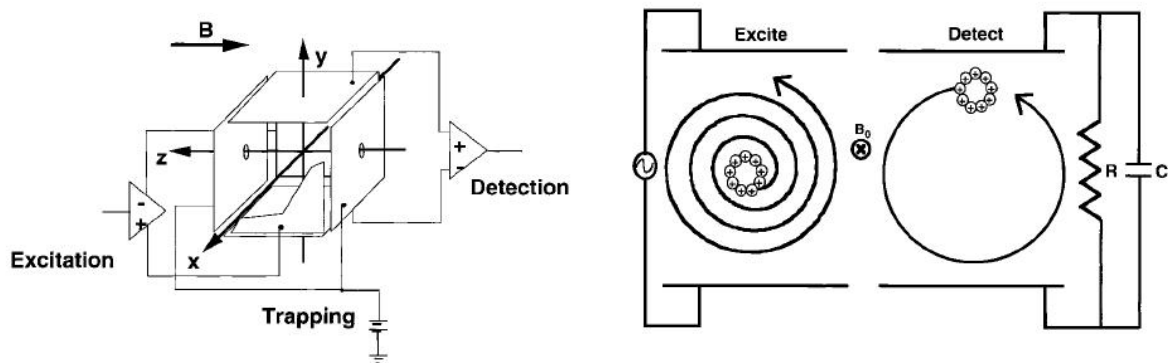


Figure 19: cellule ICR cubique et mouvement incohérent d'un nuage d'ion convertit en mouvement cohérent après excitation.⁵⁸

Deux paramètres sont importants pour l'acquisition du spectre de masse : l'intensité d'excitation (de l'ordre de 300V) et la durée d'irradiation (de l'ordre de 60 μ s). Le signal obtenu dans le domaine temporel est converti en signal dans le domaine des fréquences par une transformation de Fourier.

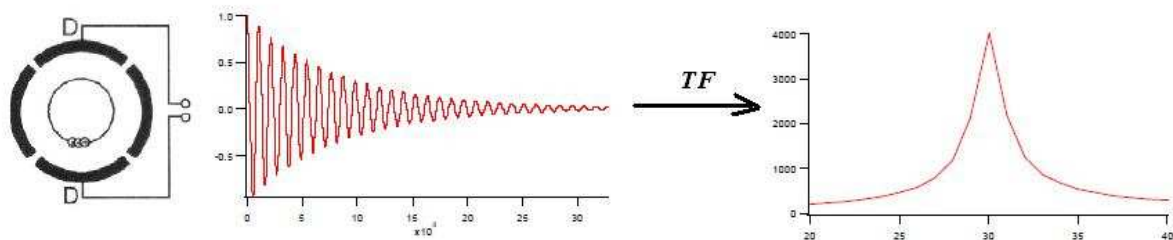


Figure 20: Signal sinusoïdal amorti exponentiellement et le résultat après transformation de Fourier

L'intervalle entre deux fréquences dépend du nombre de points mesurés et de la durée du signal mesuré. Cette durée est limitée par l'amortissement du signal lié aux collisions ion-neutre. La qualité du vide est donc un paramètre crucial pour obtenir une bonne résolution. En pratique, dans un appareil avec un bon vide 10^{-10} mbar, pour $m/z = 1000$, on peut atteindre des résolutions supérieures à 400 000.

5.7 Post-excitation par chauffage laser CO₂ et technique SORI-CID

L'une des questions qui s'est posée lors de l'analyse des spectres de fragmentation par ECD est de savoir si la capture électronique entraîne forcément la fragmentation du peptide (processus de recombinaison dissociative). Dans les spectres ECD des peptides doublements protonés, des ions à la masse de l'espèce réduite MH_2^{+} sont détectés. La présence de ces ions peut être reliée à deux phénomènes : soit il n'y a pas de recombinaison dissociative de l'espèce radicalaire formée après capture, soit les fragments ioniques c/z issus de la rupture de la liaison C_α-N sont piégés dans un complexe métastable ion-neutre dès lors que l'énergie cinétique des fragments est plus faible que l'énergie de liaison du complexe. Dans le deuxième cas, une excitation vibrationnelle contrôlée pourrait induire la dissociation du complexe et révéler certaines ruptures de liaison C_α-N.

Des études sur la dynamique de repliement des protéines ont été réalisées dans le groupe de F. McLafferty en utilisant un chauffage par laser CO₂ avant la séquence ECD.^{59,60} Le groupe de P. O'Connor^{61,62} a étudié les effets d'un chauffage IR par laser CO₂ avant et après l'excitation électronique ECD. Dans le cas d'une post-excitation par le laser CO₂, un changement de la distribution d'intensité des ions c/z peut être interprété comme la signature de la formation d'un complexe intermédiaire ion-molécule qui empêche la dissociation du peptide. Les quelques exemples rapportés (fibronopeptide B, substance P) montrent que peu de changements sont observés dans les spectres de fragmentation avec la détection d'un ou deux fragments supplémentaires. Néanmoins, dans ces expériences, l'ion réduit MH_2^{+} n'est pas sélectionné en masse avant la post excitation.

Quand l'excitation IR a lieu avant la séquence ECD, des changements plus importants sont observés. Les auteurs en ont déduit que le chauffage pré-ECD augmentait l'hétérogénéité conformationnelle des peptides, diminuait les interactions intramoléculaires qui favorisent l'émergence de structures secondaires, ce qui conduit à une distribution d'ion c/z couvrant quasiment toute la longueur de la chaîne peptidique dès lors que les sites basiques peuvent être en interaction avec un plus grand nombre de site de solvation (par les carbonyles par exemple). Ce dernier résultat peut être aussi interprété comme le signe que l'analyse de la distribution des fragments c/z peut être corrélée aux conformations adoptées par le peptide.

Nous avons donc réalisé une série d'expériences sur le montage expérimental du groupe de Ph. Maitre au LCP afin d'exciter les ions dans la cellule ICR après capture électronique. Nous n'avons pas choisi d'effectuer une pré-excitation avant l'ECD, car il nous semble alors très compliqué de pouvoir remonter à des informations structurales dès lors que l'on ne connaît ni la structure de départ (ce que l'on cherche), ni les structures adoptées par les peptides après chauffage. Pratiquement, après la séquence ECD, on isole l'ion à la masse du réduit, puis on effectue une post-excitation de cet ion, soit par irradiation avec un laser CO₂ continu, soit par la technique SORI-CAD. La technique SORI (Sustained off-resonance irradiation) consiste à exciter sélectivement dans une cellule ICR un ion de masse donnée et induire ainsi sa dissociation par collision (CAD) avec un gaz tampon (He). Cette technique est a priori plus efficace car « universelle », elle ne nécessite pas de condition de résonance du laser CO₂. Dans tous les cas, nous n'avons pas observé de différence entre les deux techniques de post-excitation (si effet il y a) et nous présenterons les résultats obtenus par l'excitation laser CO₂.

Le groupe de Ph. Maitre du LCP (Orsay) a appliqué cette technique de post-excitation CO₂ dans des expériences de photodissociation IR à 1 photon (laser OPO 10 Hz dans la région 3 μm).⁶³ L'apport du laser CO₂ est indispensable pour induire la fragmentation des molécules (l'absorption d'un ou deux photons de l'OPO IR n'apporte pas assez d'énergie au système pour fragmenter). L'équipe de T. Rizzo à l'EPFL (Lausanne) a montré que le taux de fragmentation induit par excitation UV d'un décapeptide était augmenté de deux ordres de grandeur avec la post-excitation CO₂.⁶⁴ Dans ce cas, on peut penser que l'excitation post-UV permet de dissocier des complexes métastables faiblement liés qui ne se dissocieraient pas avant détection.

Dans le cas de l'irradiation par laser CO₂, il faut que la longueur d'onde d'excitation (autour de 10 μm) soit résonnante avec des modes vibrationnels du peptide. Les peptides présentent généralement un pseudo-continuum d'absorption dans cette région dense en modes de vibrations, mais la force d'oscillateur des modes n'est pas toujours très grande. C'est pour cela qu'il faut irradier les ions en continu avec une forte puissance (3 Watts) pendant 30 ms pour espérer les fragmenter.

Références

1. Fenn, J. B. Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture). *Angewandte Chemie-International Edition* **42**, 3871-3894 (2003).
2. Kebarle, P. & Ho, Y. *Electrospray Ionization Mass Spectrometry* (ed. Cole, R. B.) (Wiley Interscience, New York, 1997).
3. Gaskell, S. J. Electrospray: Principles and practice. *Journal of Mass Spectrometry* **32**, 677-688 (1997).
4. Rohner, T. C., Lion, N. & Girault, H. H. Electrochemical and theoretical aspects of electrospray ionisation. *Physical Chemistry Chemical Physics* **6**, 3056-3068 (2004).
5. Konermann, L., Ahadi, E., Rodriguez, A. D. & Vahidi, S. Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization. *Analytical Chemistry* **85**, 2-9 (2013).
6. Dole, M., Mack, L. L. & Hines, R. L. Molecular Beams of Macroions. *Journal of Chemical Physics* **49**, 2240 (1968).
7. Iribarne, J. V. & Thomson, B. A. Evaporation of Small Ions from Charged Droplets. *Journal of Chemical Physics* **64**, 2287-2294 (1976).
8. Thomson, B. A. & Iribarne, J. V. Field-Induced Ion Evaporation from Liquid Surfaces at Atmospheric-Pressure. *Journal of Chemical Physics* **71**, 4451-4463 (1979).
9. Kebarle, P. & Tang, L. From Ions in Solution to Ions in the Gas-Phase - the Mechanism of Electrospray Mass-Spectrometry. *Analytical Chemistry* **65**, A972-A986 (1993).
10. Cole, R. B. Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **35**, 763-772 (2000).
11. Chin, W., PiuZZi, F., Dimicoli, I. & Mons, M. Probing the competition between secondary structures and local preferences in gas phase isolated peptide backbones. *Physical Chemistry Chemical Physics* **8**, 1033-1048 (2006).
12. Gerhards, M., Unterberg, C., Gerlach, A. & Jansen, A. beta-sheet model systems in the gas phase: Structures and vibrations of Ac-Phe-NHMe and its dimer (Ac-Phe-NHMe)₂. *Physical Chemistry Chemical Physics* **6**, 2682-2690 (2004).
13. Brenner, V., PiuZZi, F., Dimicoli, I., Tardivel, B. & Mons, M. Spectroscopic evidence for the formation of helical structures in gas-phase short peptide chains. *Journal of Physical Chemistry A* **111**, 7347-7354 (2007).
14. Chin, W. et al. Intrinsic folding of small peptide chains: Spectroscopic evidence for the formation of beta-turns in the gas phase. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 707-712 (2005).
15. Stearns, J. A. et al. Conformation-specific Spectroscopy and photodissociation of cold, protonated tyrosine and phenylalanine. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 11814-11820 (2007).
16. Stearns, J. A., Boyarkin, O. V. & Rizzo, T. R. Spectroscopic signatures of gas-phase helices: Ac-Phe-(Ala)₅-Lys-H⁺ and Ac-Phe-(Ala)₁₀-Lys-H⁺. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 13820-+ (2007).
17. Stearns, J. A., Seaiby, C., Boyarkin, O. V. & Rizzo, T. R. Spectroscopy and conformational preferences of gas-phase helices. *Physical Chemistry Chemical Physics* **11**, 125-132 (2009).
18. de Vries, M. S. & Hobza, P. Gas-phase spectroscopy of biomolecular building blocks. *Annual Review of Physical Chemistry* **58**, 585-612 (2007).
19. Gregoire, G. et al. Resonant infrared multiphoton dissociation spectroscopy of gas-phase protonated peptides. Experiments and Car-Parrinello dynamics at 300 K. *Physical Chemistry Chemical Physics* **9**, 3082-3097 (2007).

20. Oomens, J. et al. Charge-state resolved mid-infrared spectroscopy of a gas-phase protein. *Physical Chemistry Chemical Physics* **7**, 1345-1348 (2005).
21. Gabelica, V. et al. Infrared signature of DNA G-quadruplexes in the gas phase. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 1810-+ (2008).
22. Lifshitz, C. *IVR and Ergodicity of Dissociation of Bio-Molecules* (eds. Lifshitz, C. & Laskin, J.) (Wiley, 2006).
23. Mac Aleese, L. et al. Mid-IR spectroscopy of protonated leucine methyl ester performed with an FTICR or a Paul type ion-trap. *International Journal of Mass Spectrometry* **249**, 14-20 (2006).
24. Wu, C., Siems, W. F., Klasmeier, J. & Hill, H. H. Separation of isomeric peptides using electrospray ionization/high-resolution ion mobility spectrometry. *Analytical Chemistry* **72**, 391-395 (2000).
25. Dugourd, P., Hudgins, R. R., Clemmer, D. E. & Jarrold, M. F. High-resolution ion mobility measurements. *Review of Scientific Instruments* **68**, 1122-1129 (1997).
26. Dwivedi, P. et al. Gas-phase chiral separations by ion mobility spectrometry. *Analytical Chemistry* **78**, 8200-8206 (2006).
27. Clemmer, D. E., Hudgins, R. R. & Jarrold, M. F. Naked Protein Conformations - Cytochrome-C in the Gas-Phase. *Journal of the American Chemical Society* **117**, 10141-10142 (1995).
28. Lee, S., Wyttenbach, T. & Bowers, M. T. Gas phase structures of sodiated oligosaccharides by ion mobility ion chromatography methods. *International Journal of Mass Spectrometry* **167**, 605-614 (1997).
29. McLean, J. A., Ruotolo, B. T., Gillig, K. J. & Russell, D. H. Ion mobility-mass spectrometry: a new paradigm for proteomics. *International Journal of Mass Spectrometry* **240**, 301-315 (2005).
30. Rosu, F., De Pauw, E. & Gabelica, V. Electrospray mass spectrometry to study drug-nucleic acids interactions. *Biochimie* **90**, 1074-1087 (2008).
31. Mesleh, M. F., Hunter, J. M., Shvartsburg, A. A., Schatz, G. C. & Jarrold, M. F. Structural information from ion mobility measurements: Effects of the long-range potential. *Journal of Physical Chemistry* **100**, 16082-16086 (1996).
32. Mason, E. A. *Transport Properties of Ions in Gases* (Wiley, New York, 1998).
33. Julian, R. R., Mabbett, S. R. & Jarrold, M. F. Ion funnels for the masses: Experiments and simulations with a simplified ion funnel. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **16**, 1708-1712 (2005).
34. Shaffer, S. A., Prior, D. C., Anderson, G. A., Udseth, H. R. & Smith, R. D. An ion funnel interface for improved ion focusing and sensitivity using electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **70**, 4111-4119 (1998).
35. Guan, Z. Q. et al. 193 nm photodissociation of larger multiply-charged biomolecules. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **157**, 357-364 (1996).
36. Zubarev, R. A. et al. Electron capture dissociation for structural characterization of multiply charged protein cations. *Analytical Chemistry* **72**, 563-573 (2000).
37. Kjeldsen, F., Haselmann, K. F., Budnik, B. A., Jensen, F. & Zubarev, R. A. Dissociative capture of hot (3-13 eV) electrons by polypeptide polycations: an efficient process accompanied by secondary fragmentation. *Chemical Physics Letters* **356**, 201-206 (2002).
38. Zubarev, R. A. Reactions of polypeptide ions with electrons in the gas phase. *Mass Spectrometry Reviews* **22**, 57-77 (2003).
39. Zubarev, R. A. *Electron capture dissociation of peptides* (eds. Silberring, J. & Ekman, R.) (John Wiley & Sons, New-York, 2002).

40. Turecek, F. et al. Hidden Histidine Radical Rearrangements upon Electron Transfer to Gas-Phase Peptide Ions. Experimental Evidence and Theoretical Analysis. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 14584-14596 (2008).
41. Roepstorff, P. & Fohlman, J. Proposal for a Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass-Spectra of Peptides. *Biomedical Mass Spectrometry* **11**, 601-601 (1984).
42. Gregoire, G. et al. UV photoinduced dynamics in protonated aromatic amino acid. *European Physical Journal D* **51**, 109-116 (2009).
43. Simons, J. Mechanisms for S-S and N-C-alpha bond cleavage in peptide ECD and ETD mass spectrometry. *Chemical Physics Letters* **484**, 81-95 (2010).
44. Turecek, F. & Julian, R. R. Peptide Radicals and Cation Radicals in the Gas Phase. *Chemical Reviews* **113**, 6691-6733 (2013).
45. Chamot-Rooke, J., Malosse, C., Frison, G. & Turecek, F. Electron capture in charge-tagged peptides. Evidence for the role of excited electronic states. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **18**, 2146-2161 (2007).
46. Holm, A. I. S. et al. Electron capture, femtosecond electron transfer and theory: A study of noncovalent crown ether 1,n-diammonium alkane complexes. *International Journal of Mass Spectrometry* **276**, 116-126 (2008).
47. Zubarev, R. A., Haselmann, K. F., Budnik, B., Kjeldsen, F. & Jensen, F. Towards an understanding of the mechanism of electron-capture dissociation: a historical perspective and modern ideas. *European Journal of Mass Spectrometry* **8**, 337-349 (2002).
48. Demirev, P. A. Generation of hydrogen radicals for reactivity studies in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **14**, 777-781 (2000).
49. Gellene, G. I. & Porter, R. F. An Experimental-Study of Hypervalent Molecular Clusters by Neutralized Ion-Beam Spectroscopy - $\text{Nh}_4(\text{Nh}_3)_1, \text{Nh}_4(\text{Nh}_3)_2, \text{Nh}_4(\text{Nh}_3)_3$ and $\text{Nd}_4(\text{Nd}_3)_1, \text{Nd}_4(\text{Nd}_3)_2, \text{Nd}_4(\text{Nd}_3)_3$. *Journal of Physical Chemistry* **88**, 6680-6684 (1984).
50. Bakken, V., Helgaker, T. & Uggerud, E. Models of fragmentations induced by electron attachment to protonated peptides. *European Journal of Mass Spectrometry* **10**, 625-638 (2004).
51. Turecek, F. & Syrstad, E. A. Mechanism and energetics of intramolecular hydrogen transfer in amide and peptide radicals and cation-radicals. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 3353-3369 (2003).
52. Hudgins, R. R., Hakansson, K., Quinn, J. P., Hendrickson, C. & Marshall, A. G. *ASMS Conference* (2002).
53. Chen, X. H. & Turecek, F. The arginine anomaly: Arginine radicals are poor hydrogen atom donors in electron transfer induced dissociations. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 12520-12530 (2006).
54. Turecek, F. et al. Carboxyl-Catalyzed Prototropic Rearrangements in Histidine Peptide Radicals upon Electron Transfer: Effects of Peptide Sequence and Conformation. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 16472-16487 (2009).
55. Sobczyk, M. et al. Coulomb-assisted dissociative electron attachment: Application to a model peptide. *Journal of Physical Chemistry A* **109**, 250-258 (2005).
56. Syrstad, E. A. & Turecek, F. Toward a general mechanism of electron capture dissociation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **16**, 208-224 (2005).
57. Syrstad, E. A. & Turecek, F. Hydrogen atom adducts to the amide bond. Generation and energetics of the amino(hydroxy)methyl radical in the gas phase. *Journal of Physical Chemistry A* **105**, 11144-11155 (2001).

58. Marshall, A. G., Hendrickson, C. L. & Jackson, G. S. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer. *Mass Spectrometry Reviews* **17**, 1-35 (1998).
59. Horn, D. M., Breuker, K., Frank, A. J. & McLafferty, F. W. Kinetic intermediates in the folding of gaseous protein ions characterized by electron capture dissociation mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society* **123**, 9792-9799 (2001).
60. Breuker, K., Oh, H. B., Horn, D. M., Cerda, B. A. & McLafferty, F. W. Detailed unfolding and folding of gaseous ubiquitin ions characterized by electron capture dissociation. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 6407-6420 (2002).
61. Lin, C., O'Connor, P. B. & Cournoyer, J. J. Use of a double resonance electron capture dissociation experiment to probe fragment intermediate lifetimes. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **17**, 1605-1615 (2006).
62. Lin, C., Cournoyer, J. J. & O'Connor, P. B. Probing the gas-phase folding kinetics of peptide ions by IR activated DR-ECD. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **19**, 780-789 (2008).
63. Sinha, R. K., Erlekam, U., Bythell, B. J., Paizs, B. & Maitre, P. Diagnosing the Protonation Site of b (2) Peptide Fragment Ions using IRMPD in the X-H (X = O, N, and C) Stretching Region. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **22**, 1645-1650 (2011).
64. Guidi, M., Lorenz, U. J., Papadopoulos, G., Boyarkin, O. V. & Rizzo, T. R. Spectroscopy of Protonated Peptides Assisted by Infrared Multiple Photon Excitation. *Journal of Physical Chemistry A* **113**, 797-799 (2009).

CHAPITRE II

Méthodes théoriques

CHAPITRE II

Méthodes théoriques

1. Méthodologie générale

La stratégie pour déterminer les structures secondaires de biomolécules est de trouver le meilleur accord entre les calculs issus de modélisations et les données expérimentales. Trois types d'expérience donnant des informations complémentaires pour déterminer les structures des peptides ont été réalisés pour cette thèse. Les mesures de mobilité ionique et de spectroscopie IRMPD nécessitent des traitements théoriques indépendants et différents. Ensuite, les résultats d'ECD ont été analysés sur des structures sélectionnées à partir des deux premières méthodes.

Etant donnée la taille des systèmes étudiés dans ma thèse, nous ne pouvons pas *a priori* connaître la structure adoptée en phase gazeuse. Dans certains cas, il existe des données structurales tirées des études en phase condensée, comme la cristallographie et la RMN, qui sont répertoriées sur le site de la Protein Data Bank (PDB) et qui peuvent servir de point de départ pour une recherche conformationnelle, ou de structures « modèles » que l'on cherche à attribuer. Néanmoins, les preuves indiscutables de conservation de la structure native en phase gazeuse sont rares (voire nulles) sur les peptides flexibles de tailles intermédiaires, trop grands pour être simulés avec des méthodes précises mais trop petits pour ne pas être affectés par la désolvation.

Il faut donc d'abord explorer d'une manière exhaustive la surface d'énergie potentielle des peptides étudiés afin de déterminer toutes les conformations possibles. Nous avons effectué des calculs de dynamique moléculaire par échange de réplique REMD au niveau Amber. Ce type de recherche génère plusieurs milliers de structures différentes qu'il faut ensuite classer et regrouper en familles de structures. On peut appliquer un critère énergétique pour ne garder que les structures de plus basses énergies. Pratiquement, nous n'utilisons pas ce critère car les énergies calculées au niveau de théorie utilisée pour la recherche conformationnelle ne sont pas assez fiables. Dans certains cas, nous avons néanmoins choisi d'exclure les structures ayant une énergie 40 kcal/mol plus haute que le minimum global, ce qui n'est pas vraiment discriminant.

Il faut ensuite classer les conformères en familles principales suivant des critères structuraux. Pratiquement, nous analysons des distances inter-atomiques, la formation de liaisons hydrogènes de type C₇, C₁₀, C₁₃, rarement des angles dièdres. Le but est de trouver les meilleurs paramètres qui permettent de regrouper le plus grand nombre de conformations dans un même groupe de structures similaires. Vu le nombre de conformations à traiter, ce travail est réellement fastidieux. Puis, les sections efficaces de diffusion de chaque groupe sont calculées et on sélectionne les familles compatibles avec une incertitude de $\pm 10\%$ par rapport à la mesure expérimentale de section efficace de diffusion. Pour chaque famille, une seule conformation représentative est ensuite optimisée au niveau AM1 puis éventuellement au niveau ONIOM B3LYP/(6-31g(d)) : AM1. En augmentant le niveau de traitement théorique, on s'attend à obtenir une meilleure description des interactions intramoléculaires qui stabilisent la structure du peptide et donc une structure calculée plus proche d'une structure réellement adoptée par le système. Jarrold *et al.*¹ ont montré que les calculs de sections efficaces de diffusion sur des fullerènes rigides (structures calculées sensées être exactes) étaient valables à 2% près. Par expérience, nous avons remarqué que, même si la structure globale d'une conformation des peptides étudiés ne changeait pas vraiment entre les différentes méthodes d'optimisation, la section efficace de diffusion calculée pouvait varier de 10%, ce qui est nettement plus grand que l'incertitude liée au calcul de section efficace. Le critère de sélection de $\pm 10\%$ est donc choisi plutôt pour exclure les groupes dont les sections efficaces de diffusion sont trop différentes de la valeur expérimentale que pour effectuer une réelle attribution à partir des optimisations en Amber. Nous verrons que pour les peptides amyloïdes et les tryptophane zippers, il est difficile de choisir à priori la méthode qui permet de retrouver des sections efficaces calculées compatibles avec la valeur expérimentale.

Pour les structures qui ont des sections efficaces calculées les plus proches de la valeur expérimentale, on calcule ensuite leurs spectres vibrationnels dans l'approximation harmonique à partir des structures optimisées en ONIOM que l'on compare au spectre IRMPD. D'une manière générale, nous nous attendons à avoir plusieurs conformations peuplées dans les conditions expérimentales (ions étudiés à température ambiante). On représente alors un spectre IR simulé moyenné sur plusieurs conformations.

L'interprétation des résultats des expériences ECD ne nécessite pas de nouveaux calculs. Comme il sera présenté dans cette thèse, l'analyse repose sur une corrélation entre la distribution d'intensité des fragments c/z observés avec l'inverse des distances des

groupements protonés et des carbonyles de la chaîne peptidique. Cette analyse nécessite donc de mesurer les distances N⁺- O sur toutes les conformations calculées. Nous utilisons le logiciel Maestro (Schrodinger Inc) pour visualiser et effectuer ce type de mesure. L'avantage est qu'il permet de mesurer les angles et les distances inter-atomiques pour toutes les conformations importées (plusieurs milliers !) en une seule fois et de les classer suivant les critères choisis.

Pour résumer, nous sommes amenés à utiliser plusieurs méthodes d'optimisation de structures à des niveaux de coûts de calculs et de précisions attendus différents. Ces méthodes vont d'un champ de force classique Amber, pour explorer la surface d'énergie potentielle du système, à la méthode de la fonctionnelle de la densité DFT pour simuler les spectres vibrationnels en passant par la méthode semi-empirique AM1.

2. Exploration de la surface d'énergie potentiel (PES)

Plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour explorer la surface de potentiel d'un système. L'un des critères essentiels est relié au nombre de degrés de liberté du système. Pour les molécules de petites tailles, telles que les acides aminés et les petits peptides, une recherche systématique par variation de tous les angles dièdres du système avec une méthode Monte-Carlo peut être envisagée car leur nombre reste limité et le nombre de conformations de plus basses énergies est faible. Par contre, cette approche n'est plus efficace pour les systèmes à grand nombre de degrés de liberté. Les angles dièdres des groupements de la chaîne peptidique sont importants à prendre en compte car ils sont impliqués dans l'émergence de structures secondaires spécifiques. Par contre, les chaînes latérales des résidus des acides aminés peuvent adopter plusieurs orientations pour une même structure secondaire. De plus, une variation systématique de ces angles va engendrer dans les systèmes de grandes tailles un nombre élevé de conformations présentant des encombrements stériques.

Nous avons choisi d'utiliser la méthode de dynamique moléculaire pour explorer la surface d'énergie potentielle des peptides de grandes tailles. La dynamique moléculaire repose sur la résolution des équations de Newton traitées en mécanique classique qui permet de simuler l'évolution temporelle du système et donc *a priori* d'explorer les différents bassins de la surface PES. Elle permet de décrire les propriétés thermodynamiques² et les

propriétés physiques du système, par exemple, le transport d'ions et le repliement des protéines.³ La problématique de la dynamique moléculaire est de calculer la position d'un atome i au moment $(t+\Delta t)$ en connaissant la position de l'atome au moment t et ceci pour tous les atomes de la molécule. Il faut calculer les forces qui s'exercent sur les atomes à partir du potentiel tiré d'un champ de force classique, et propager le mouvement des atomes à une température donnée sur de longs temps de simulation. Le problème principal vient justement des constantes de temps de repliement/dépliement des peptides de grandes tailles, qui sont le plus souvent bien plus grandes que les temps de simulations atteignables même en utilisant des champs de force classique. Des méthodes dites de « gros grains », dans lesquelles un groupement d'atomes est regroupé et modélisé simplement par une boule, permettent de traiter des systèmes de grandes tailles et sur de longs temps de dynamique.⁴⁻⁶ D'autres approches, telles que les métadynamiques⁷ ou les dynamiques à température fictive élevée⁸ ont été développées pour accélérer l'exploration de la surface d'énergie libre de systèmes complexes. En collaboration avec F. Calvo du LASIM, nous avons décidé d'utiliser la méthode de dynamique moléculaire par échange de réplique REMD qui a été introduite par Sugita *et al.*⁹ et que nous avons déjà utilisée pour l'étude structurale de la vancomycine et de son complexe avec son récepteur membranaire.^{10,11}

3. Dynamique moléculaire par échange de répliques (REMD)

Nous avons utilisé la méthode de dynamique moléculaire par échange de réplique REMD proposée par Y. Sugita et Y. Okamoto.^{9,12} Cette méthode a été utilisée avec succès pour prédire les conformations et explorer le paysage conformationnel de monomères et d'oligomères de peptides impliqués dans les maladies neurodégénératives telles que Alzheimer,^{13,14,15} Parkinson¹⁶ et le Prion.¹⁷ La méthode REMD a été également utilisée pour simuler la dynamique de repliement de polypeptides isolés ou solvatés^{18,19} et des complexes des peptides amyloïdes A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂ avec des atomes de zinc.²⁰

La dynamique REMD nous permet d'explorer la surface d'énergie potentielle (PES) des peptides contenant plus de 200 atomes, simultanément à plusieurs températures. Avec une dynamique moléculaire « classique » à 300 K, le système peut rester piégé dans des minima locaux, ce qui nécessite des temps de propagation très longs pour espérer sonder exhaustivement la surface PES. L'idée principale des simulations REMD est de propager simultanément plusieurs dynamiques (répliques) à des températures différentes. Chaque réplique évolue indépendamment par dynamique moléculaire mais les structures peuvent

s'échanger, ce qui permet de passer plus facilement les barrières d'énergie potentielle. Il faut appliquer un critère de Metropolis pour tester la probabilité d'échange : elle est égale à 1 si, pour $T_i > T_j$, l'énergie de la conformation de la structure à plus haute température E_i est plus basse que celle à plus basse température E_j . Sinon, la probabilité est égale à $\exp\left(-\frac{E_j - E_i}{k(T_j - T_i)}\right)$. Par contre, les températures ne s'échangent pas et les simulations

continuent à partir des conformations échangées ou non.

En pratique, on doit régler la série de paramètres suivant :

- T_1 (K) température minimale
- T_n (K) température maximale
- Durée du pas (fs)
- Nombre de pas
- Nombre de pas d'équilibration
- Période d'échantillonnage des structures
- Période d'essai d'échange entre réplique

Nous utilisons le code fortran écrit par F. Calvo qui utilise le champ de force Amber99 avec 30 répliques couvrant une gamme de température entre 100 et 1000K. Chaque trajectoire est propagée pendant 2 ns avec un pas de temps de 1 fs. Les 40 premières picosecondes servent de temps d'équilibration du système sans échange de répliques. La condition d'échange entre deux structures à deux températures adjacentes est testée toutes les 100 fs et l'on sauve les configurations des 30 répliques toutes les 40 ps. Le thermostat de Berendsen est utilisé pour maintenir les énergies cinétiques autour des valeurs souhaitées avec une constante de couplage de 1 ps^{-1} . A la fin de chaque simulation REMD, 1500 conformations générées sont optimisées en Amber et triées par énergie.

Un point important est de regrouper en familles de conformations les structures similaires. On utilise des critères structuraux simples (distances interatomiques), comme par exemple la distance entre les deux C_α des acides aminés en position N terminal et C terminal, les distances entre les groupements protonés et les groupes carbonyles du squelette peptidique, les liaisons hydrogènes entre les groupes amides accepteur ($C = O$) et donneur (N - H) qui déterminent la formation de coudes et d'hélices (type C_7 , C_{10} ou C_{13}). Les molécules placées dans un même groupe partage la même structure globale mais peuvent se différencier

par de petits changements d'orientation des chaînes latérales des acides aminés non engagés par liaisons hydrogènes (résidu aliphatique ou cycle aromatique). Ce regroupement est le point de départ pour l'analyse des structures possibles adoptées par les peptides que l'on cherche à déterminer par des méthodes de calculs plus précises que le champ de force.

4. Méthodes théoriques d'optimisation de structures

4.1 Les champs de forces

Les dynamiques REMD ont été effectuées en utilisant le champ de force Amber99. Dans la méthode champ de force, l'énergie potentielle interatomique s'exprime empiriquement. Les paramètres sont estimés à partir d'une série des données expérimentales et/ou obtenues par des calculs exacts des méthodes de chimie quantique et optimisées sur une structure connue. L'énergie potentielle est une somme de termes décrivant les interactions covalentes et non-covalentes :

$$E = E_{\text{liaison}} + E_{\text{angle}} + E_{\text{torsion}} + E_{\text{VDW}} + E_{\text{électrostatique}} + E_{\text{H}}$$

Où : E_{liaison} est l'énergie de liaison covalente entre les atomes, E_{angle} l'énergie associée aux angles formés par deux liaisons consécutives, E_{torsion} l'énergie associée aux angles de torsion, E_{VDW} est l'énergie des interactions non-covalentes de van der Waals, $E_{\text{électrostatique}}$ est l'énergie des interactions électrostatiques et E_{H} l'énergie des liaisons hydrogène.

Les champs de forces se différencient par le nombre et nature de chaque contribution et aussi la paramétrisation. Nous avons utilisé le champ de force Amber²¹⁻²³, mais il en existe un grand nombre (CHARMM, GROMOS96, OPLS-AA ; MMFF, MM, USFF, UFF...). L'avantage des méthodes de champ de forces est la simplicité, la rapidité de calcul et la très faible demande de mémoire et de puissance informatique. Cependant, la précision et la fiabilité du calcul de l'énergie potentielle en champ de force sont limitées. De plus, les potentiels harmoniques utilisés pour le calcul de l'énergie ne permettent pas, par définition, d'étudier de réaction chimique, en particulier dans notre cas des transferts de proton entre les différents sites basiques. Quand il existe une indétermination sur les sites de plus fortes affinités protoniques, il faut alors effectuer plusieurs simulations pour chaque isomère.

4.2 La méthode AM1

La méthode semi-empirique AM1 a été développée dans le groupe de M.J.S. Dewar,²⁴ où seules les intégrales électroniques à deux centres de l'équation d'Hartree-Fock sont calculées pour les électrons de valence, les électrons de cœur étant assimilés à un noyau effectif. C'est une méthode rapide, applicable sur de grandes molécules, mais pas très précise par rapport aux méthodes *ab initio*. Suivant la même approximation, d'autres méthodes semi-empiriques ont été plus récemment introduites par J.P.P. Stewart comme PM3²⁵ et PM6,²⁶ mais nous avons choisi de garder cette méthode car elle sera utilisée pour les calculs ONIOM qui ont été testés et validés lors de la thèse de J.C. Pouilly en 2009. En effet, afin d'accélérer la convergence des calculs en ONIOM DFT/AM1, nous partons toujours de la structure optimisée en AM1.

4.3 La méthode DFT

La théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) est fondée sur le théorème de Hohenberg et Kohn,²⁷ qui stipule que l'énergie du système est calculée en fonction de la densité électronique et non plus en fonction de la fonction d'onde électronique. D'après les équations de Kohn-Sham, l'énergie électronique s'écrit comme la somme d'une énergie cinétique des électrons, d'un terme d'interaction électron-noyau et d'un terme d'interaction électron-électron. Ce dernier terme de corrélation électronique n'est pas explicitement déterminé dans la théorie de la fonctionnelle de la densité et dépend des paramètres introduits dans les fonctionnelles. Il existe quasiment un nombre infini de fonctionnelles, qui peuvent être classées en trois grandes familles : les fonctionnelles LDA (local density approximation), GGA (generalized gradient approximation) et les fonctionnelles hybrides. Nous utilisons pour les simulations de spectres IR la fonctionnelle hybride B3LYP^{28,29} avec une base atomique 6-31G(d). Malheureusement, nous ne pouvons pas effectuer des calculs de fréquences avec des bases plus grandes, notamment en ajoutant des fonctions diffuses, car les temps de calculs deviennent alors beaucoup trop longs (variation en N^4 , N étant le nombre de fonctions de base). Avec les capacités de calcul dont nous disposons (8 à 12 CPU – 30 GB RAM), nous pouvons traiter au niveau DFT des systèmes contenant jusqu'à 1800 fonctions de base. L'optimisation de géométrie prend en moyenne 3 à 5 jours, et le calcul de fréquence 48 h. Nous travaillons avec la fonctionnelle B3LYP car elle est très couramment employée pour déterminer les structures et les fréquences de molécules d'intérêt biologique, malgré des biais connus comme la mauvaise caractérisation des interactions de dispersion. Ce type

d'interaction est néanmoins peu important dans les systèmes protonés où les contributions électrostatiques et de polarisation dominant.

4.4 La méthode hybride ONIOM DFT/AM1

Pour les systèmes biomoléculaires de grandes tailles qui contiennent plusieurs centaines d'atomes, l'optimisation des structures et les calculs de fréquences de vibration ne sont pas faisables par des méthodes de chimie quantique élaborées (DFT ou *ab initio*). L'une des stratégies qui a été proposée est d'utiliser des méthodes hybrides de type QM/MM (mécanique quantique/mécanique moléculaire) notamment pour traiter les systèmes en phase condensée où les molécules de solvant sont traitées de manière explicite et non par un continuum.³⁰ A la suite des travaux effectués pendant la thèse de J.C. Pouilly dans notre groupe, nous utilisons la méthode ONIOM, développée dans le groupe Morokuma *et al.*^{31,32}, qui est basée sur une partition du système étudié en plusieurs couches traitées à des niveaux de calcul différents. Pratiquement, la méthode ONIOM permet de séparer le système en deux ou trois couches, appelées layers. Nous avons utilisé cette méthode implémentée dans le code gaussian G09,³³ en divisant le système en deux couches : l'une haute ; où les atomes sont traités au niveau DFT, et l'autre basse, où le système est traité au niveau AM1 (Figure 1). Le choix du niveau de calcul pour les différentes couches est arbitraire et dépend de la taille du système et des propriétés que l'on veut simuler.^{34,35}

Une des tâches les plus délicates dans les méthodes hybrides est le traitement de la frontière entre les deux couches.³⁶ Dans la méthode que nous utilisons, une liaison chimique entre deux atomes appartenant aux deux couches différentes est coupée et il faut rajouter un atome d'hydrogène H afin que le système conserve un caractère électronique à couche fermée.

L'énergie calculée au niveau ONIOM DFT/AM1 est déterminée par :

$$E_{\text{ONIOM}} = E_{\text{HL/DFT}} - E_{\text{HL/AM1}} + E_{\text{tot/AM1}}$$

avec :

- $E_{\text{HL/DFT}}$ est l'énergie du système contenu dans la couche haute calculée au niveau DFT
- $E_{\text{HL/AM1}}$ est l'énergie du système contenu dans la couche haute calculée au niveau AM1
- $E_{\text{tot/AM1}}$ est l'énergie du système entier calculée au niveau AM1

Le point important est de remarquer que les interactions entre les deux couches sont traitées au niveau de calcul utilisé pour la couche basse, dans notre cas AM1. Nous avons fait des tests suivant différentes méthodes pour la couche basse, notamment en gardant le champ de force Amber, mais nous avons constaté une très grande dispersion dans les changements de structures au cours des optimisations, alors qu'avec la méthode semi-empirique AM1, les changements conformationnels étaient de faible amplitude. Finalement, pour avoir une estimation plus fiable de l'énergie de la configuration optimisée en ONIOM, nous calculons l'énergie de la structure d'équilibre au niveau DFT/B3LYP/6-31g(d).

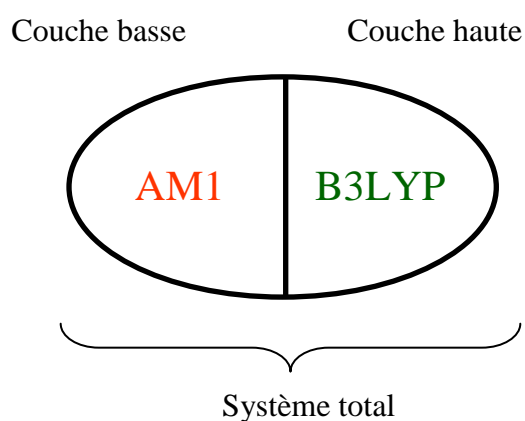


Figure 1 : Principe de partition d'un système en deux couches.

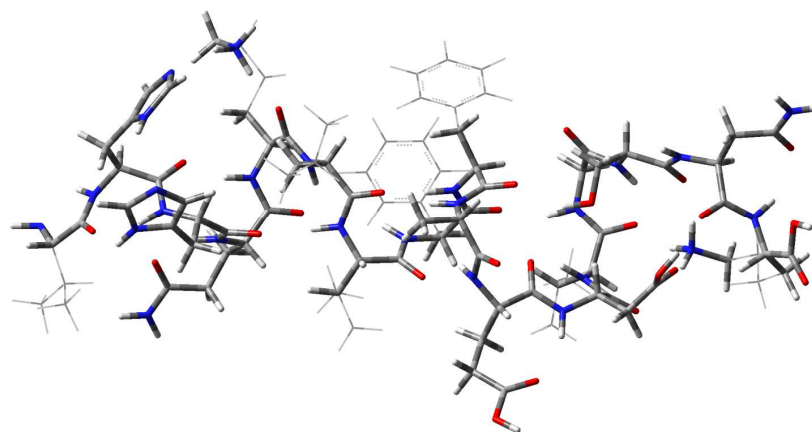


Figure 2 : Exemple de la partition du système dans le cas de $A\beta_{12-28}$. Les atomes en couche haute sont représentés en tube et les atomes en couche basse sont représentés en fil.

La figure 2 présente comment la partition du système total en deux couches est faite. D'une manière générale, le squelette peptidique est inclus dans la couche haute avec tous les atomes des chaînes latérales des acides aminés acides ou basiques qui sont susceptibles d'être

engagés par liaisons hydrogène : lysine, histidine, asparagine, glutamine, serine, acide aspartique, acide glutamique. Les atomes des chaînes latérales des acides aminés aliphatiques ou possédant un cycle aromatique sont alors inclus dans la couche basse: valine, leucine, alanine, phénylalanine, tyrosine et tryptophane. Idéalement, il faudrait sans doute inclure dans la couche haute les cycles aromatiques car ils peuvent être impliqués dans des interactions de type dispersion ou charge- π . Mais comme ces types d'interactions ne sont pas bien pris en compte avec la fonctionnelle B3LYP, nous avons choisi de simplifier le calcul et de diminuer au maximum la taille de la couche haute pour nous permettre de conserver un avantage en temps de calcul avec la méthode hybride ONIOM.

Le calcul des fréquences IR est fait avec la méthode ONIOM dans l'approximation harmonique. Pour compenser l'erreur due à la non prise en compte de l'anharmonicité, on corrige les fréquences calculées par un facteur d'échelle global de 0.960 qui est celui de la méthode B3LYP/6-31g(d).³⁷ Le point essentiel, dans les simulations des spectres IR reportées dans ce travail, est que l'on ne garde que les modes de vibrations des atomes inclus dans la couche haute. Ceci est dû au fait que les tests effectués sur des systèmes modèles dont les structures et les spectres IR ont été attribués d'une manière univoque ont montré des erreurs trop importantes et une très grande dispersion des fréquences calculées avec la méthode AM1. En ne considérant que les atomes inclus dans la couche haute, les simulations permettent de traiter les modes amide I (élongation CO) et amide II (élongation CN, pliage NH) du squelette peptidique. Ce sont les deux modes les plus intenses observés par IRMPD dans les peptides et ceux qui sont les plus discriminants pour sonder les liaisons hydrogènes susceptibles de favoriser l'émergence de structures secondaires particulières. Par contre, les modes de basses fréquences en dessous de 1400 cm^{-1} (amide III, pliage CH) ne peuvent pas être correctement reproduits par cette méthode car ils ne sont pas tous inclus dans la couche haute. Le spectre simulé est finalement convolué par une fonction gaussienne de 25 cm^{-1} de largeur pour prendre en compte l'élargissement rotationnel des bandes vibrationnelles à 300 K, la résolution du laser à électron libre ($\Delta\lambda/\lambda$ environ 0.5 %) et les effets d'élargissement liés au processus multi-photonique intrinsèque à l'IRMPD.³⁸

5. Calcul de sections efficaces de collision

La technique expérimentale de mobilité ionique a été décrite dans le chapitre I de ce manuscrit et je vais ici présenter le programme dont je me suis servi pour calculer les sections

efficaces de collisions des systèmes moléculaires auxquels je me suis intéressé. Le programme Mobcal a été développé par le groupe de Martin Jarrold.¹ Il permet de calculer la section efficace de diffusion d'un ion moléculaire avec un gaz rare, par 3 méthodes différentes:

- La méthode d'approximation par projection (PA) a été développée par M. T. Bowers et ses collaborateurs.³⁹ Les atomes de l'ion étudié sont représentés par des sphères dures dont le rayon est égal à la distance de collision entre deux sphères dures, et la section efficace est calculée en faisant la moyenne des sections efficaces selon toutes les géométries de collision possibles. C'est la méthode la plus simple et la plus rapide en temps de calcul mais l'une des moins précises. Les effets à longue portée ont été introduits plus tard.⁴⁰ Le groupe de Bowers a récemment proposé une nouvelle formulation (PSA) qui prend en compte les effets de taille et de concavité du système.^{41,42} Les résultats sont alors comparables avec la méthode des trajectoires avec 3% d'incertitude sur la section efficace de fullerènes et protéines, mais le temps de calcul est réduit d'un facteur de 100 - 1000.

- La méthode exacte par diffusion de sphères dures EHSS (Exact Hard Sphere Scattering Method),⁴³ qui traite les atomes comme la première, mais qui calcule la section efficace en moyennant sur un grand nombre de trajectoires possibles des atomes de gaz rentrant en collision avec l'ion.

- La méthode des trajectoires (TM),¹ quand à elle, calcule la section efficace comme la méthode précédente mais traite les interactions des atomes de l'ion étudié avec les atomes de gaz diffusants par un potentiel de Lennard-Jones plus un potentiel ion-dipôle en $\frac{1}{r^4}$. Le potentiel effectif de l'ion est calculé en sommant toutes les contributions individuelles des atomes et les trajectoires de collisions entre atomes de gaz et ion sont calculées dans ce potentiel.

La méthode PA ne prend pas en compte les collisions multiples et a donc tendance à sous-estimer les sections efficaces, alors que c'est le contraire pour la seconde, car elle surestime la contribution des collisions multiples. Pour la comparaison avec l'expérience, nous utilisons les résultats de la méthode des trajectoires TM car elle prend en compte les interactions à courte et longue portée et traite la polarisation. Mais c'est aussi la méthode qui nécessite le plus long temps de calcul, en moyenne plusieurs heures pour un peptide contenant une centaine d'atomes à comparer à quelques minutes pour la méthode PA.

Pour chaque famille de structures optimisées en Amber, la section efficace reportée est la moyenne sur l'ensemble des structures (compris entre 10 et 30 structures) et sont calculées par la méthode trajectoire (TM) avec 10^4 trajectoires. On sélectionne les familles dont la section efficace de diffusion est à $\pm 10\%$ du maximum du pic de mobilité ionique. Cette incertitude est plus grande que la résolution de la mesure ($< 2\%$) mais on peut s'attendre à des changements structuraux entre les différentes méthodes d'optimisation entre AMBER, AM1 et ONIOM B3LYP : AM1. Pour le calcul des sections efficaces de diffusion en AM1 et ONIOM, on sélectionne une seule conformation par famille de structures, en augmentant le nombre de trajectoire à $5 \cdot 10^5$ pour compenser la présence d'une seule conformation.

A partir des travaux de M. Jarrold, la précision attendue pour la détermination des sections efficaces de diffusion est estimée à 2% pour les « bonnes » structures (celles réellement présentes expérimentalement) issues de recherches conformationnelles.⁴⁴ Il faut rappeler que les premières études ont porté sur des fullerènes rigides qui ne présentent pas une grande hétérogénéité conformationnelle. Cette précision est théoriquement suffisante pour étudier des changements importants entre différentes structures de molécules flexibles, comme la compétition entre des structures en hélices ou globulaires dans les polyalanines,⁴⁵ ou des effets de dépliements induits par l'augmentation de l'état de charge du système dans des brins d'ADN.⁴⁶ Néanmoins, la détermination précise de structures d'un peptide donné à partir d'une seule mesure de section efficace de diffusion reste délicate. Ce n'est pas une donnée univoque, plusieurs conformations peuvent avoir des sections efficaces très proches et non séparables expérimentalement. De plus, et ce sont sans doute les deux points les plus durs, le calcul repose sur une paramétrisation des interactions atomiques et les structures générées lors de l'exploration dépendent de la méthode d'optimisation. Récemment, des travaux ont proposé de nouveaux paramètres sensés donner une plus faible dispersion des valeurs calculées⁴⁷ et ont montré que les sections efficaces calculées dépendent fortement du niveau de calcul utilisé pour optimiser les structures.⁴⁸ Il est néanmoins difficile d'estimer la validité de ces conclusions car, dans tous les cas, il reste une indétermination sur les structures adoptées réellement dans les conditions expérimentales. Nous avons donc choisi de garder les paramètres initiaux implémentés dans Mobcal, mais de combiner les résultats de trois méthodes indépendantes, mobilité ionique, spectroscopie IRMPD et fragmentation ECD, pour proposer les structures compatibles avec les données expérimentales.

Références

1. Mesleh, M. F., Hunter, J. M., Shvartsburg, A. A., Schatz, G. C. & Jarrold, M. F. Structural Information from Ion mobility Measurements: Effects of the Long-Range Potential. *J. Phys. Chem* **100**, 16082-16086 (1996).
2. Brooks, C. L., Onuchic, J. N. & Wales, D. J. Statistical thermodynamics - Taking a walk on a landscape. *Science* **293**, 612-613 (2001).
3. Evans, D. A. & Wales, D. J. Folding of the GB1 hairpin peptide from discrete path sampling. *Journal of Chemical Physics* **121**, 1080-1090 (2004).
4. Zhou, J., Thorpe, I. F., Izvekov, S. & Voth, G. A. Coarse-grained peptide modeling using a systematic multiscale approach. *Biophysical Journal* **92**, 4289-4303 (2007).
5. Pasi, M., Lavery, R. & Ceres, N. PaLaCe: A Coarse-Grain Protein Model for Studying Mechanical Properties. *Journal of Chemical Theory and Computation* **9**, 785-793 (2013).
6. Kar, P., Gopal, S. M., Cheng, Y. M., Predeus, A. & Feig, M. PRIMO: A Transferable Coarse-Grained Force Field for Proteins. *Journal of Chemical Theory and Computation* **9**, 3769-3788 (2013).
7. Laio, A. & Parrinello, M. Escaping free-energy minima. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 12562-12566 (2002).
8. Maragliano, L. & Vanden-Eijnden, E. A temperature accelerated method for sampling free energy and determining reaction pathways in rare events simulations. *Chemical Physics Letters* **426**, 168-175 (2006).
9. Sugita, Y. & Okamoto, Y. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. *Chemical Physics Letters* **314**, 141-151 (1999).
10. Pouilly, J. C. et al. Probing the specific interactions and structures of gas-phase vancomycin antibiotics with cell-wall precursor through IRMPD spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics* **12**, 3606-3615 (2010).
11. Pouilly, J. C. et al. Combining ion mobility mass spectrometry and infrared multiphoton dissociation spectroscopy to probe the structure of gas-phase vancomycin-Ac(2)(L)K(D)A(D)A non-covalent complex. *International Journal of Mass Spectrometry* **297**, 28-35 (2010).
12. Sugita, Y. & Okamoto, Y. Replica-exchange multicanonical algorithm and multicanonical replica-exchange method for simulating systems with rough energy landscape. *Chemical Physics Letters* **329**, 261-270 (2000).
13. Baumketner, A. et al. Structure of the 21-30 fragment of amyloid beta-protein. *Protein Science* **15**, 1239-1247 (2006).
14. Baumketner, A. & Shea, J. E. The structure of the Alzheimer amyloid beta 10-35 peptide probed through replica-exchange molecular dynamics simulations in explicit solvent. *Journal of Molecular Biology* **366**, 275-285 (2007).
15. Sgourakis, N. G., Yan, Y. L., McCallum, S. A., Wang, C. Y. & Garcia, A. E. The Alzheimer's peptides A beta 40 and 42 adopt distinct conformations in water: A combined MD/NMR study. *Journal of Molecular Biology* **368**, 1448-1457 (2007).
16. Narayanan, C., Weinstock, D. S., Wu, K. P., Baum, J. & Levy, R. M. Investigation of the Polymeric Properties of alpha-Synuclein and Comparison with NMR Experiments: A Replica Exchange Molecular Dynamics Study. *Journal of Chemical Theory and Computation* **8**, 3929-3942 (2012).
17. Grabenauer, M., Wu, C., Soto, P., Shea, J. E. & Bowers, M. T. Oligomers of the Prion Protein Fragment 106-126 Are Likely Assembled from beta-Hairpins in Solution, and Methionine Oxidation Inhibits Assembly without Altering the Peptide's Monomeric Conformation. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 532-539 (2010).

18. Rao, F. & Caflisch, A. Replica exchange molecular dynamics simulations of reversible folding. *Journal of Chemical Physics* **119**, 4035-4042 (2003).
19. Seibert, M. M., Patriksson, A., Hess, B. & Spoel, D. V. D. Reproducible polypeptide folding and structure prediction using molecular dynamics simulations. *J. Mol. Biol* **354**, 173-183 (2005).
20. Xu, L., Wang, X. J. & Wang, X. C. Characterization of the internal dynamics and conformational space of zinc-bound amyloid beta peptides by replica-exchange molecular dynamics simulations. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **42**, 575-586 (2013).
21. Pearlman, D. A. et al. Amber, a Package of Computer-Programs for Applying Molecular Mechanics, Normal-Mode Analysis, Molecular-Dynamics and Free-Energy Calculations to Simulate the Structural and Energetic Properties of Molecules. *Computer Physics Communications* **91**, 1-41 (1995).
22. Case, D. A. et al. The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry* **26**, 1668-1688 (2005).
23. Wang, J. M., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A. & Case, D. A. Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry* **25**, 1157-1174 (2004).
24. Dewar, M. J. S., Zebisch, E. G., Healy, E. F. & Stewart, J. J. P. The Development and Use of Quantum-Mechanical Molecular-Models .76. Am1 - a New General-Purpose Quantum-Mechanical Molecular-Model. *Journal of the American Chemical Society* **107**, 3902-3909 (1985).
25. Stewart, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *Journal of Molecular Modeling* **13**, 1173-1213 (2007).
26. Stewart, J. J. P. Application of the PM6 method to modeling proteins. *Journal of Molecular Modeling* **15**, 765-805 (2009).
27. Hohenberg, P. & Kohn, W. Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review B* **136**, B864-+ (1964).
28. Becke, A. D. Density-Functional Exchange-Energy Approximation with Correct Asymptotic-Behavior. *Physical Review A* **38**, 3098-3100 (1988).
29. Lee, C. T., Yang, W. T. & Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron-Density. *Physical Review B* **37**, 785-789 (1988).
30. Mennucci, B., Martinez, J. M. & Tomasi, J. Solvent effects on nuclear shieldings: Continuum or discrete solvation models to treat hydrogen bond and polarity effects? *Journal of Physical Chemistry A* **105**, 7287-7296 (2001).
31. Maseras, F. & Morokuma, K. Imomm - a New Integrated Ab-Initio Plus Molecular Mechanics Geometry Optimization Scheme of Equilibrium Structures and Transition-States. *Journal of Computational Chemistry* **16**, 1170-1179 (1995).
32. Svensson, M. et al. ONIOM: A multilayered integrated MO+MM method for geometry optimizations and single point energy predictions. A test for Diels-Alder reactions and Pt(P(t-Bu)(3))(2)+H-2 oxidative addition. *Journal of Physical Chemistry* **100**, 19357-19363 (1996).
33. Frisch, M. J. et al. (Wallingford CT, 2009).
34. Kellie, J. L. & Wetmore, S. D. Selecting DFT methods for use in optimizations of enzyme active sites: applications to ONIOM treatments of DNA glycosylases. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **91**, 559-572 (2013).

35. Vreven, T., Morokuma, K., Farkas, O., Schlegel, H. B. & Frisch, M. J. Geometry optimization with QM/MM, ONIOM, and other combined methods. I. Microiterations and constraints. *Journal of Computational Chemistry* **24**, 760-769 (2003).
36. Dapprich, S., Komaromi, I., Byun, K. S., Morokuma, K. & Frisch, M. J. A new ONIOM implementation in Gaussian 98. Part I. The calculation of energies, gradients, vibrational frequencies and electric field derivatives. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* **461-462**, 1-21 (1999).
37. NIST & <http://cccbdb.nist.gov/vibscalejust.asp>.
38. Parneix, P., Basire, M. & Calvo, F. Accurate Modeling of Infrared Multiple Photon Dissociation Spectra: The Dynamical Role of Anharmonicities. *Journal of Physical Chemistry A* **117**, 3954-3959 (2013).
39. von Helden, G., Hsu, M. T., Gotts, N. & Bowers, M. T. Carbon Cluster Cations with up to 84 Atoms - Structures, Formation Mechanism, and Reactivity. *Journal of Physical Chemistry* **97**, 8182-8192 (1993).
40. Wyttenbach, T., vonHelden, G., Batka, J. J., Carlat, D. & Bowers, M. T. Effect of the long-range potential on ion mobility measurements. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **8**, 275-282 (1997).
41. Bleiholder, C., Wyttenbach, T. & Bowers, M. T. A novel projection approximation algorithm for the fast and accurate computation of molecular collision cross sections (I). Method. *International Journal of Mass Spectrometry* **308**, 1-10 (2011).
42. Bleiholder, C., Contreras, S., Do, T. D. & Bowers, M. T. A novel projection approximation algorithm for the fast and accurate computation of molecular collision cross sections (II). Model parameterization and definition of empirical shape factors for proteins. *International Journal of Mass Spectrometry* **345**, 89-96 (2013).
43. Shvartsburg, A. A. & Jarrold, M. F. An exact hard-spheres scattering model for the mobilities of polyatomic ions. *Chemical Physics Letters* **261**, 86-91 (1996).
44. Jarrold, M. F. Helices and sheets in vacuo. *Physical Chemistry Chemical Physics* **9**, 1659-1671 (2007).
45. Hudgins, R. R., Ratner, M. A. & Jarrold, M. F. Design of helices that are stable in vacuo. *Journal of the American Chemical Society* **120**, 12974-12975 (1998).
46. Baker, E. S., Bernstein, S. L., Gabelica, V., De Pauw, E. & Bowers, M. T. G-quadruplexes in telomeric repeats are conserved in a solvent-free environment. *International Journal of Mass Spectrometry* **253**, 225-237 (2006).
47. Siu, C. K., Guo, Y. Z., Saminathan, I. S., Hopkinson, A. C. & Siu, K. W. M. Optimization of Parameters Used in Algorithms of Ion-Mobility Calculation for Conformational Analyses. *Journal of Physical Chemistry B* **114**, 1204-1212 (2010).
48. Zakharova, N. L. et al. An Assessment of Computational Methods for Obtaining Structural Information of Moderately Flexible Biomolecules from Ion Mobility Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **23**, 792-805 (2012).

CHAPITRE III
Étude structurale de l'Amyloïde β 12-28
en phase gazeuse

CHAPITRE III

Étude structurale de l'Amyloïde β 12-28 en phase gazeuse

1. Introduction

Le peptide amyloïde β ($A\beta$) est une forme peptidique anormale issue d'une protéine membranaire et que l'on trouve sur les cellules neuronales du corps humain. Elle est impliquée dans plusieurs maladies neuro-dégénératives comme celles d'Alzheimer et de Parkinson.¹ En effet, on retrouve dans le cerveau des patients des plaques composées en majorité des brins 1-40 (acides aminés n°1 à 40) et 1-42 de l' $A\beta$. Le brin 1-42 est beaucoup plus neurotoxique que le brin 1-40, ce qui montre qu'une petite différence de séquence du peptide peut induire de grands changements de comportement. Dans ces plaques, la structure secondaire est en feuillet β , alors que les mesures RMN en solution montrent que le brin 1-42 est composé de domaines en hélice α séparés par des jonctions flexibles déstructurées (code PDB 1z0q, voir Figure 1). Un mauvais repliement est à l'origine de ce changement de conformation qui favorise l'agrégation du peptide et les études actuelles tendent à montrer que ce sont les petits oligomères insolubles qui sont toxiques.² Un des axes de recherche de la lutte contre ces maladies est la fabrication de médicaments capables d'inhiber ce changement de conformation en se fixant sur l'amyloïde. L'équipe de D. Weaver à Halifax (Canada) s'est engagée dans cette voie et a conçu des molécules dont la cible privilégiée est la séquence $H^{13}HQK^{16}$ de la protéine $A\beta$. En effet, la séquence BBXB (avec B basique et X un acide aminé quelconque) est commune à 43 protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer, le but serait donc de cibler toutes ces protéines avec un seul médicament afin d'optimiser son efficacité.³

Afin de déterminer les possibles structures et les propriétés d'agrégation de la protéine $A\beta$, les peptides $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$ ont été largement étudiés en phase condensée par des techniques spectroscopiques telles que le dichroïsme circulaire (CD) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) dans des solutions aqueuses ou contenant du trifluoroéthanol (TFE), un co-solvant connu pour favoriser les liaisons hydrogènes intra-moléculaires et donc les peptides adoptant des structures en hélice.^{4,5} En solution d'eau pure, les peptides $A\beta$ n'ont

pas de structures secondaires bien définies mais peuvent adopter des structures en pelote (random coil)⁶ ou étirée avec une partie hélicoïdale (figure 1). Cependant, dans des solutions de TFE, les conformations en hélice α sont favorisées à haut et bas pH et les structures contenant des motifs en feuillet β sont majoritaires à pH 5.5.⁷

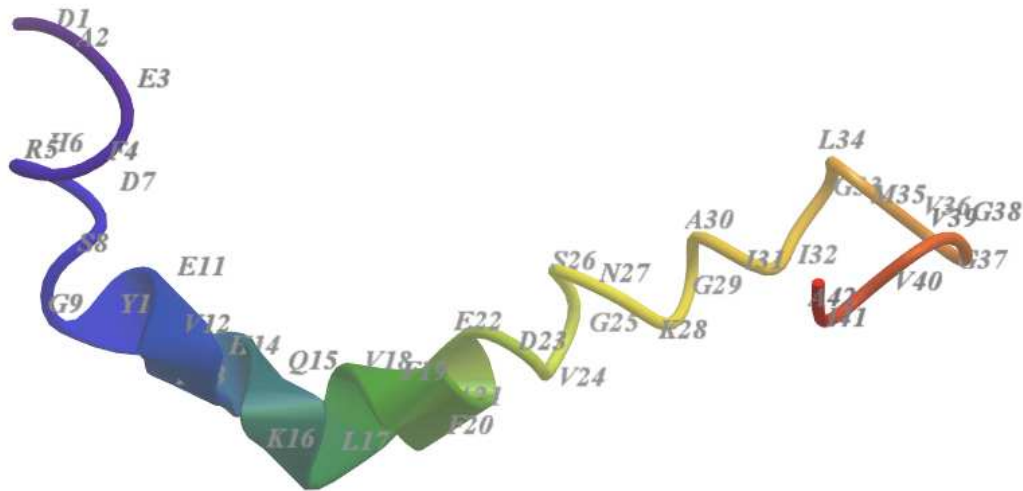


Figure 1 : structure en solution aqueuse de la protéine Amyloïde β 1-42 révélée par RMN (code pdb 1z0q)

La structure primaire de $A\beta_{1-42}$ est :



La partie C-terminal du peptide (de 29 à 40-42) ne comporte pas de résidus acides ou basiques et ne sont donc pas chargés. Il est généralement admis que cette partie est cruciale pour le mauvais repliement du peptide et la formation d'agrégat, du fait de sa propension à former systématiquement des structures en feuillet β .⁸ La région comprenant les résidus 1-28 serait donc impliquée dans la modulation de la transition vers l'agrégation, suivant sa structure secondaire dépendante des interactions électrostatiques impliquant les résidus chargés. Afin de mieux comprendre les changements de structures et les mécanismes d'agrégation de la protéine $A\beta$, et notamment la dépendance observée en fonction du pH, des fragments de $A\beta$ (1-28, 25-35, 12-28 ...) ont été étudiés expérimentalement et théoriquement en phase condensée. Le fragment $A\beta_{12-28}$ (${}^{12}\text{VHHQKLVFFAEDVGSNK}^{28}$) revêt un intérêt

particulier car c'est la plus petite séquence qui forme des fibrilles et qui montre des effets toxiques *in vitro* comme le peptide entier.⁹ La structure secondaire de A β ₁₂₋₂₈ a été étudiée par RMN et CD.^{10,11} Les auteurs ont conclu qu'à basse température (273 K), le peptide adopte une structure étendue en polyproline PII et qu'une augmentation de la température induit une transition structurale vers des formes globulaires flexibles random coil et aussi en feuillet β . Des simulations de dynamique moléculaire, en fonction de la température et de la polarité du solvant, ont aussi mis en évidence les mécanismes possibles amenant au changement de conformation des structures étendues PII vers les formes repliées.¹²⁻¹⁴ Les changements de conformations, en fonction du pH de la solution, ont été étudiés pour différents fragments de la protéine A β (voir figure 2). Zagorski et collaborateurs¹⁵ ont ainsi montré que, pour le peptide A β ₁₋₂₈, il y avait formation de motifs en hélice entre les résidus 10-28 uniquement dans des solutions contenant au moins 60% de TFE à haut et bas pH, alors que le peptide adopte une forme repliée en pelote dans une solution aqueuse. A pH autour de 4-7, le peptide s'agrège sous forme de feuillet β antiparallèles, comme le peptide entier.⁸



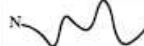



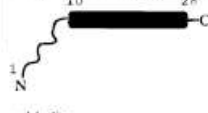

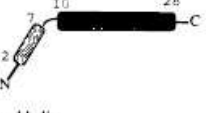
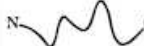
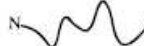

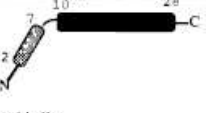
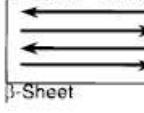
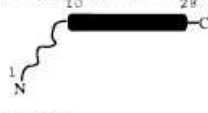
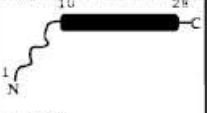
Solvent Conditions	Predominate Structure			
	pH 1-4	pH 4-7	pH 7-8	pH 8-12
water	 Random Coil	 Random Coil & β -Sheet	 Random Coil	 Random Coil
SDS-water	 α -Helix (residues 2-7 & 10-28)	 α -Helix (residues 10-28)	 α -Helix (residues 10-28)	 Random Coil
DPC-water	 α -Helix (residues 2-7 & 10-28)	 Random Coil	 Random Coil	 Random Coil
60% TFE-water	 α -Helix (residues 2-7 & 10-28)	 β -Sheet	 α -Helix (residues 10-28)	 α -Helix (residues 10-28)

Figure 2 : structures préférentiellement adoptées par A β ₁₋₂₈ en fonction de la nature du solvant (SDC : sodium dodecyl sulfate ; DPC : dodecyl phosphocoline ; TFE : trifluoroéthanol) et du pH de la solution.⁸

Afin de comprendre plus finement quels acides aminés de la séquence 1-28 pouvaient être responsables de la transition structurale en fonction du pH, une série de petits fragments $A\beta_{11-28}$, $A\beta_{13-28}$ et $A\beta_{15-28}$ ont été étudiés par Kirschner *et al.*¹⁶ Ils ont notamment pu mettre en évidence que l'absence des histidines en position 13 et 14 affectait grandement la structure des peptides : à l'inverse des autres peptides, la séquence $A\beta_{15-28}$ adopte majoritairement une structure en feuillet β sauf à $pH > 10$, ce qui montre le rôle de l'histidine protonée dans la stabilisation de la forme en hélice.

Toutes ces études en phase condensée montrent que la structure de $A\beta$ dépend fortement de la nature et du pH de la solution. Les études en phase gazeuse sur les peptides protonés pourraient donc permettre d'obtenir des informations complémentaires et pertinentes sur les interactions intramoléculaires qui favorisent l'émergence de structures secondaires en l'absence du solvant.

Si un nombre conséquent d'études en solution a été mené sur la protéine $A\beta$, les études en phase gazeuse restent peu nombreuses. Le groupe de M.T. Bowers de l'Université de Californie à Santa Barbara (USA) a fourni depuis quelques années un travail important sur les caractéristiques structurales des différents brins de cette protéine et de leurs oligomères isolés, par la technique de mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse. Tout d'abord, ces expériences ont confirmé que les peptides amyloïdes pouvaient être produits en phase gazeuse en utilisant des sources d'ionisation douce comme l'electrospray et que des informations sur la structure secondaire des peptides pouvaient être tirées des mesures de mobilité ionique. Ils ont étudié l'agrégation du brin entier¹⁷ et l'effet de diverses mutations d'acides aminés sur le repliement et la complexation du brin 21-30.^{18,19} Ce groupe a également montré que le brin 1-40 se fixe sur le brin 1-42 et empêche son agrégation²⁰ et que le dodécamère de ce brin est particulièrement toxique.²¹

La spectrométrie de mobilité ionique est une technique très efficace pour obtenir des informations sur la structure globale de biomolécules. On peut néanmoins s'attendre à ce que des peptides flexibles de grande taille adoptent plusieurs conformations en phase gazeuse qui ne peuvent pas toujours être séparées par la mobilité. Plusieurs équipes, dont la nôtre, ont ainsi proposé de combiner les informations structurales obtenues par mobilité ionique à celles tirées de la spectroscopie laser IR ou UV.²²⁻²⁷ Certains peptides peuvent constituer des

systèmes modèles de structures secondaires typiques de celles rencontrées dans les protéines. En effet, la détermination des signatures spectroscopiques des structures régulières du type feuillet β et hélice α est un but recherché activement par diverses équipes. La série de publications récentes du groupe de T. Rizzo constitue le travail le plus abouti dans cette voie: celui-ci tend à prouver que les hélices α peuvent survivre en l'absence de solvant.²⁸ D'autres études en phase gazeuse ont été menées par spectroscopie IR-REMPI pour mettre en évidence des structures secondaires des formes neutres et protonées du peptide protégé Ac-VQIVYK-NHCH₃.²⁹ Ce peptide est un fragment de la protéine tau (également impliquée dans la maladie d'Alzheimer) et est indispensable à son agrégation sous forme de fibres analogues à celles formées par l'A β .³⁰ Cette séquence s'agrège d'ailleurs spontanément en solution. Les résultats de cette étude semblent indiquer qu'en phase gazeuse ce peptide neutre adopte la forme d'une épingle à cheveux avec un réseau de liaisons H comparable à celui d'un feuillet β , mais que la protonation détruit cette structure en induisant un repliement ayant pour but de solvater la charge par des groupements C=O.

Pour notre part, nous avons étudié des brins d'A β en combinant plusieurs approches expérimentales complémentaires : la spectrométrie de mobilité ionique IMS, la spectroscopie IRMPD et la fragmentation induite par capture électronique ECD. Les spectres de mobilité ionique et de spectroscopie IRMPD avaient déjà été obtenus avant le début de ma thèse, mais ne permettait pas de déterminer d'une manière univoque la structure des fragments A β ₁₋₂₈ et A β ₁₂₋₂₈. Nous avons donc proposé de compléter ces données par les spectres de fragmentations ECD et, plus particulièrement, l'analyse de la distribution des fragments spécifiques c/z le long de la chaîne peptidique.

[A β ₁₂₋₂₈]²⁺ et [A β ₁₂₋₂₈]³⁺

2. Résultats Expérimentaux

2.1 Mobilité ionique

Les profils temporels de diffusion (ATD) des peptides A β ₁₂₋₂₈ pour les deux états de charge doublement et triplement protonés sont reportés à la figure 3. Ils sont chacun caractérisés par un pic principal qui correspond à une section efficace de diffusion de $422 \pm 8 \text{ \AA}^2$ et $435 \pm 8 \text{ \AA}^2$. Les parties grisées correspondent aux temps de diffusion calculés pour une seule configuration ayant une section efficace centrée sur le maximum du pic principal. La

largeur intrinsèque de ces pics théoriques est donnée par l'élargissement induit par la diffusion des ions dans un gaz maintenu à 10 Torr et à 298 K.³¹ On peut déjà remarquer que les pics expérimentaux sont sensiblement plus larges que ceux calculés si une seule conformation était présente. Une part de l'élargissement des profils temporels est due au fait que le paquet d'ions qui traverse la cellule de mobilité correspond à une largeur initiale de 1ms. Mais on doit cependant considérer que plusieurs conformations, ayant des sections efficaces de diffusion proches qui ne peuvent pas être séparées, sont certainement présentes expérimentalement. Le pic de diffusion de $[\text{A}\beta_{12-28}]^{3+}$ est asymétrique avec un épaulement vers les plus grands temps d'arrivée, ce qui peut être dû à la présence de conformations avec des sections efficaces de diffusion sensiblement plus grandes, de l'ordre de 450 \AA^2 et plus. Cependant, nous n'avons considéré dans l'analyse que le pic principal qui est nettement plus intense et qui doit donc correspondre aux conformations majoritairement peuplées dans ces conditions expérimentales.

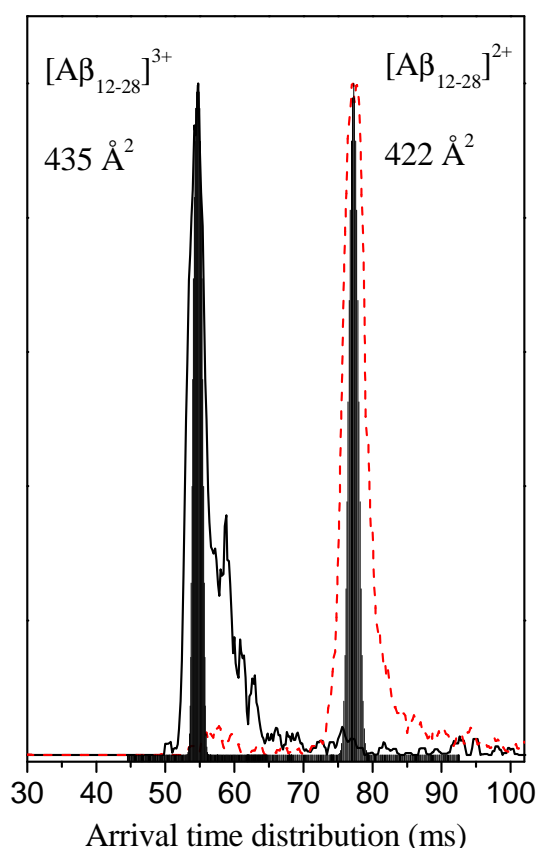


Figure 3 : Profil temporel de diffusion (ms) des ions $[\text{A}\beta_{12-28}]^{2+}$ (en pointillé rouge) et $[\text{A}\beta_{12-28}]^{3+}$ (en trait noir). Les parties grisées correspondent aux temps de diffusion calculés pour une seule configuration ayant une section efficace de 422 \AA^2 et 435 \AA^2 .

On peut aussi remarquer que la section efficace de diffusion augmente avec l'état de charge du peptide, comme attendu par un simple effet de répulsion coulombienne entre les résidus chargés qui tend à déplier le peptide. On peut donc en conclure que le peptide triplement chargé a une structure plus étendue que celle adoptée par le doublement protoné. L'augmentation observée est de l'ordre de 3 %, ce qui est nettement moins élevé que ce qui a été observé par Bowers *et al.* dans le cas de A β ₁₋₄₂.¹⁷ Dans ces travaux, les sections efficaces de diffusion de ce peptide ont été mesurées pour les états de charge -2, -3 et -4 et augmentent linéairement, passant de 600 à 750 Å². Etant donné la différence de taille entre ces deux peptides amyloïdes, on aurait pu s'attendre à une augmentation plus importante dans notre cas.

Les effets de dépliement en fonction de l'augmentation de l'état de charge ne sont pas toujours observés. Par exemple, pour des peptides plus petits, les sections efficaces de diffusion n'augmentent que très légèrement, voire diminuent, avec l'état de charge.³² Pour la bradykinine (9 résidus), la section efficace de diffusion passe de 245 à 255 Å² entre le simplement et doublement protoné, ce qui montre que le peptide conserve globalement sa structure pour les deux états de charge. Pour la substance P (7 résidus) et la bombésine (14 résidus), les sections efficaces de diffusion diminuent respectivement de 7 et 20 % entre le 1+ et 2+. Ceci a été interprété comme une contraction du peptide mais n'est pas confirmé par les simulations de structures sur ces peptides.

2.2 Spectroscopie IRMPD

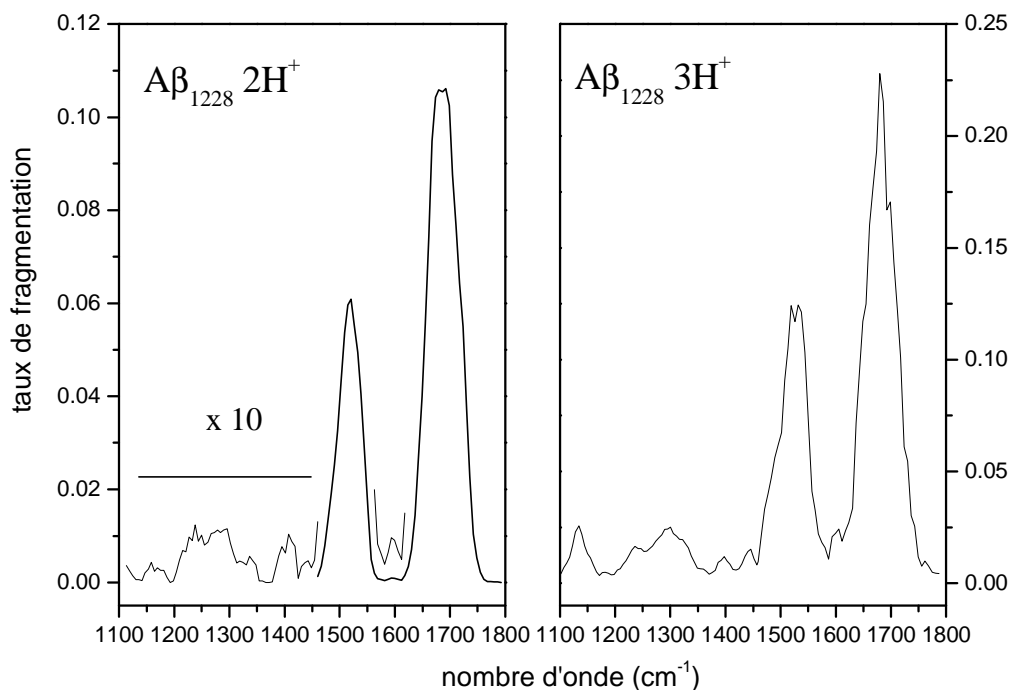


Figure 4 : spectres IRMPD des ions $[A\beta_{12-28}]^{2+}$ et $[A\beta_{12-28}]^{3+}$ dans la région 1100-1800 cm^{-1} . Pour $[A\beta_{12-28}]^{2+}$, l'intensité du spectre a été multipliée par dix pour compenser le très faible taux de fragmentation dans la région 1100-1400 cm^{-1}

Les spectres IRMPD enregistrés à CLIO (Orsay) de $[A\beta_{12-28}]^{2+}$ et $[A\beta_{12-28}]^{3+}$ sont présentés à la figure 4. Ils sont dominés par deux bandes intenses correspondant aux modes amide-I (élongation C=O) et amide-II (pliage N-H, élongation C-N) centrées respectivement autour de 1680 et 1520 cm^{-1} . La largeur des bandes vibrationnelles est de l'ordre de 55 cm^{-1} , ce qui est équivalent à ce qui a été observé par IRMPD pour les peptides de polyalanine de tailles équivalentes.³³ Dans la région des basses fréquences inférieures à 1400 cm^{-1} , qui correspondent aux modes amide-III et aux pliages C-H, le taux de fragmentation chute fortement d'un et de deux ordres de grandeurs respectivement pour les peptides triplement et doublement protonés. Les spectres ont été enregistrés en ajustant le temps d'irradiation du laser dans la trappe quadrupolaire : 50 ms dans la région amide-I et amide-II, et 500 ms pour les basses fréquences, ce qui correspond à 1 et 10 macro pulses du laser à électron libre CLIO.

Comme il sera décrit plus loin, nous nous focalisons essentiellement sur la région amide-I / amide-II pour interpréter les spectres IRMPD par les simulations des spectres vibrationnels par la méthode ONIOM. De plus, les groupements amide et carbonyle sont ceux qui sont impliqués dans le réseau de liaisons hydrogènes et qui influent sur la structure secondaire des peptides.

Les spectres IR pour les deux états de charges sont très similaires. On note un décalage vers le rouge de l'ordre de 5 cm^{-1} pour la bande amide-I et un décalage vers le bleu de 5 cm^{-1} de la bande amide-II entre le 2+ et 3+. Les maxima des bandes amide I et amide II sont à 1514 et $1685 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$ pour les 2 + et à 1525 et $1680 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$ pour le 3+. Ces décalages spectraux sont nettement inférieurs à la largeur des bandes et quasiment équivalent à la précision expérimentale des spectres IR obtenus avec le laser CLIO qui a une largeur intrinsèque de l'ordre de 0.5%, soit autour de $7\text{-}8 \text{ cm}^{-1}$ dans cette région. Ces décalages spectraux sont néanmoins reproductibles et semblent indiquer que le nombre et la force des liaisons hydrogènes entre les groupements amide (NH) et carbonyle (CO) sont plus importants dans $[\text{A}\beta_{12\text{-}28}]^{3+}$.

2.3 Spectres de fragmentation par ECD

Les spectres de masse ECD des ions $[\text{A}\beta_{12-28}]^{2+}$ (m/z 978.02) et $[\text{A}\beta_{12-28}]^{3+}$ (m/z 652.34) ont été obtenus au Laboratoire des Mécanismes Réactionnels (LMR, Palaiseau) et sont reportés aux figures 5 et 6. Dans les deux cas, ils sont composés principalement par une série de fragments de type c/z caractéristiques de la fragmentation induite par capture électronique.

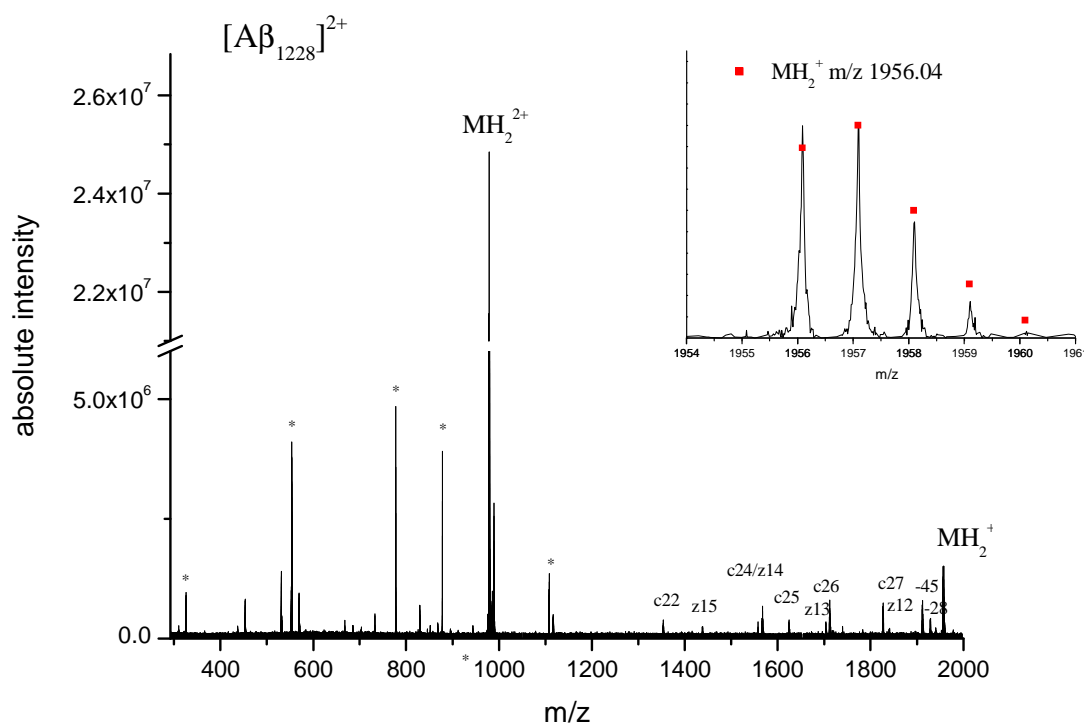


Figure 5 : spectre de masse ECD de l'ion $[\text{A}\beta_{12-28}]^{2+}$. Dans l'encart, zoom sur la région correspondant à la masse de peptide réduit. Les pics avec un astérisque sont dus à du bruit électronique et ne correspondent pas à des pics de masse.

Dans le cas du doublement chargé (figure 5), la capture électronique se traduit par l'observation du pic de masse correspondant à l'espèce réduite MH_2^+ . La distribution isotopique théorique pour cet ion est donnée sur la figure de droite (représentée par des carrés rouges) et indique qu'il n'y a pas de contribution de l'espèce réduite avec perte d'hydrogène

qui serait détectée à la masse du peptide simplement protoné MH^+ à m/z 1955.04. Par contre, pour $[A\beta_{12-28}]^{3+}$, on détecte un pic de masse intense correspondant au fragment du réduct ayant perdu un H (MH_2^{2+}), en plus du pic de masse de l'espèce réduite MH_3^{2+} à m/z 978.52. Ceci se traduit par la détection d'autres types de fragments (b/y) qui sont reliés à la fragmentation secondaire de MH_2^{2+} .

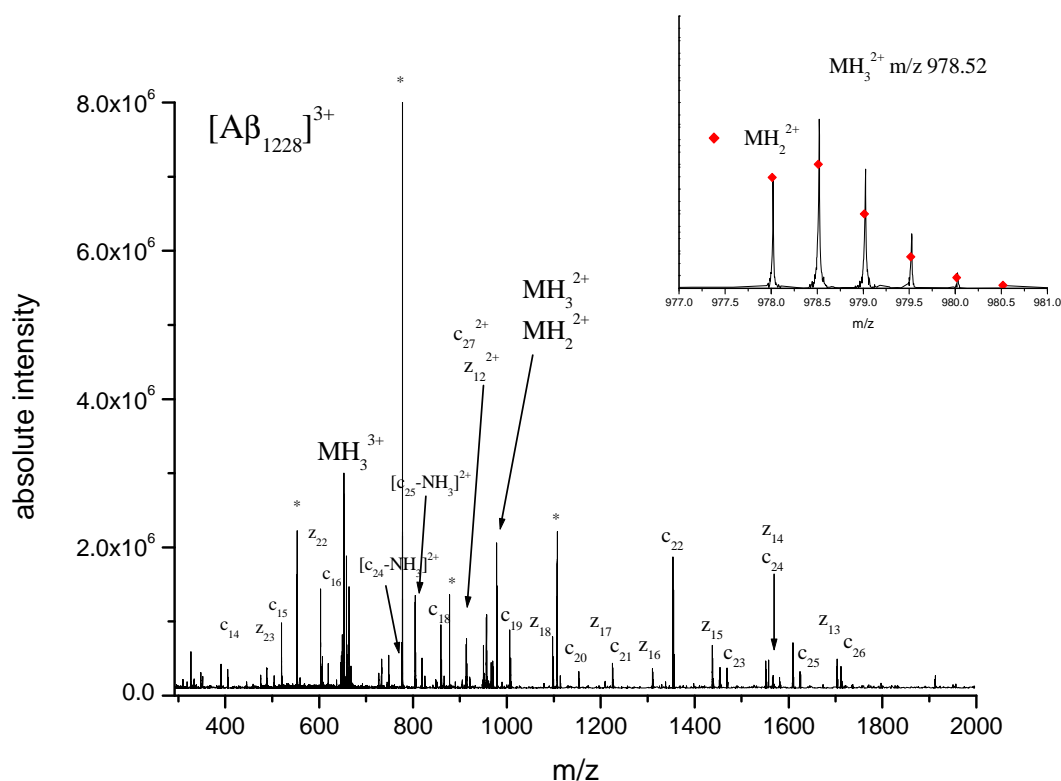


Figure 6 : spectre de masse ECD de l'ion $[A\beta_{12-28}]^{3+}$. Dans l'encart, zoom sur la région correspondant à la masse de peptide réduct. On constate la présence de l'espèce réduite avec perte d'hydrogène MH_2^{2+} .

Nous avons utilisé la nomenclature suivante pour numéroter les fragments c_i / z_j . Dans la nomenclature normale, les fragments z sont numérotés en partant du C terminal alors que les fragments c sont numérotés à partir du N terminal. Dans notre cas, tous les fragments c/z sont numérotés en partant du N terminal et correspondent donc à la rupture de la même liaison N- C_α (Figure 7), ce qui facilite l'analyse de la distribution des fragments c/z pour la corréler avec des paramètres structuraux.

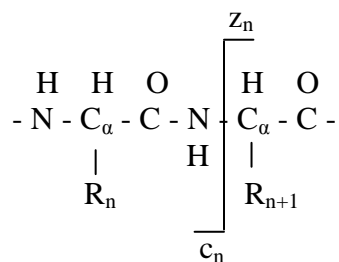


Figure 7: Nomenclature des fragments c/z utilisée dans ce travail.

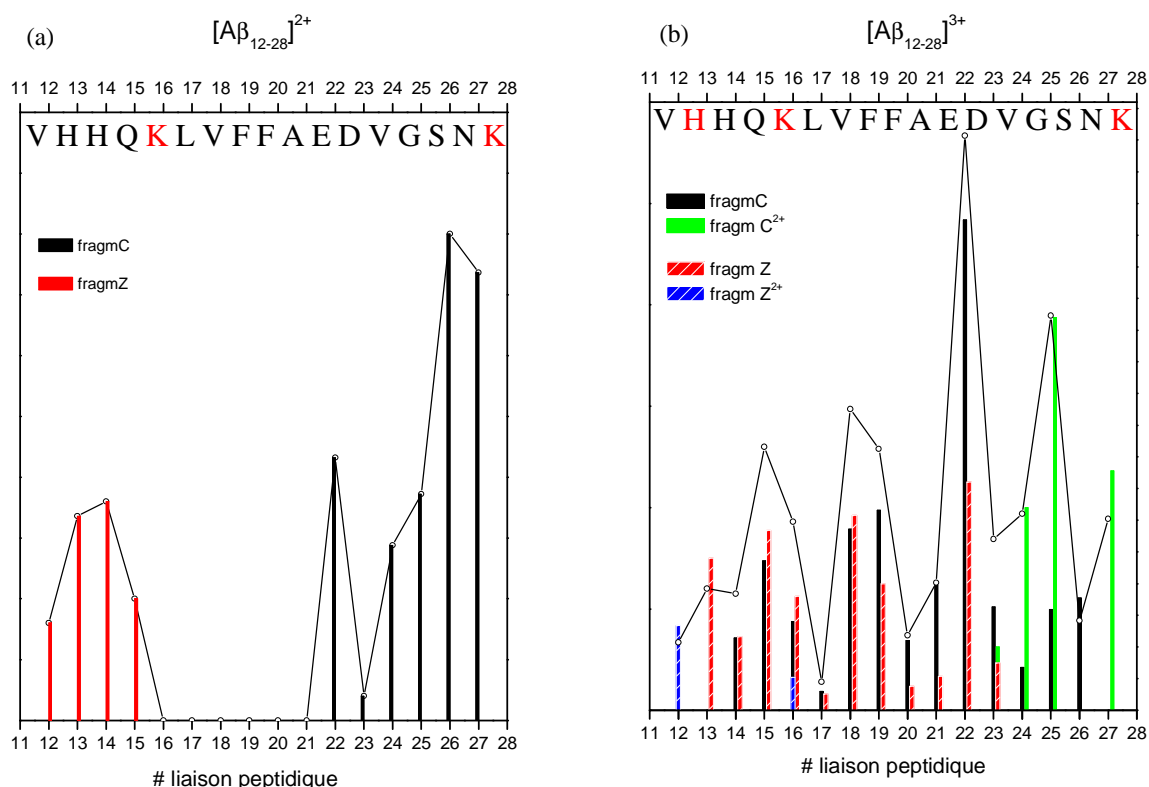


Figure 8 : distribution de l'intensité des fragments c/z le long de la séquence peptidique pour $[\text{A}\beta_{12-28}]^{2+}$ et $[\text{A}\beta_{12-28}]^{3+}$.

Comme nous l'avons détaillé au chapitre I, nous allons essayer de corréler la distribution des fragments c/z à l'interaction des sites de protonation avec les groupements carbonyles le long de la chaîne peptidique. La distribution de l'abondance des fragments c/z en fonction de la position dans la chaîne peptidique pour $[\text{A}\beta_{12-28}]^{2+}$ et $[\text{A}\beta_{12-28}]^{3+}$ est reportée sur la figure 8a et 8b respectivement. Les deux distributions sont clairement distinctes. Pour le doublement chargé, la distribution est exclusivement centrée aux deux bouts de la chaîne et

aucune fragmentation n'est détectée entre les résidus 16 et 21. Quatre ions z_{12-15} sont associés à la rupture de la liaison N-C $_{\alpha}$ à l'extrémité N terminale, alors que 5 ions $c_{22,24-27}$ sont détectés avec une prédominance des ions c_{26-27} et correspondent à une fragmentation autour de l'extrémité C terminal. L'intensité de l'ion c_{23} est extrêmement faible. A l'inverse, pour $[A\beta_{12-28}]^{3+}$, les ions c/z sont produits tout le long de la chaîne peptidique et couvre entièrement la séquence. Sur la figure 8b est reporté l'histogramme d'intensité des différents fragments c et z simplement et doublement chargés (barre) correspondant à chaque rupture de liaison N-C $_{\alpha}$ ainsi que la somme sur tous les fragments (ligne pleine, échelle d'intensité différente). Cette distribution n'est pas régulière et est caractérisée par la présence de maxima en position 15, 18-19, 22 et 25 avec une périodicité de 3-4 acides aminés. Tous les fragments c/z sont simplement chargés excepté deux ions z_{12}^{2+} et c_{27}^{2+} qui correspondent à une rupture de liaison aux deux extrémités du peptide triplement protoné. On détecte aussi deux ions c doublement chargé avec perte d'ammoniac $[c_{25-NH_3}]^{2+}$ et $[c_{24-NH_3}]^{2+}$. L'intensité des ions doublement chargés a été reportée telle quelle et n'a pas été corrigée d'une possible surestimation due à la méthode de détection par courant induit du FT-ICR. On peut remarquer que les fragments les plus intenses c_{22} et z_{22} correspondent à la rupture de la liaison N-C $_{\alpha}$ entre les résidus E 22 et D 23 qui ne sont pas au voisinage direct des acides aminés basiques probablement protonés.

3. Interprétation des résultats expérimentaux

3.1 Recherche conformationnelle

La séquence primaire du peptide A β_{12-28} est la suivante :



Plusieurs sites de protonation sont favorisés à pH neutre. Le peptide contient quatre résidus basiques, deux lysines, en position 16 et 28 et deux histidines en position 13 et 14. De plus, le groupement amine terminal est aussi un site de protonation attendu. Le pKa des résidus des acides aminés ont été mesurés en solution et sont de 10.5 pour la lysine et 6.1 pour l'histidine. Le pKa du groupement N terminal de la valine est de 9.7. On peut faire l'hypothèse que pour le peptide doublement chargé, les deux lysines sont probablement protonées. Pour le triplement chargé, nous avons effectué plusieurs recherches conformationnelles en ajoutant le troisième proton soit sur l'une des deux histidines en

position 13 ou 14, soit sur le N terminal. Pour chaque état de charge du peptide et pour chaque isomère du triplement chargé, plusieurs dynamiques moléculaires par échange de réplique (REMD) en utilisant le champ de force Amber 99 ont été réalisées, en partant soit d'une conformation repliée soit d'une conformation étendue, afin de s'assurer que l'exploration de la surface de potentiel a été la plus complète possible. Chaque dynamique a été propagée pendant 2 ns, 1500 conformères sont obtenus après chaque dynamique et les structures sont optimisées au niveau Amber et classées par énergie.

Le point le plus délicat de ces recherches conformationnelles tient au fait que l'on génère un nombre très important de structures, plusieurs milliers, qui peuvent être identiques ou ne se différenciant que par l'orientation d'un résidu non polaire (par exemple le cycle aromatique des phénylalanines). Il faut donc les regrouper en familles pour lesquelles la forme globale du peptide, c'est-à-dire la structure du squelette peptidique, est la même. Nous avons établi plusieurs critères structuraux qui nous ont permis de déterminer les différentes familles de structures :

- La distance d entre les deux C_{α} des résidus en position N et C terminale : ce critère permet généralement de déterminer si le peptide adopte une conformation repliée ou étendue quand la distance d est grande.

- Le réseau de liaisons hydrogène entre groupements carbonyle CO et amide NH de la chaîne peptique. On note C_n une liaison hydrogène formant un cycle à n atomes. Par exemple, les hélices α sont caractérisées par des cycles C_{13} , les hélices 3_{10} par des cycles C_{10} . Si un conformère présente plusieurs cycles C_{13} et/ou C_{10} et que la distance d est grande, il forme une hélice étirée. Il s'est avéré que ce critère, que nous avons adopté au début de l'analyse pour mettre en évidence des hélices, n'était pas forcément très pertinent et en tout cas difficile à manier. En effet, il faut générer pour chaque cycle C_n recherché une série de mesure de distance en partant de différents acides aminés car aucun des conformères générés ne forme d'hélice idéale sur toute la longueur de peptide.

- la distance entre un groupement protoné (par exemple sur une lysine) et tous les carbonyles de la chaîne peptidique. Nous avons introduit ce critère afin de pouvoir corréler la distribution des fragments c/z avec l'interaction du proton le long de la chaîne peptidique pour l'analyse des spectres ECD.

Pour les deux états de charge, les conformations de basses énergies peuvent être classées en familles repliées ou étendues suivant le premier critère de distance entre les deux

résidus en position N et C terminale. Pour le triplement chargé, la distance d est au moins deux fois plus grande pour les conformations étendues (autour de 20-25 Å) que pour les conformations repliées (autour de 10 Å). Par contre, pour le doublement protoné, la différence entre les conformations repliées et étendues est moins nette car la distance d présente une plus grande dispersion pour chaque sous famille. On trouve que les conformations repliées peuvent avoir des distances d allant de 7 à 17 Å, alors que les sections efficaces de diffusion restent comprises entre 410 et 420 Å². D'une manière générale, on remarque que les deux grandes classes de structures se caractérisent par des sections efficaces de diffusion inférieures à 420 Å² pour les repliées et supérieures à 420-430 Å² pour les étendues.

Table 1: Energie (kcal/mol) et section efficace de diffusion Ω (\AA^2) des conformères repliés et étendus calculées au niveau ONIOM, AM1 et Amber pour $[\text{A}\beta_{12-28}]^{2+}$. La section efficace de diffusion expérimentale est de $422 \pm 8 \text{\AA}^2$.

conformation	d^b	Energie			Ω		
		ONIOM ^a	AM1	Amber	ONIOM	AM1	Amber
Repliée							
F1	6.5	0	10.5	0	415	405	380
F2	9.6	8.5	8	12	415	410	370
F3	13.9	8.5	0	15.5	421	425	388
F4	9.7	10.5	2.5	5.8	409	408	382
F5	12.6	12.5	12	9	410	416	372
F6	15.25	16	16	8.3	419	429	372
F7	16.3	21	16	8	418	420	389
F8	13.6	24.7	22	5	420	427	376
Etendue							
E1	19.5	11	12	28	437	448	432
E2	26.7	13.5	15	10.3	428	430	404
E3	27.2	15	12.6	7	445	449	395
E4	22.4	15.5	15.3	9	425	433	396

^a Energie B3LYP/6-31g(d) de la structure optimisée en ONIOM.

^b distance (\AA) entre les atomes C_α des résidus en position N et C terminale.

Table 2: Energie (kcal/mol) et section efficace de diffusion Ω (\AA^2) des conformères repliés et étendus calculées au niveau ONIOM, AM1 et Amber pour $[\text{A}\beta_{12-28}]^{3+}$. Les sites de protonation sont en K^{16} , K^{28} and H^{13} , sauf pour les conformères E5 and E7 où le troisième proton est en N-terminal. La section efficace de diffusion expérimentale est de $435 \pm 8 \text{\AA}^2$.

conformation	d^b	Energie			Ω		
		ONIOM ^a	AM1	Amber	ONIOM	AM1	Amber
Etendue							
E1	19.6	0	0	2	421	427	401
E2	27.0	7.5	3.5	7.6	445	452	425
E3	24.7	7.5	5	10.1	451	457	421
E4	24.5	9.5	2.3	11.5	449	449	415
E5*	24.0	9.5	19	9.5	432	428	410
E6	24.8	11.5	10	34.1	440	445	419
E7*	23.9	12.5	24	13.3	427	438	419
E8	22.5	19	2	5	442	458	419
Repliée							
F1	9.5	17.7	19.6	16.1	420	425	404
F2	10.8	25	31	24	405	409	376
F3	12.1	24	30.8	22	412	417	399
F4	16.5	34	30	17	410	408	401

^a Energie B3LYP/6-31g(d) de la structure optimisée en ONIOM.

^b distance (\AA) entre les atomes C_α des résidus en position N et C terminale.

* le troisième proton est en N terminal.

Une sélection de famille de structures de plus basse énergie a été reportée dans les tables 1 et 2 pour $[\text{A}\beta_{12-28}]^{2+}$ et $[\text{A}\beta_{12-28}]^{3+}$. On note F_i les structures repliées (folded) et E_i les

structures étendues (extended) qui sont définies suivant le critère de distance d entre les deux C_α des résidus en position N et C terminale. Par chaque conformation, nous avons reporté les énergies des structures optimisées calculées aux niveaux Amber, AM1 et ONIOM, ainsi que les valeurs des sections efficaces de diffusion correspondantes. Pour les structures optimisées en ONIOM, nous avons calculé l'énergie au niveau DFT/B3LYP/6-31G*. Nous n'avons pas pris en compte les énergies relatives des différentes structures calculées au niveau Amber et AM1 car elles présentent une grande dispersion et devraient être moins fiables que celles obtenues au niveau ONIOM. Les conformères ont été classés suivant l'ordre de leurs énergies ONIOM.

D'une manière générale, nous n'avons pas considéré les critères énergétiques comme très pertinents pour estimer la possibilité d'observer telle ou telle structure. Les niveaux de calcul utilisés, même au niveau ONIOM, sont relativement bas, et la dispersion des énergies est très grande pour chaque méthode et entre les méthodes de calculs. De plus, avec la taille du peptide $A\beta_{12-28}$, il devient envisageable que les interactions locales de type liaison hydrogène présentes en solution soient conservées lors du passage à la phase gazeuse. Il est alors possible d'obtenir des conformations relativement hautes en énergie en phase gazeuse mais qui conservent une mémoire de la structure adoptée en phase condensée.

3.2 Interprétation des sections efficaces de diffusion calculées

Remarques générales :

Les sections efficaces calculées des conformères optimisés aux niveaux Amber, AM1 et ONIOM sont reportées aux tables 1 et 2. Pour les deux états de charge, les sections efficaces de diffusion des conformations repliées sont plus basses que celles des conformations étendues, comme attendu. Par contre, les sections efficaces de diffusion calculées à partir des structures optimisées en Amber sont systématiquement plus petites que celles calculées à partir des optimisations AM1 et ONIOM. On peut aussi remarquer que le passage de AM1 à ONIOM n'engendre pas de gros changement de structures et donc de sections efficaces. Les paramètres du champ de force Amber sont optimisés pour simuler des biomolécules en solution, ce qui fait que l'on doit s'attendre à une surestimation de l'interaction électrostatique dans le cas des peptides étudiés en phase gazeuse, sans écrantage

de charge induit par le solvant. Puisque les peptides étudiés sont multi-chargés, la répulsion coulombienne entre les groupes protonés doit être trop importante, ce qui doit se traduire par des structures trop dépliées. Néanmoins, les groupements protonés sont déjà solvatés par des groupements carbonyles et généralement loin les uns des autres. Par contre, une surestimation de la force électrostatique au niveau Amber engendrera des distances inter-atomiques NH...OC trop courtes entre les groupes neutres engagés par liaison hydrogène. Nous avons analysé les distances inter atomiques NH...OC sur plusieurs structures suivant la méthode d'optimisation Amber et AM1. Il est difficile de tirer des conclusions définitives car on observe des variations de l'ordre de $\pm 0.1\text{\AA}$ mais pas toujours dans le même sens suivant les deux méthodes. En moyenne, on peut quand même estimer que le champ de force Amber surestime l'interaction électrostatique de la liaison hydrogène. Il semble donc que ce soit cet effet qui explique la contraction de la structure des peptides en Amber.

Pour $[\text{A}\beta_{12-28}]^{3+}$, la recherche conformationnelle REMD a généré un très grand nombre de structures étendues, avec uniquement quelques groupes de conformations repliées qui sont, en plus, sensiblement plus hautes en énergie (de l'ordre de 20 kcal/mol). Pour le troisième site de protonation, les structures les plus basses en énergie sont celles qui sont protonées sur l'histidine H¹³, puis en N terminal. Les isomères protonés en H¹⁴ ont en moyenne une énergie plus haute ou comparable à celles calculées pour les isomères protonés en position N terminale. Dans les 3 cas, les structures les plus probables sont étendues et la localisation du troisième proton n'affecte pas la structure globale du peptide mais uniquement des interactions locales autour des acides aminés du N terminal. En moyenne, les 8 conformations étendues sélectionnées ont une section efficace de diffusion de 438 Å² compatible avec la valeur expérimentale (435 Å²), alors que les conformations repliées ont en moyenne une section efficace de diffusion (412 Å²) trop petite.

Par contre, pour $[\text{A}\beta_{12-28}]^{2+}$, les sections efficaces de diffusion des conformères repliés sont en moyenne légèrement plus petites (415 Å²) que la valeur expérimentale (422 Å²), et celles des structures dépliées plus grandes (433 Å²). Il n'est donc pas possible d'attribuer d'une manière univoque la structure adoptée par $[\text{A}\beta_{12-28}]^{2+}$ d'après la mesure de mobilité ionique. Nous allons alors tenter d'attribuer ces structures en analysant les spectres IRMPD pour ces deux états de charge.

3.3 Simulations des spectres IRMPD par la méthode ONIOM

Comme il a été décrit au chapitre II, le calcul des spectres vibrationnels des molécules de grande taille contenant plusieurs centaines d'atomes (dans notre cas 276 pour le doublement protoné) pose un vrai challenge. Notre groupe a proposé il y a quelques années d'utiliser la méthode hybride implémentée dans Gaussian 09 ONIOM, où la partie du système la plus pertinente pour la spectroscopie IR est traitée à un niveau quantique, dans notre cas DFT/B3LYP/6-31G*, le reste étant traité à un niveau plus bas mais moins coûteux en temps de calcul, ici AM1. Un point important de ce type de simulation est que nous ne conservons pour l'analyse des fréquences que celles déterminées au niveau quantique. Pratiquement, tous les groupements d'atomes engagés par liaison hydrogène sont traités au niveau DFT, alors que les groupements contenant des chaînes alkyles ou des cycles aromatiques sont inclus dans la couche AM1. Les fréquences calculées pour les modes amide-I et amide-II, les interactions d'un ammonium avec des carbonyles ou un groupement carboxylique (COOH) seront comparés au spectre expérimental (dans la région 1400 – 1800 cm^{-1}), mais la région des basses fréquences correspondant aux modes de vibrations des groupements CH ne pourra pas être correctement simulée.

Pour $[\text{A}\beta_{12-28}]^{3+}$, la mesure de mobilité ionique ainsi que les recherches conformationnelles REMD indiquent que le peptide devrait adopter une structure dépliée. Les spectres simulés des conformères dépliés de plus basse énergie E_1 - E_8 sont comparés au spectre expérimental sur la figure 9. Pour les structures repliées, les spectres simulés sont reportés sur la figure 10. Ces spectres ont été obtenus après convolution par une fonction gaussienne de largeur 25 cm^{-1} . Les spectres des conformères repliés donnent le plus mauvais accord avec le spectre expérimental. En particulier, une transition intense dans le rouge de la bande amide II à 1485 cm^{-1} est prédite qui correspond aux modes de pliages des NH peptidiques libres et qui n'est pas observée expérimentalement. Les conformères repliés ont, pour la plupart une structure sans liaison hydrogène entre les liaisons peptidiques dans la partie N terminale, ce qui se traduit par une bande amide II trop décalée dans le rouge par rapport au spectre expérimental. Ajouté au désaccord observé pour section efficace de diffusion, cela renforce la conclusion qu'elles ne doivent pas être présentes dans les conditions expérimentales.

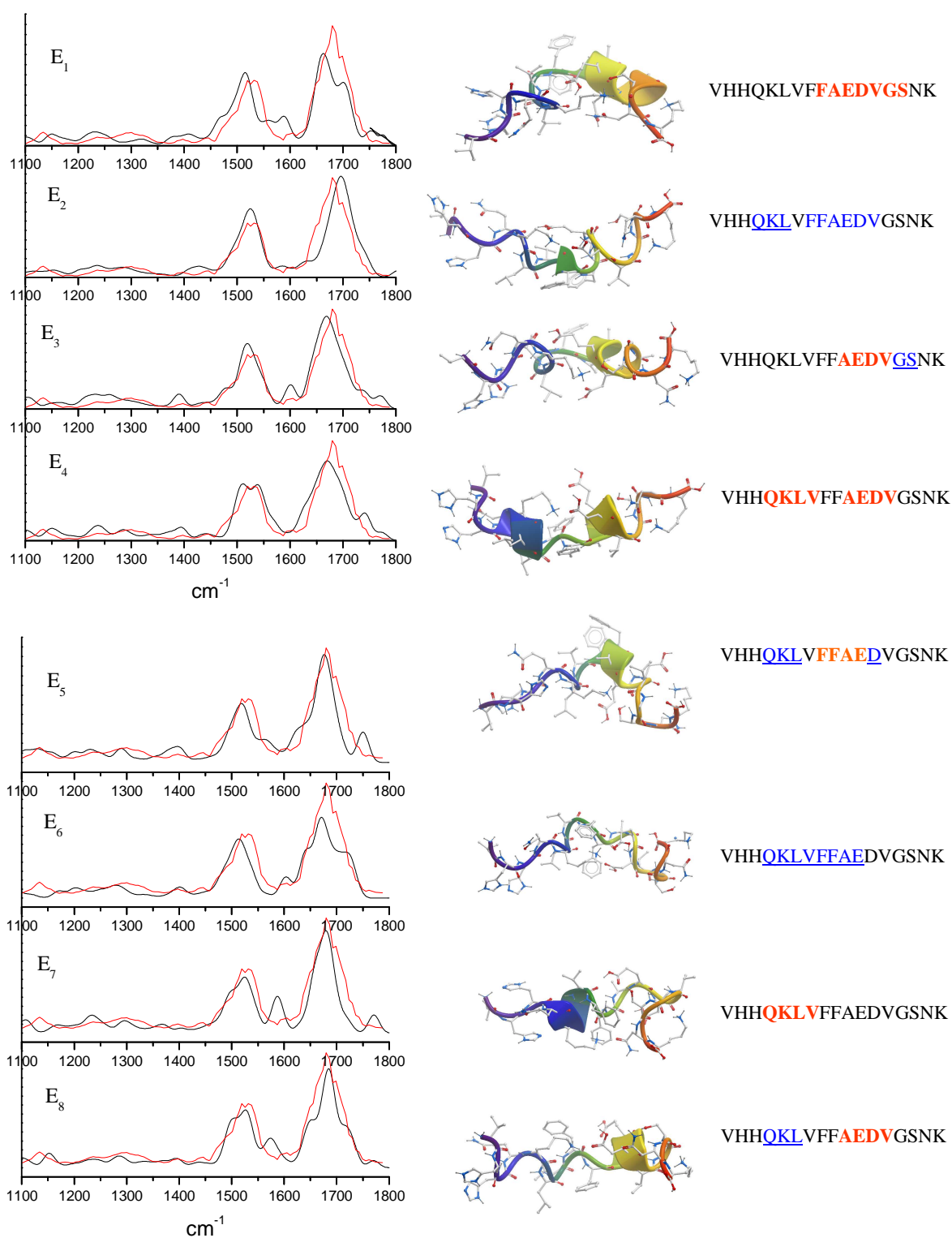


Figure 9: Comparaison entre le spectre IRMPD (trait rouge) et les simulations des spectres vibrationnels des conformères E₁₋₈ de [Aβ₁₂₋₂₈]³⁺. Les structures optimisées sont reportées à droite, avec la séquence d'acides aminés en lettre. Les parties en hélice α sont représentées par des lettres rouges et en gras, les hélices 3₁₀ en bleu surligné, et les interactions C₁₆ en bleu.

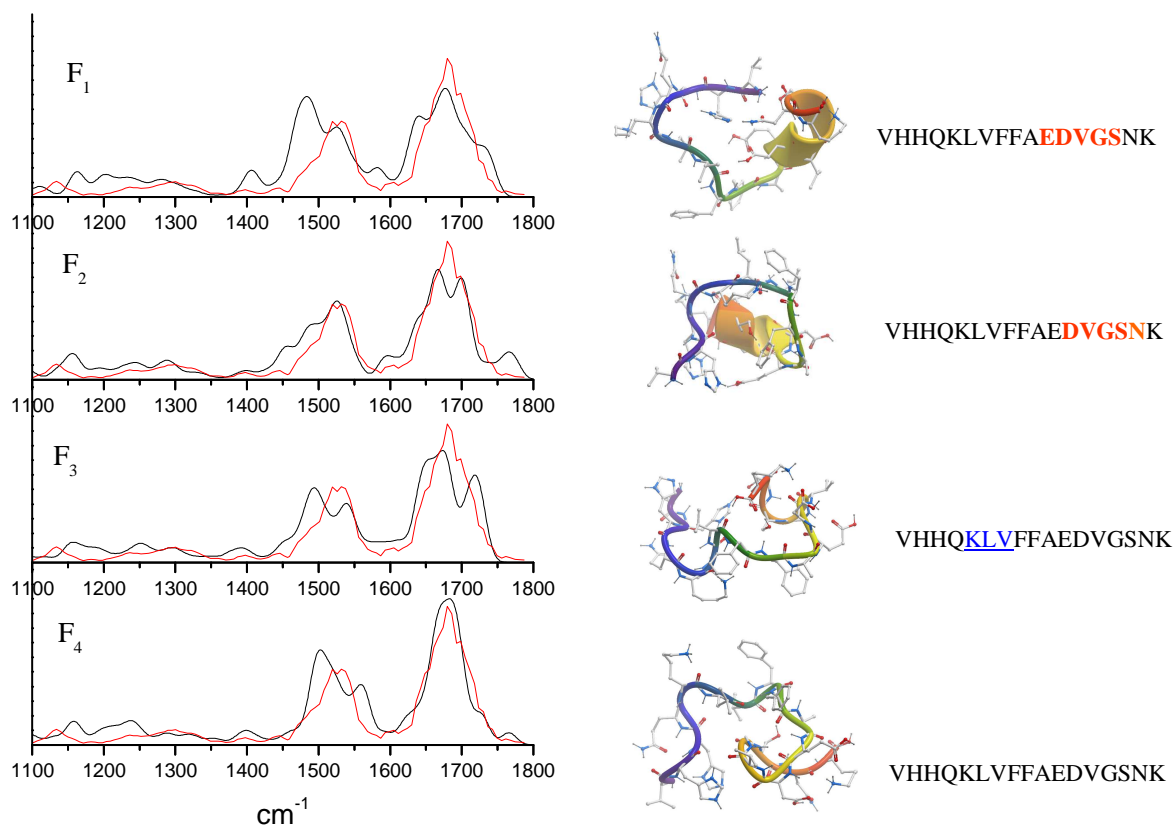


Figure 10 : Comparaison entre le spectre IRMPD (trait rouge) et les simulations des spectres vibrationnels des conformères F_{1-4} de $[A\beta_{12-28}]^{3+}$. Les structures optimisées sont reportées à droite, avec la séquence d'acides aminés en lettre. Les parties en hélice α sont représentées par des lettres rouges et en gras, les hélices 3_{10} en bleu surligné.

Pour les structures étendues, la plupart des conformères ont un spectre vibrationnel compatible avec le spectre expérimental. Les conformères E_3 , E_4 , E_5 , E_7 et E_8 reproduisent le mieux la forme et la position des bandes amide-I et amide-II. Pour les conformère E_1 et E_6 , la bande amide II est un peu trop décalée vers le rouge, alors que la bande amide I du conformère E_2 est un peu décalée vers le bleu. La bande de faible intensité autour de 1600 cm^{-1} correspond à un mode de pliage asymétrique d'un NH_3^+ en interaction avec des groupements CO. Par exemple, pour le conformère E_3 , le groupement ammonium de la lysine K^{28} est en interaction avec le carbonyle de N^{27} et le groupement amide du résidu de l'asparagine. Expérimentalement, une bande de faible intensité est effectivement détectée à cette position.

Tous ces conformères présentent des liaisons hydrogènes C₇, C₁₀ et C₁₃, en plus de groupement NH et CO libres. Les groupements carbonyles les plus décalés dans le rouge du conformère E₃ sont simulés autour de 1640-1655 cm⁻¹, alors que les CO libres le sont à 1715-1725 cm⁻¹. Les simulations des conformations étendues permettent de reproduire correctement le spectre expérimental, mais il est difficile d'attribuer de manière univoque l'une ou l'autre des structures.

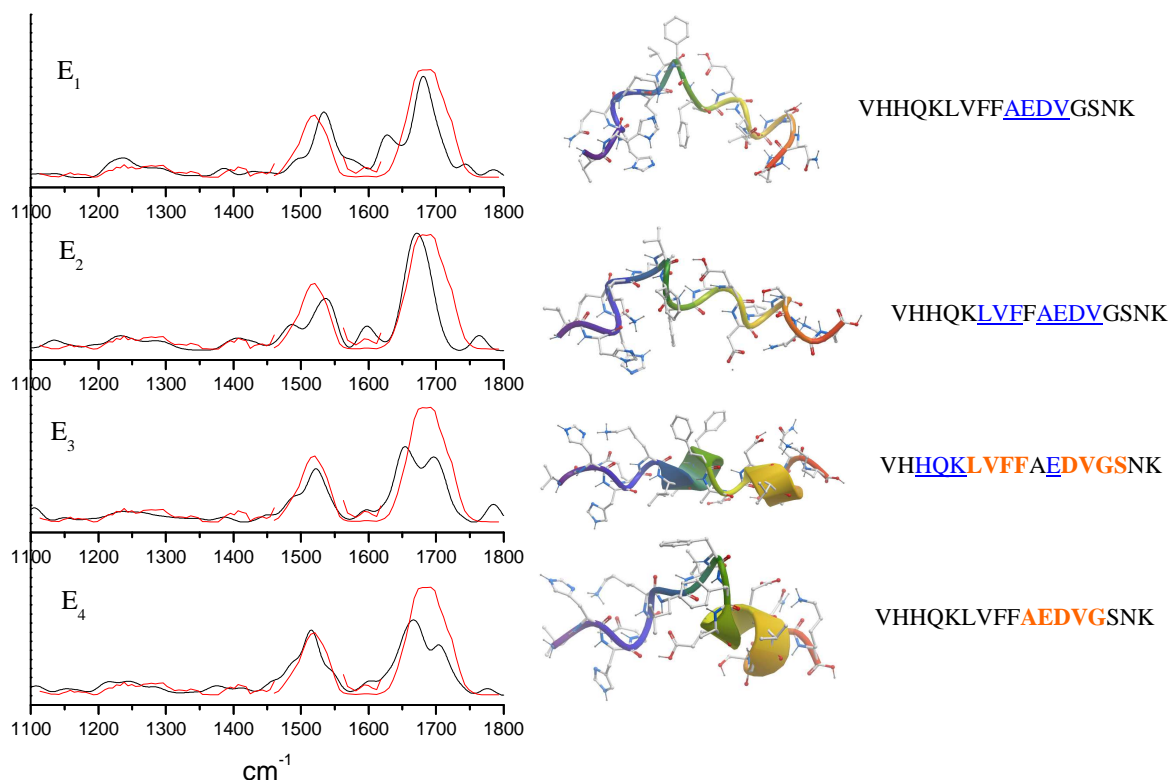


Figure 11 : Comparaison entre le spectre IRMPD (trait rouge) et les simulations des spectres vibrationnels des conformères E₁₋₄ de [Aβ₁₂₋₂₈]²⁺. Les structures optimisées sont reportées à droite, avec la séquence d'acides aminés en lettre. Les parties en hélice α sont représentées par des lettres rouges et en gras, les hélices 3₁₀ en bleu surligné.

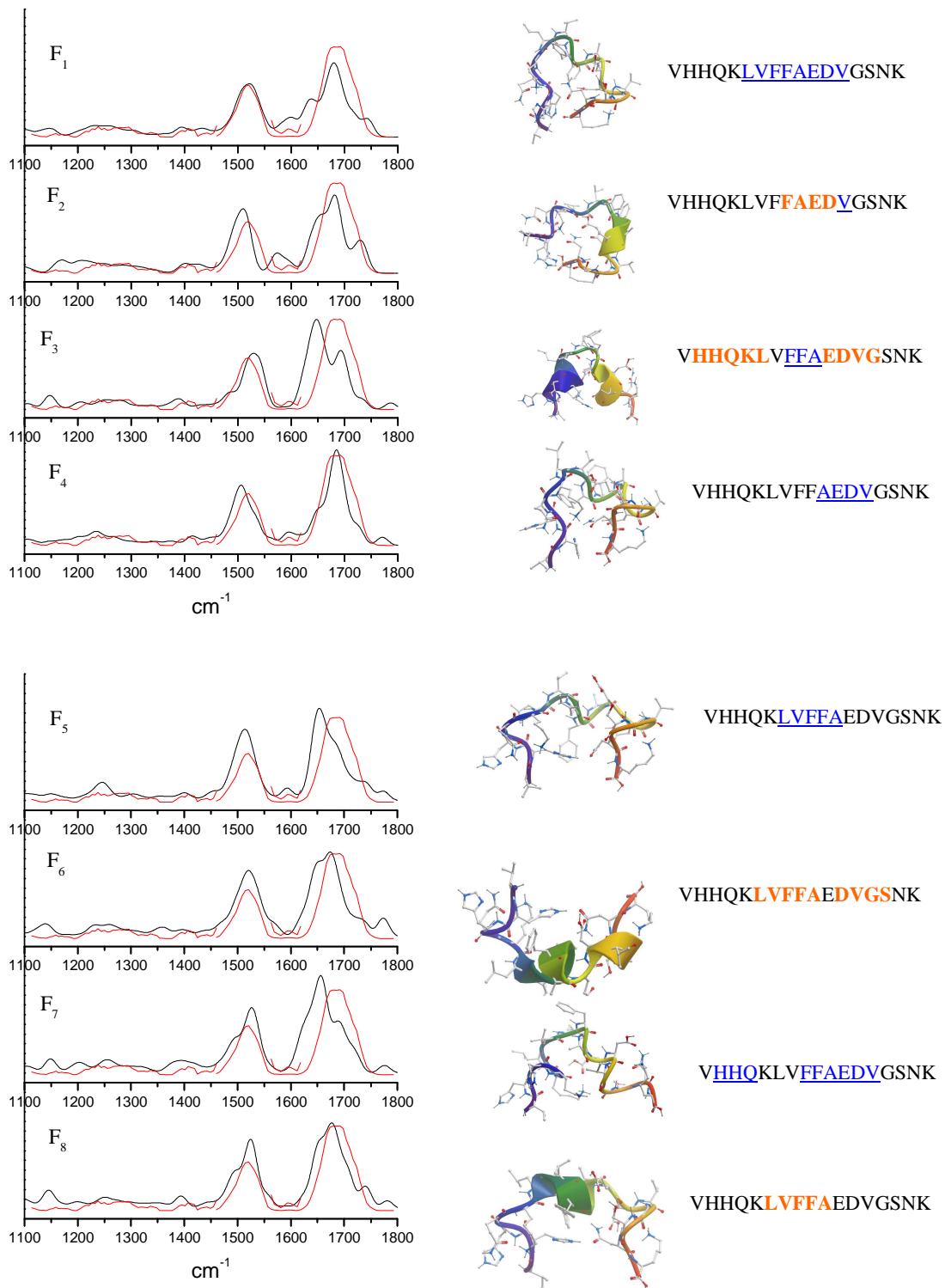


Figure 12 : Comparaison entre le spectre IRMPD (trait rouge) et les simulations des spectres vibrationnels des conformères F_{1-8} de $[A\beta_{12-28}]^{2+}$. Les structures optimisées sont reportées à droite, avec la séquence d'acides aminés en lettre. Les parties en hélice α sont représentées par des lettres rouges et en gras, les hélices 3_{10} en bleu surligné.

Pour $[\text{A}\beta_{12-28}]^{2+}$, les simulations des structures étendues et repliées sont reportées sur les figures 11 et 12. A l'inverse du triplement protoné, les différences entre les deux groupes sont moins prononcées. Dans les deux cas, la largeur des bandes amide I est trop petite, l'épaulement vers le bleu n'étant pas bien simulé. Parmi les conformères repliés, la structure F3 a une bande amide I trop décalée vers le rouge et la bande amide II un peu décalée vers le bleu. Cette structure est caractérisée par la présence de deux parties en hélice α entre les résidus $\text{H}^{13}\text{L}^{17}$ et $\text{E}^{22}\text{G}^{25}$, et des liaisons hydrogènes C_{10} en milieu de la chaîne peptidique ($\text{F}^{19}\text{A}^{21}$) qui explique les décalages spectraux calculés par rapport au spectre expérimental. D'une manière générale, les conformères ($\text{F}_3, \text{F}_5, \text{F}_6$ et F_7) ayant un grand nombre de liaison hydrogène de type C_{10} et C_{13} ont une bande amide I trop décalée vers le rouge. Les conformères repliés $\text{F}_1, \text{F}_4, \text{F}_8$ et, dans une moindre mesure, F_2 donnent un accord satisfaisant avec le spectre expérimental.

Les deux premiers conformères étendus $\text{E}_{1,2}$ ne permettent pas de reproduire correctement le spectre expérimental. Les bandes amide I sont décalées vers le rouge et les bandes amide II sont décalées vers le bleu de $5\text{-}10\text{ cm}^{-1}$. Pour les deux autres structures étendues, le conformères E_3 , qui présente deux sous parties en hélice α , a une bande amide I décalée vers le rouge. Par contre, la simulation du conformère E_4 reproduit correctement le spectre expérimental. Sa section efficace de diffusion étant calculée à 425 \AA^2 , proche de la valeur expérimentale, cette structure ne peut pas être exclue de l'analyse. En complément des mesures de mobilité ionique, l'interprétation du spectre IRMPD semble indiquer que la structure la plus probable pour le peptide $[\text{A}\beta_{12-28}]^{2+}$ est une forme repliée, mais la différenciation entre les deux classes de structures est moins évidente que pour $[\text{A}\beta_{12-28}]^{3+}$.

D'une manière générale, on peut noter que les simulations des différentes structures, repliées ou étendues, ne sont pas très différentes après convolution par une fonction gaussienne de 25 cm^{-1} de large. La faible résolution expérimentale des spectres IRMPD, ainsi que les spectres similaires des deux états de charge ne permettent pas d'attribuer de manière définitive telle ou telle structure pour les peptides amyloïdes $\text{A}\beta_{12-28}$.

3.4 Interprétation des spectres ECD

Afin de proposer une attribution des structures possibles pour les peptides $\text{A}\beta_{12-28}$, nous avons proposé d'interpréter la distribution d'intensité (PIA) des fragments c/z en

fonction de leur localisation le long de la chaîne peptidique. Ces distributions sont reportées à la figure 8 pour $[A\beta_{12-28}]^{2+}$ et $[A\beta_{12-28}]^{3+}$ et sont très différentes, alors que ces deux peptides ne diffèrent que par leur état de charge. Nous proposons de montrer que ces différences très marquées peuvent être interprétées comme la signature des interactions spécifiques des groupements protonés avec les groupements carbonyles le long de la chaîne peptidique.

Les mécanismes proposés pour expliquer la fragmentation spécifique c/z observée en ECD sont encore sujets à discussion. Les deux modèles le plus reconnus sont ceux de Cornell^{34,35} et d'Utah-Washington.^{36,37} Comme nous l'avons indiqué dans le chapitre I, ces deux modèles sont compatibles avec l'hypothèse que la dissociation de la liaison N-C α est reliée à l'interaction d'un groupement chargé sur le carbonyle de la liaison peptidique adjacente. Pour le peptide triplement chargé, nous n'avons pas inclus le troisième site de protonation, soit sur l'histidine soit sur le N terminal, car il interagit exclusivement avec les deux acides aminés adjacents et ne dépend pas de la structure secondaire du peptide. Nous avons donc mesuré les distances N⁺-O entre les groupements ammonium des lysines K¹⁶ et K²⁸ et tous les carbonyles des liaisons peptidiques pour les conformères présentés dans les tableaux 1 et 2.

Les figures 13 et 14 représentent l'inverse des distances calculées N⁺...OC entre les deux lysines et les C=O le long de la chaîne peptique pour les conformères étendus et repliés de $[A\beta_{12-28}]^{3+}$. Dans tous les cas, il existe des interactions fortes entre les groupements protonés et les carbonyles avec des distances proton-oxygène NH+...O comprises entre 1.8 et 3 Å, ce qui se traduit par des distances inverses N...O dans la gamme 0.25-0.4 Å⁻¹. Ces histogrammes sont à comparer à la distribution d'intensité (PIA) des fragments c/z présentée à la figure 8b qui présente une série de maxima aux positions 15-16, 18-19, 22, en plus des fragments intenses c₂₇, c₂₅ et c₂₄ doublement chargé. On peut remarquer qu'aucun des conformères sélectionnés ne permet de reproduire à lui seul la distribution des fragments c/z observée expérimentalement. Ceci n'est pas surprenant car il est très peu probable qu'une seule conformation soit peuplée dans nos conditions expérimentales, ce qui est confirmé par l'analyse des résultats de mobilité et de spectroscopie IR.

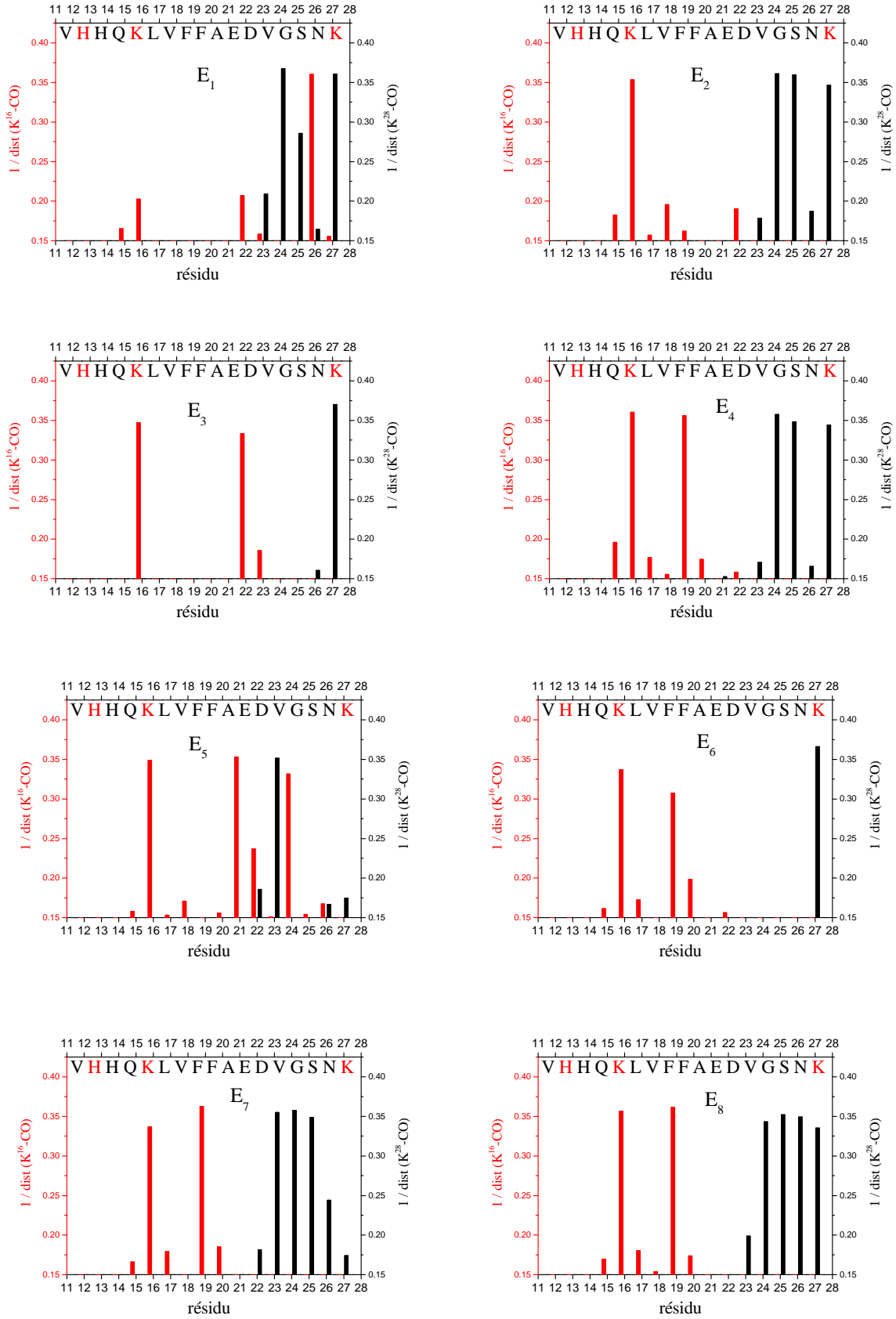


Figure 13 : Inverse des distances entre NH₃⁺ (K16;K28) et CO pour les conformations étendues de [Aβ₁₂₋₂₈]³⁺.

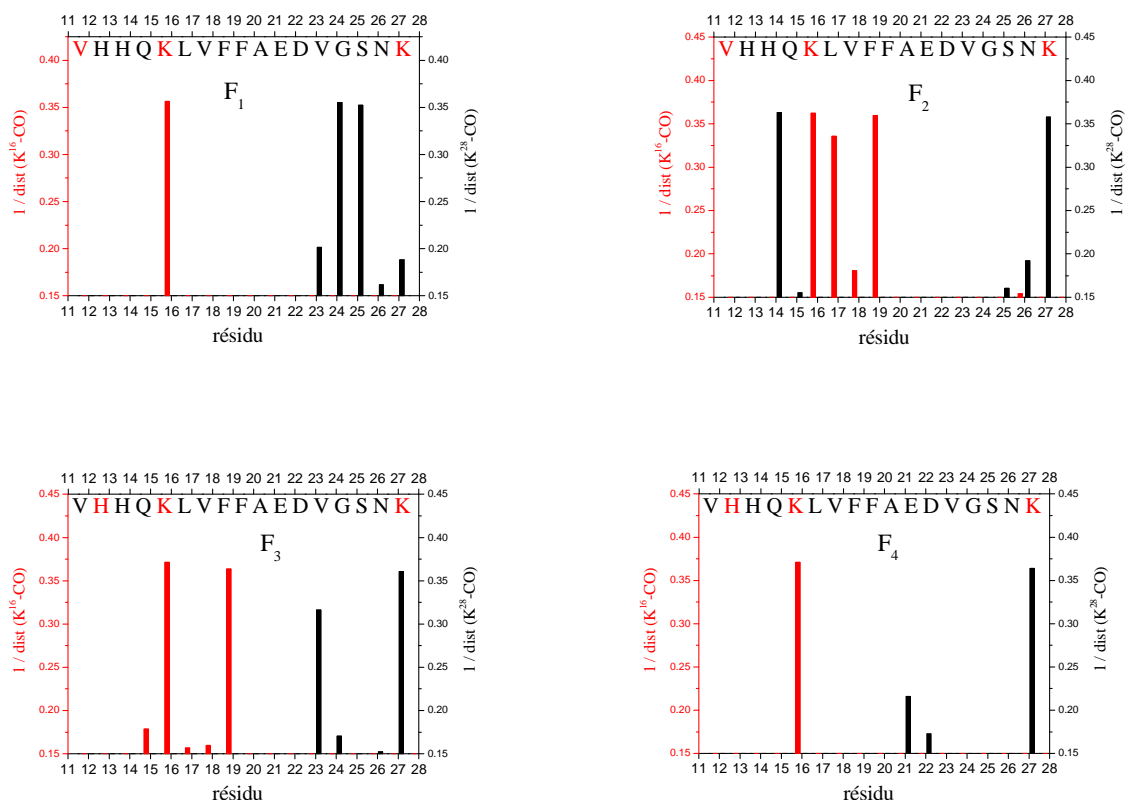


Figure 14 : Inverse des distances entre NH₃⁺ (K16 ;K28) et CO pour les conformations repliées de [Aβ₁₂₋₂₈]³⁺.

Pour toutes les structures sélectionnées de [Aβ₁₂₋₂₈]³⁺, il existe une interaction forte entre le groupement ammonium de la lysine K¹⁶ et le carbonyle adjacent CO¹⁶, quel que soit le type de conformations. La longue chaîne alkyle (CH₂)₄ du résidu de la lysine permet ce type de repliement. On constate aussi que, pour les conformères étendus E₄, E₆₋₈ et les conformations repliées F_{2,3}, ce même groupement ammonium interagit avec le carbonyle du résidu F¹⁹, ce qui pourrait expliquer les maxima en position 16 et 19 de la distribution des fragment c/z. Par contre, seul la structure E₃ présente une interaction forte entre le NH₃⁺ de la lysine K¹⁶ et le carbonyle de E²², alors que la distribution PIA présente un maximum à cette position pour les deux états de charge. Le groupement protoné de la lysine K²⁸ interagit principalement sur les liaisons peptidiques adjacentes en position 24-25 et en position 27. Ces interactions sont certainement corrélée à l'observation des fragment doublement chargés c₂₇²⁺, [c₂₅-NH₃]²⁺ et [c₂₄-NH₃]²⁺.

Pour $[A\beta_{12-28}]^{2+}$, la distribution expérimentale des fragments c/z est concentrée aux deux extrémités de la chaîne, sans fragmentation entre les résidus 16 et 21. Pour toutes les structures repliées sélectionnées F₁₋₈ (figure 15), les groupements ammonium des lysines K¹⁶ et K²⁸ n'interagissent effectivement pas avec ces liaisons peptidiques, alors que les conformères étendus E₁₋₂ présentent une interaction forte sur le carbonyle du résidu F¹⁹. Les structures repliées F₃ et F₇ peuvent aussi être exclues de l'analyse car elles présentent une interaction de la lysine K¹⁶ sur le carbonyle du résidu G²⁵, ce qui devrait engendrer l'observation d'un fragment z₂₅ et non c₂₅. Comme pour le triplement chargé, on détecte un fragment relativement intense c₂₂ qui n'est pas corrélé avec une interaction spécifique de la lysine K²⁸ sur le carbonyle de E²². Pour les structures repliées (figure 15), le groupement ammonium de la lysine K²⁸ interagit avec plus de carbonyles adjacents (2, 3 ou 4) que la lysine K¹⁶ (au maximum 2). Ceci est en accord avec le plus grand nombre de fragment c₂₂₋₂₇ détecté par rapport aux fragments z₁₂₋₁₅. On peut remarquer aussi qu'aucune des structures (sauf E₁ mais qui correspond à un spectre IR médiocre) ne peut expliquer le fragment intense c₂₆.

Pour les deux états de charge, il existe un maximum dans la distribution d'intensité des fragments c/z à la position 22, qui correspond à la rupture de la liaison N-C_α entre les résidus acides E²² et D²³. Or, nous ne retrouvons pas dans les structures sélectionnées une interaction privilégiée entre les groupements protonés des lysines K¹⁶ et K²⁸ avec le carbonyle de cette liaison peptidique. Zubarev *et al.*³⁸ ont réalisé une étude statistique de la distribution d'intensité des fragments c/z sur 15000 spectres de masse ECD de peptides doublement protonés. Ils ont montré que la plus forte probabilité de rupture de la liaison N-C_α est observée entre les résidus D-A, D-N, E-N, D-H et Q-N, ce qui indique donc une préférence pour les acides aminés acides. Il n'a pas été donné d'explication, notamment sur le rôle possible du groupement acide carboxylique COOH du résidu, sur la probabilité de rupture de la liaison peptidique adjacente. Le maximum observé, en position 22 dans notre cas entre les deux acides aminés acides, est en tout cas compatible avec cette analyse statistique.

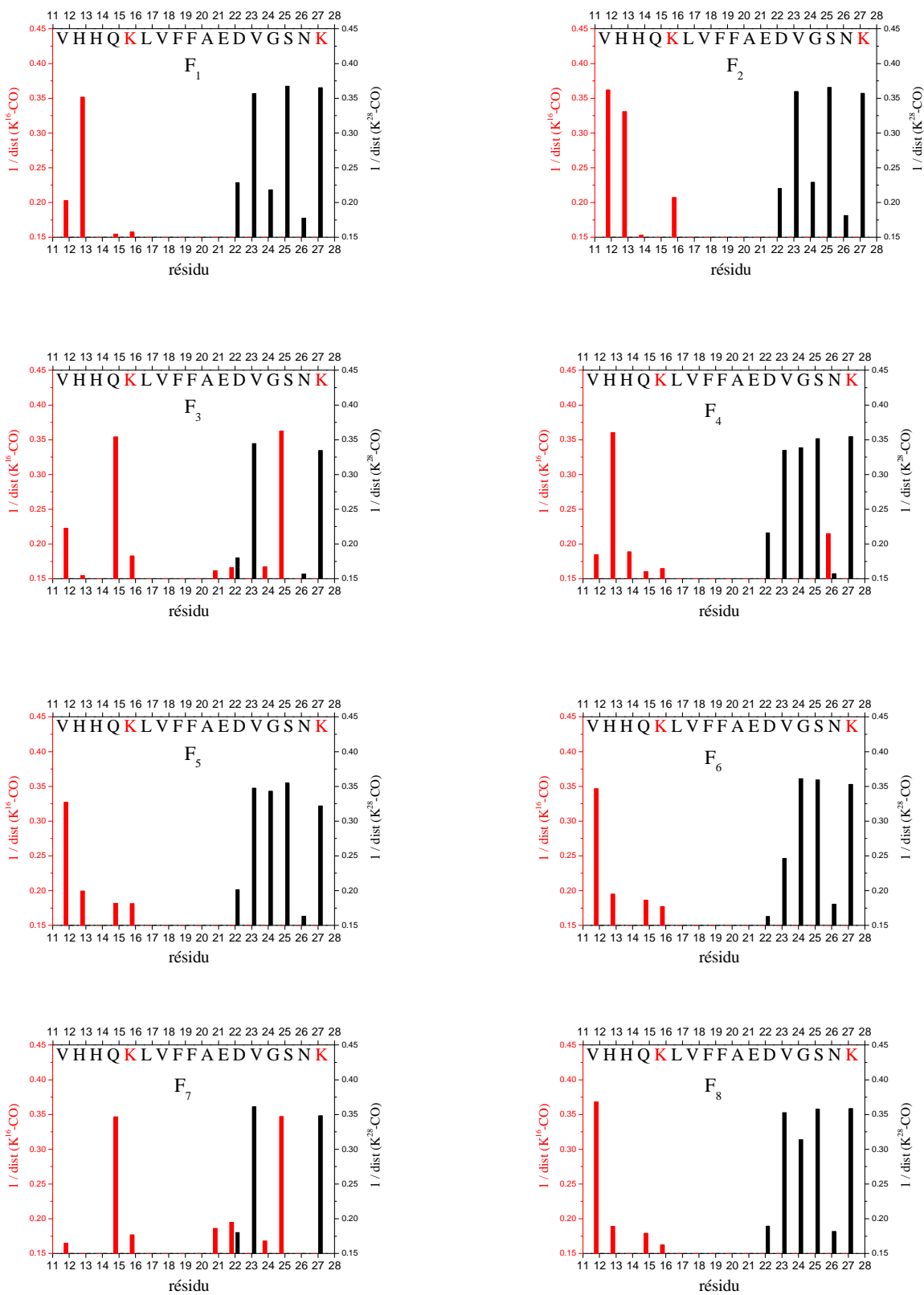


Figure 15 : Inverse des distances entre NH₃⁺ (K16;K28) et CO pour les conformations repliées de [Aβ₁₂₋₂₈]²⁺.

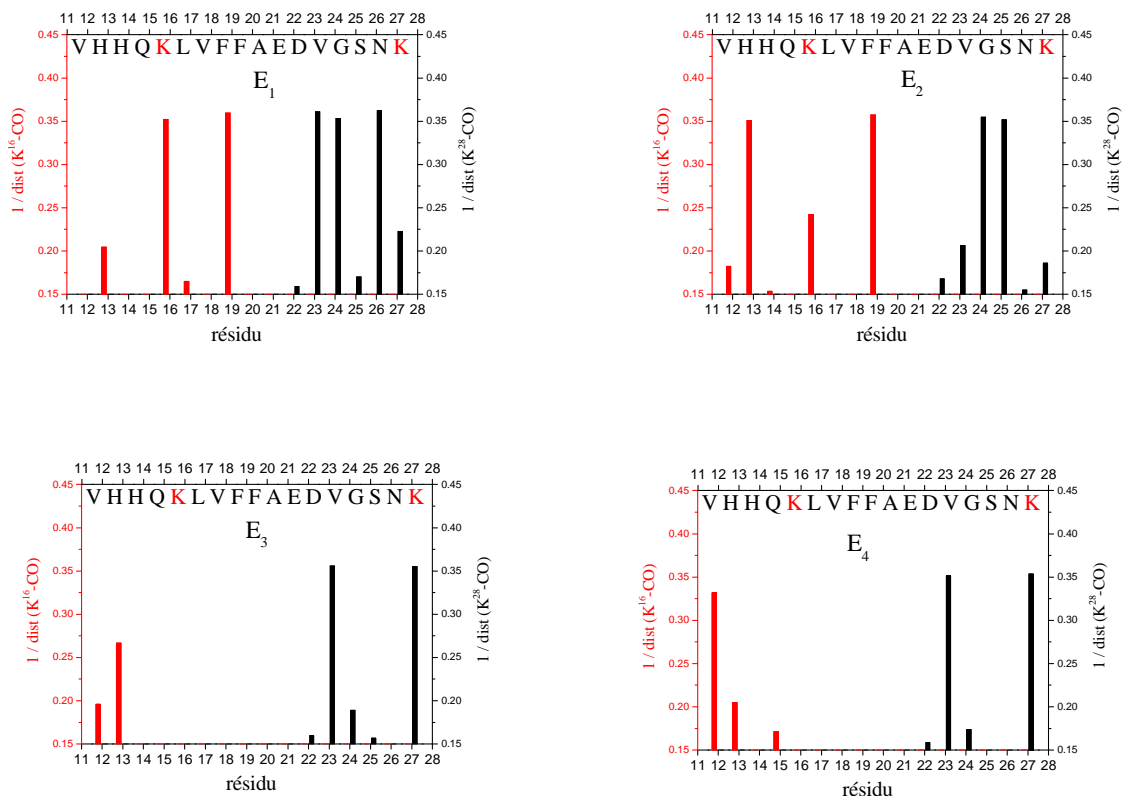


Figure 16 : Inverse des distances entre NH₃⁺ (K16 ;K28) et CO pour les conformations étendues de [Aβ₁₂₋₂₈]²⁺.

L'absence de fragmentation au milieu de la chaîne peptidique pour [Aβ₁₂₋₂₈]²⁺, ainsi que la détection d'un signal d'ion à la masse du peptide réduit pourrait être le signe de la présence de complexes métastables ion-neutre formés entre les ions c/z et les fragments neutres complémentaires qui ne se dissocient pas. En effet, l'énergie cinétique des fragments c/z pourrait être plus petite que l'énergie d'interaction du complexe contenant de nombreuses liaisons hydrogènes entre les résidus des parties N et C terminales. Comme nous l'avons indiqué dans le chapitre I, une excitation post-ECD sur l'espèce réduite peut mettre en évidence de nouveaux fragments et révéler ainsi la présence de complexes métastables. Nous n'avons pas pu faire ce type d'expérience complémentaire à l'époque sur le dispositif de Polytechnique. Dans le cas des tryptophanes zipper (chapitre IV), les spectres de masse d'excitation post-ECD n'ont pas mis en évidence de nouveaux fragments, alors que la distribution d'intensité des fragments c/z présente les mêmes caractéristiques que celles observées pour [Aβ₁₂₋₂₈]²⁺. Même si nous ne pouvons pas exclure ce biais pour [Aβ₁₂₋₂₈]²⁺, l'analyse de la distribution d'intensité des fragments c/z faite sur les peptides amyloïdes est en

accord avec les structures sélectionnées par l'expérience de mobilité ionique et la spectroscopie IRMPD.

4. Conclusion

L'analyse des résultats de mobilité et spectroscopie IR indiquait que plusieurs conformations devaient être peuplées dans nos conditions expérimentales. L'analyse des données ECD permet de confirmer et même d'affiner la première sélection. Pour $[A\beta_{12-28}]^{3+}$, les conformations étendues donnent un bon accord avec les résultats de mobilité, et les structures $E_{3,4,7-8}$ permettent de reproduire le spectre IRMPD. A l'inverse, les quatre conformères repliés F_{1-4} ont été exclus. L'inverse des distances $N^+...O$ des quatre structures $E_{3,4,7,8}$ est comparée à la distribution totale des fragments c/z à la figure 17. Ce sont ces conformères qui reproduisent le mieux la distribution PIA avec des maxima en position 16, 19 et 22 pour la lysine K^{16} et en position 24, 25 et 27 pour la lysine K^{28} qui est corrélé à la détection des fragments c doublement chargés. Le spectre IR simulé moyenné sur ces conformères est reporté sur la même figure, et l'accord avec le spectre IRMPD est très bon. La section efficace moyenne sur ces cinq structures est de 442 \AA^2 , ce qui est cohérent avec la mesure de $435 \pm 8 \text{ \AA}^2$. Par contre, pour les autres structures étendues $E_{1,2,5,6}$ (figure 18), la simulation du spectre IR est satisfaisante et la section efficace moyenne sur ces trois structures est de 434 \AA^2 mais on ne retrouve pas une aussi bonne corrélation sur les données ECD. Pour les structures repliées F_{1-4} (figure 19), les simulations IR et ECD ne donnent pas un bon accord. De plus, la valeur moyenne de la section efficace de diffusion est trop petite (412 \AA^2).

Pour $[A\beta_{12-28}]^{2+}$, ce sont les structures $F_{1,2,4,8}$ et E_4 qui donnent le meilleur accord pour simuler le spectre IR et la distribution PIA des fragments c/z en ECD (figure 20). La valeur moyenne des sections efficaces de diffusion est de 417 \AA^2 , ce qui est compatible avec la valeur expérimentale de $422 \pm 8 \text{ \AA}^2$. Pour les autres structures repliées qui ont, elles aussi, une valeur moyenne de section efficace de diffusion de 417 \AA^2 , la corrélation entre l'inverse des distances $N...O$ et la distribution PIA des fragments c/z est moins bonne et la bande amide I simulée du spectre IR est trop décalée vers le rouge (figure 21). Pour les trois conformères étendus $E_{1,2,3}$, ni la valeur moyenne des sections efficaces de diffusion (437 \AA^2), ni les simulations IRMPD et ECD ne sont compatibles avec les données expérimentales (figure 22).

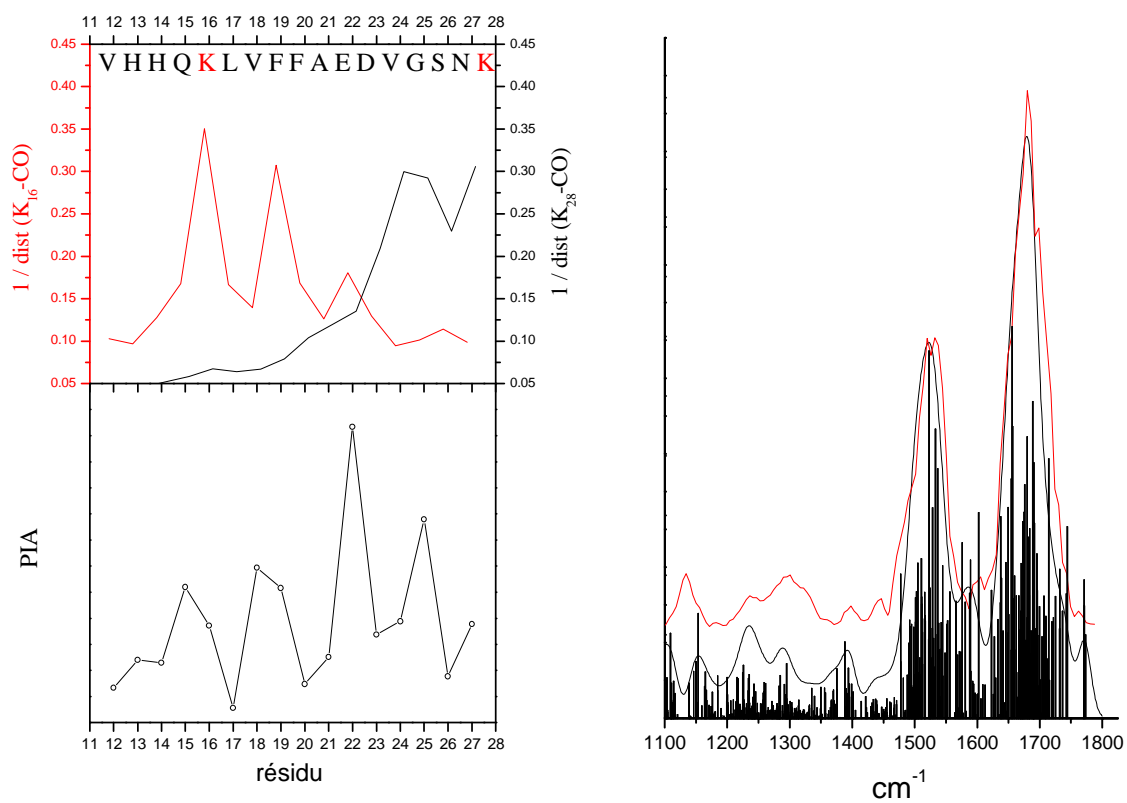


Figure 17: Comparaison entre la distribution des fragments c/z (bas) et les interactions des groupements protonés en K16 et K28 avec les carbonyles des résidus le long de la chaîne peptidique de $[\text{A}\beta_{12-28}]^{3+}$ pour les conformères $\text{E}_{3,4,7,8}$ représentés ci-dessus.

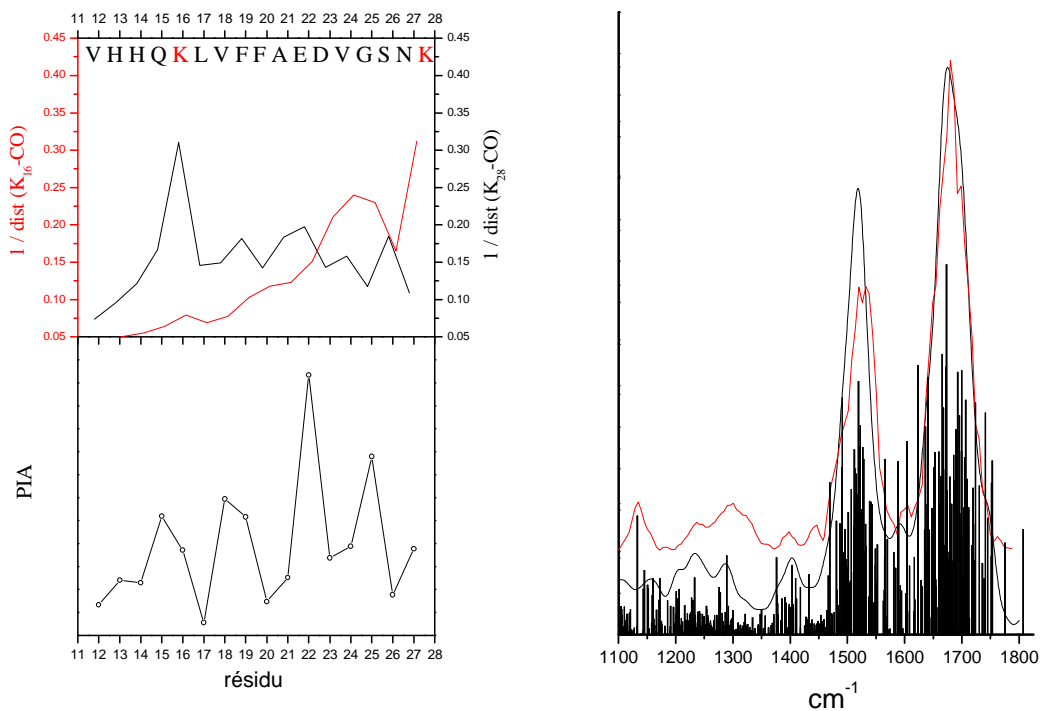


Figure 18: Comparaison entre la distribution des fragments *c/z* (bas) et les interactions des groupements protonés en K16 et K28 avec les carbonyles des résidus le long de la chaîne peptidique de $[\text{A}\beta_{12-28}]^{3+}$ pour les conformères $E_{1,2,5,6}$.

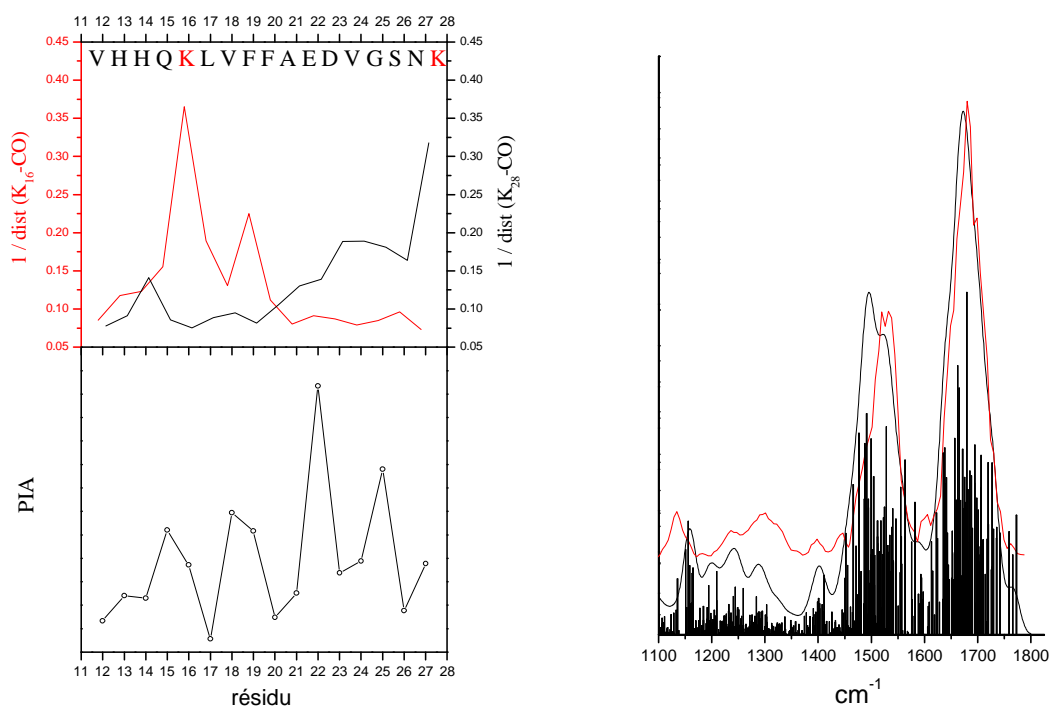


Figure 19: Comparaison entre la distribution des fragments *c/z* (bas) et les interactions des groupements protonés en K16 et K28 avec les carbonyles des résidus le long de la chaîne peptidique de $[\text{A}\beta_{12-28}]^{3+}$ pour les conformères F_{1-4} .

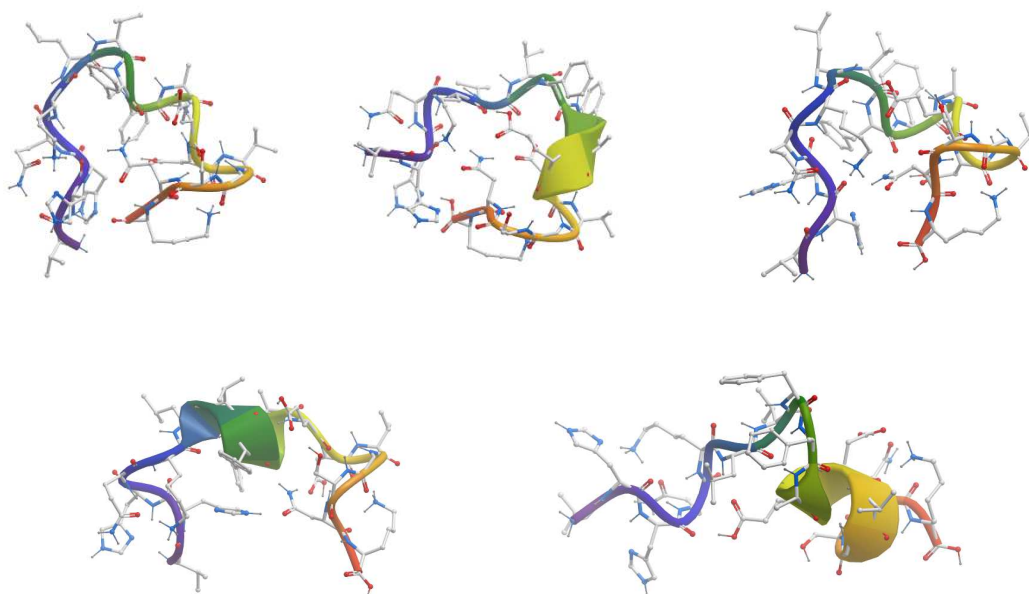
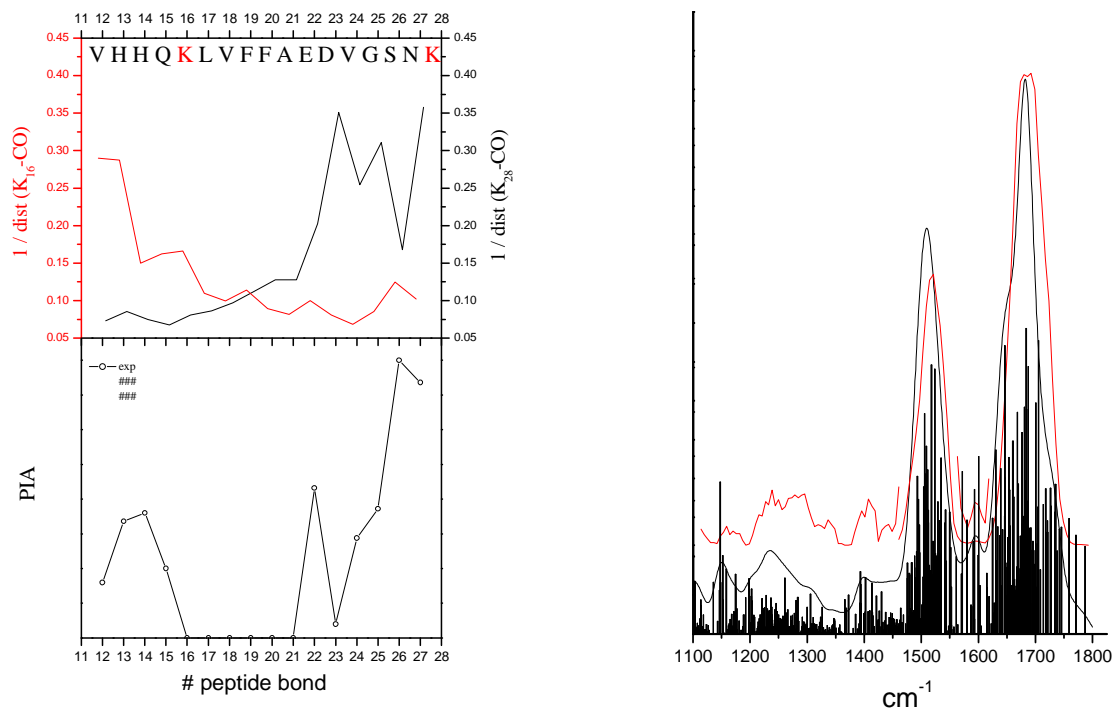


Figure 20: Comparaison entre la distribution des fragments c/z (bas) et les interactions des groupements protonés en K16 et K28 avec les carbonyles des résidus le long de la chaîne peptidique de $[A\beta_{12-28}]^{2+}$ pour les conformères $F_{1,2,4,8}$ et E_4 représentés ci-dessus.

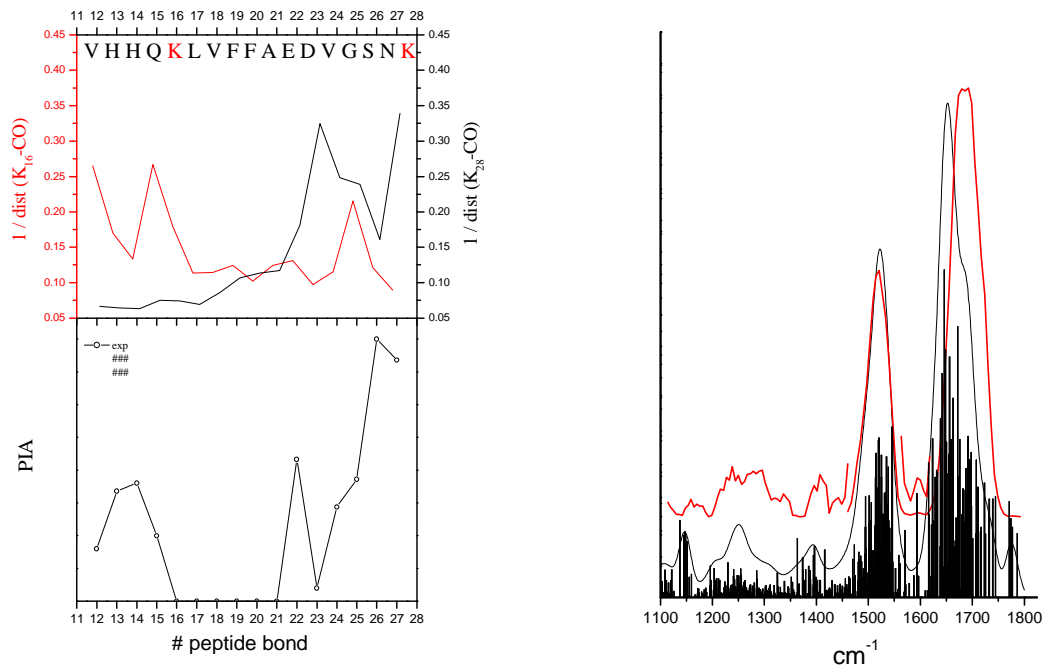


Figure 21: Comparaison entre la distribution des fragments c/z (bas) et les interactions des groupements protonés en K16 et K28 avec les carbonyles des résidus le long de la chaîne peptidique de $[\text{A}\beta_{12-28}]^{2+}$ pour les conformères $F_{3,5,6,7}$.

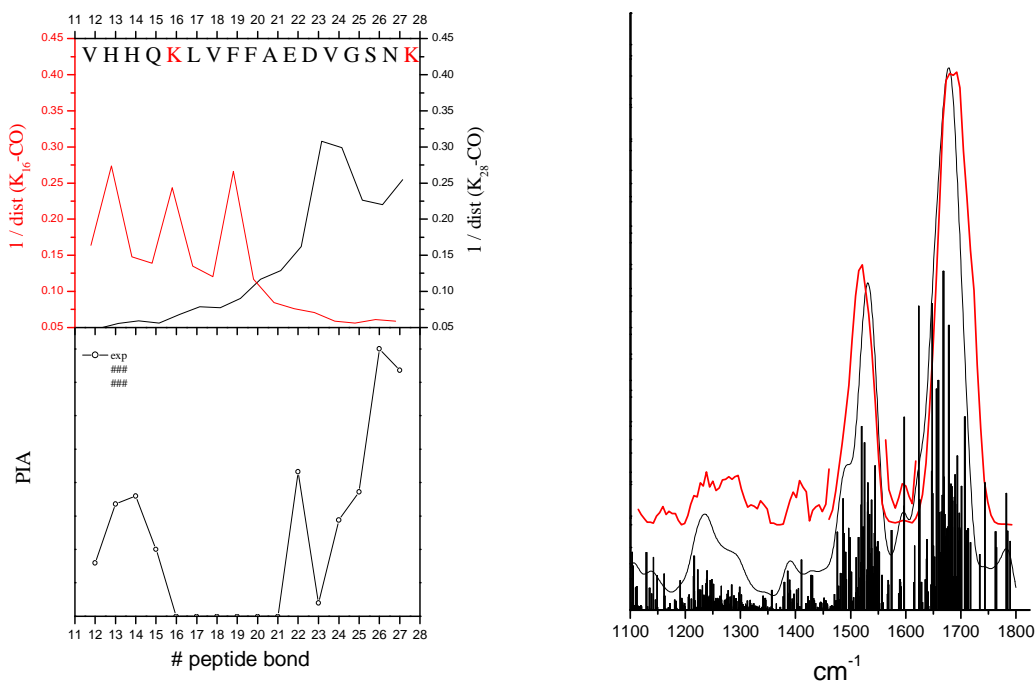


Figure 22: Comparaison entre la distribution des fragments c/z (bas) et les interactions des groupements protonés en K16 et K28 avec les carbonyles des résidus le long de la chaîne peptidique de $[\text{A}\beta_{12-28}]^{2+}$ pour les conformères E_{1-3} .

Nous avons donc mis en évidence une transition structurale entre une forme repliée, formant une boucle, vers une structure étendue avec des domaines en hélices dans le peptide amyloïde A β ₁₂₋₂₈ induite par l'augmentation de l'état de charge. Ce résultat est en accord avec les conclusions des études effectuées en phase condensée où le peptide a une plus forte probabilité de former des hélices à bas pH. De plus, nous pouvons remarquer que, dans les structures repliées, la partie L¹⁷VVF²⁰ qui correspond au domaine hydrophobique central (CHC) considéré comme essentiel pour l'agrégation de la protéine A β ₁₋₄₂,³⁹ est dépliée, sans liaison hydrogène bien établie, avec un motif en feuillet β .⁴⁰ Cette partie centrale dépliée peut faciliter le repliement du peptide et l'équilibre observée en RMN entre des formes hélicoïdales 3₁ et en pelote (random coil).⁴¹

Références

1. Roychaudhuri, R., Yang, M., Hoshi, M. M. & Teplow, D. B. Amyloid beta-Protein Assembly and Alzheimer Disease. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 4749-4753 (2009).
2. Murphy, R. M. Kinetics of amyloid formation and membrane interaction with amyloidogenic proteins 10.1016/j.bbamem.2006.12.014. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1768**, 1923-1934 (2007).
3. Stephenson, V. C., Heyding, R. A. & Weaver, D. F. The "promiscuous drug concept" with applications to Alzheimer's disease. *Febs Letters* **579**, 1338-1342 (2005).
4. Dyson, H. J., Rance, M., Houghten, R. A., Wright, P. E. & Lerner, R. A. Folding of Immunogenic Peptide-Fragments of Proteins in Water Solution .2. The Nascent Helix. *Journal of Molecular Biology* **201**, 201-217 (1988).
5. Roccatano, D., Colombo, G., Fioroni, M. & Mark, A. E. Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: A molecular dynamics study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 12179-12184 (2002).
6. Hou, L. M. et al. Solution NMR studies of the A beta(1-40) and A beta(1-42) peptides establish that the met35 oxidation state affects the mechanism of amyloid formation. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 1992-2005 (2004).
7. Barrow, C. J. & Zagorski, M. G. Solution Structures of Beta Peptide and Its Constituent Fragments - Relation to Amyloid Deposition. *Science* **253**, 179-182 (1991).
8. Barrow, C. J., Yasuda, A., Kenny, P. T. M. & Zagorski, M. G. Solution Conformations and Aggregational Properties of Synthetic Amyloid Beta-Peptides of Alzheimers-Disease - Analysis of Circular-Dichroism Spectra. *Journal of Molecular Biology* **225**, 1075-1093 (1992).
9. Fraser, P. E., Levesque, L. & McLachlan, D. R. Alzheimer a-Beta Amyloid Forms an Inhibitory Neuronal Substrate. *Journal of Neurochemistry* **62**, 1227-1230 (1994).
10. Jarvet, J., Damberg, P., Bodell, K., Eriksson, L. E. G. & Graslund, A. Reversible random coil to beta-sheet transition and the early stage of aggregation of the A beta(12-28) fragment from the Alzheimer peptide. *Journal of the American Chemical Society* **122**, 4261-4268 (2000).

11. Danielsson, J., Jarvet, J., Damberg, P. & Graslund, A. The Alzheimer beta-peptide shows temperature-dependent transitions between left-handed 3(1)-helix, beta-strand and random coil secondary structures. *Febs Journal* **272**, 3938-3949 (2005).
12. Daidone, I. et al. beta-hairpin conformation of fibrillogenic peptides: Structure and alpha-beta transition mechanism revealed by molecular dynamics simulations. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **57**, 198-204 (2004).
13. Simona, F., Tiana, G., Broglia, R. A. & Colombo, G. Modeling the alpha-helix to beta-hairpin transition mechanism and the formation of oligomeric aggregates of the fibrillogenic peptide A beta(12-28): insights from all-atom molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Graphics & Modelling* **23**, 263-273 (2004).
14. Baumketner, A. & Shea, J. E. Folding landscapes of the Alzheimer amyloid-beta(12-28) peptide. *Journal of Molecular Biology* **362**, 567-579 (2006).
15. Ma, K. et al. Residue-specific pK(a) measurements of the beta-peptide and mechanism of pH-induced amyloid formation. *Journal of the American Chemical Society* **121**, 8698-8706 (1999).
16. Fraser, P. E., Nguyen, J. T., Surewicz, W. K. & Kirschner, D. A. Ph-Dependent Structural Transitions of Alzheimer Amyloid Peptides. *Biophysical Journal* **60**, 1190-1201 (1991).
17. Bernstein, S. L. et al. Amyloid beta-protein: Monomer structure and early aggregation states of A beta 42 and its Pro(19) alloform. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 2075-2084 (2005).
18. Krone, M. G. et al. Effects of familial Alzheimer's disease mutations on the folding nucleation of the amyloid beta-protein. *Journal of Molecular Biology* **381**, 221-228 (2008).
19. Murray, M. M. et al. Amyloid beta-Protein: Experiment and Theory on the 21-30 Fragment. *Journal of Physical Chemistry B* **113**, 6041-6046 (2009).
20. Murray, M. M. et al. Amyloid beta Protein: A beta 40 Inhibits A beta 42 Oligomerization. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 6316-+ (2009).
21. Bernstein, S. L. et al. Amyloid-beta protein oligomerization and the importance of tetramers and dodecamers in the aetiology of Alzheimer's disease. *Nature Chemistry* **1**, 326-331 (2009).
22. Drayss, M. K. et al. Gas-phase structures of solution-phase zwitterions: Charge solvation or salt bridge? *International Journal of Mass Spectrometry* **281**, 97-100 (2009).
23. Joly, L. et al. Optical and Structural Properties of Copper-Oxytocin Dications in the Gas Phase. *Journal of Physical Chemistry B* **113**, 11293-11300 (2009).
24. Pouilly, J. C. et al. Combining ion mobility mass spectrometry and infrared multiphoton dissociation spectroscopy to probe the structure of gas-phase vancomycin-Ac(2)(L)K(D)A(D)A non-covalent complex. *International Journal of Mass Spectrometry* **297**, 28-35 (2010).
25. Pouilly, J. C., Gregoire, G., Ballivian, R., Dugourd, P. & Schermann, J. P. Coupling infrared multiphoton dissociation spectroscopy, mass-spectrometry and ion mobility spectrometry for the determination of structures of angiotensin II cations. *Vibrational Spectroscopy* **56**, 105-109 (2011).
26. Papadopoulos, G., Svendsen, A., Boyarkin, O. V. & Rizzo, T. R. Spectroscopy of mobility-selected biomolecular ions. *Faraday Discussions* **150**, 243-255 (2011).
27. Papadopoulos, G., Svendsen, A., Boyarkin, O. V. & Rizzo, T. R. Conformational Distribution of Bradykinin bk+2 H (2+) Revealed by Cold Ion Spectroscopy Coupled with FAIMS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **23**, 1173-1181 (2012).

28. Stearns, J. A., Seabiy, C., Boyarkin, O. V. & Rizzo, T. R. Spectroscopy and conformational preferences of gas-phase helices. *Physical Chemistry Chemical Physics* **11**, 125-132 (2009).
29. Vaden, T. D. et al. Conformational Preferences of an Amyloidogenic Peptide: IR Spectroscopy of Ac-VQIVYK-NHMe. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 14640-14650 (2008).
30. Perez, M. et al. The role of the VQIVYK peptide in tau protein phosphorylation. *Journal of Neurochemistry* **103**, 1447-1460 (2007).
31. Revercomb, H. E. & Mason, E. A. Theory of Plasma Chromatography Gaseous Electrophoresis - Review. *Analytical Chemistry* **47**, 970-983 (1975).
32. Gill, A. C., Jennings, K. R., Wytttenbach, T. & Bowers, M. T. Conformations of biopolymers in the gas phase: a new mass spectrometric method. *International Journal of Mass Spectrometry* **195**, 685-697 (2000).
33. Rossi, M. et al. Secondary Structure of Ac-Ala(n)-LysH(+) Polyalanine Peptides (n=5, 10, 15) in Vacuo: Helical or Not? *Journal of Physical Chemistry Letters* **1**, 3465-3470 (2010).
34. Zubarev, R. A., Haselmann, K. F., Budnik, B., Kjeldsen, F. & Jensen, F. Towards an understanding of the mechanism of electron-capture dissociation: a historical perspective and modern ideas. *European Journal of Mass Spectrometry* **8**, 337-349 (2002).
35. Turecek, F. & Julian, R. R. Peptide Radicals and Cation Radicals in the Gas Phase. *Chemical Reviews* **113**, 6691-6733 (2013).
36. Syrstad, E. A. & Turecek, F. Toward a general mechanism of electron capture dissociation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **16**, 208-224 (2005).
37. Sobczyk, M. et al. Coulomb-assisted dissociative electron attachment: Application to a model peptide. *Journal of Physical Chemistry A* **109**, 250-258 (2005).
38. Savitski, M. M., Kjeldsen, F., Nielsen, M. L. & Zubarev, R. A. Complementary sequence preferences of electron-capture dissociation and vibrational excitation in fragmentation of polypeptide polycations. *Angewandte Chemie-International Edition* **45**, 5301-5303 (2006).
39. Lynn, D. G. & Meredith, S. C. Review: Model peptides and the physicochemical approach to beta-amyloids. *Journal of Structural Biology* **130**, 153-173 (2000).
40. Klimov, D. K. & Thirumalai, D. Dissecting the assembly of A beta(16-22) amyloid peptides into antiparallel beta sheets. *Structure* **11**, 295-307 (2003).
41. Jarvet, J. et al. A left-handed 3(1) helical conformation in the Alzheimer A beta(12-28) peptide. *Febs Letters* **555**, 371-374 (2003).

CHAPITRE IV

Etudes structurales des tryptophanes zipper en phase gazeuse TZ1 et TZ4

CHAPITRE IV

Etudes structurales des tryptophanes zipper en phase gazeuse TZ1 et TZ4

I. Introduction

L'étude de peptides modèles, spécialement synthétisés pour favoriser l'émergence de structures secondaires bien définies, peut permettre de caractériser précisément, au niveau atomique, les interactions principales impliquées dans la structure des protéines. Par exemple, les polyalanines sont connues pour former des hélices stables en phase liquide.¹ En solution, c'est la compétition entre les interactions intramoléculaires et les interactions avec les molécules d'eau qui peut favoriser ou non la stabilité d'une structure secondaire particulière. Les études en fonction de la polarité du solvant peuvent, en principe, aider à déterminer quelle interaction domine. Les études en phase gazeuse vont, par définition, révéler uniquement la contribution des interactions intramoléculaires dans la structure du peptide. Des mesures de mobilité ionique effectuées dans le groupe de M. Jarrold ont montré que la structure en hélice des polyalanines, possédant un dipôle géant le long de la chaîne peptidique et orienté vers le C terminal, était sans doute stabilisée par la présence d'une charge en C terminal, par interaction charge-dipôle. Dans les peptides où la lysine est en N terminal, la structure adoptée par les polyalanines devient globulaire. Une étude spectroscopique IRMPD dans la région 1000-1800 cm^{-1} (élongation CO, pliage NH) sur ces mêmes polyalanines, faite dans le groupe de G. von Helden et confrontée à des simulations de dynamique moléculaire au niveau DFT, a permis d'obtenir des informations plus fines sur les structures en hélice les plus probables adoptées par les polyalanines à 300K.² Les données spectroscopiques les plus précises sur ces mêmes polyalanines ont été obtenues dans le groupe de T. Rizzo sur des ions refroidis à ~ 10 K dans la région amide A (3000-3600 cm^{-1}).³ Il est intéressant de noter que l'analyse des modes d'élongation NH n'a pas permis a priori de distinguer les structures en hélice des structures globulaires. Par contre, c'est l'analyse d'une seule vibration OH du groupement acide carboxylique du C terminal qui a permis d'attribuer d'une manière convaincante les structures adoptées par les peptides. Pour la forme en hélice, une transition fine centrée à 3570 cm^{-1} ,

correspondant à l'élongation OH du groupement carboxylique libre, est mesurée, alors qu'elle est déplacée de -300 cm^{-1} pour une structure globulaire dans laquelle le C terminal est en interaction avec le reste de la chaîne peptidique.

Les feuillets et les coudes β forment une deuxième classe de motifs élémentaires présents dans les protéines. Des petits peptides possédant un coude β central et formant deux brins dépliés en orientation anti-parallèle représentent le plus petit système comportant des interactions inter-atomiques impliquées dans l'émergence de structures tertiaires présentes dans les macromolécules biologiques. Par contre, la plus faible stabilité en solution de ce type de structures et la propension à former des oligomères insolubles sont sûrement à l'origine du plus faible nombre d'études que celles réalisées sur les hélices. L'une des premières études expérimentales a été réalisée sur une partie de la protéine G qui est impliquée dans la transmission du signal intracellulaire. Cette protéine contient plusieurs domaines, dont l'un présente des sous-unités β et γ fortement liées entre elles (domaine B1). En particulier, la partie C terminale adopte une forme en épingle β dans la protéine,⁴ mais il a aussi été montré que le petit fragment de la partie C terminale (16 acides aminés) conservait cette structure particulière en solution.⁵

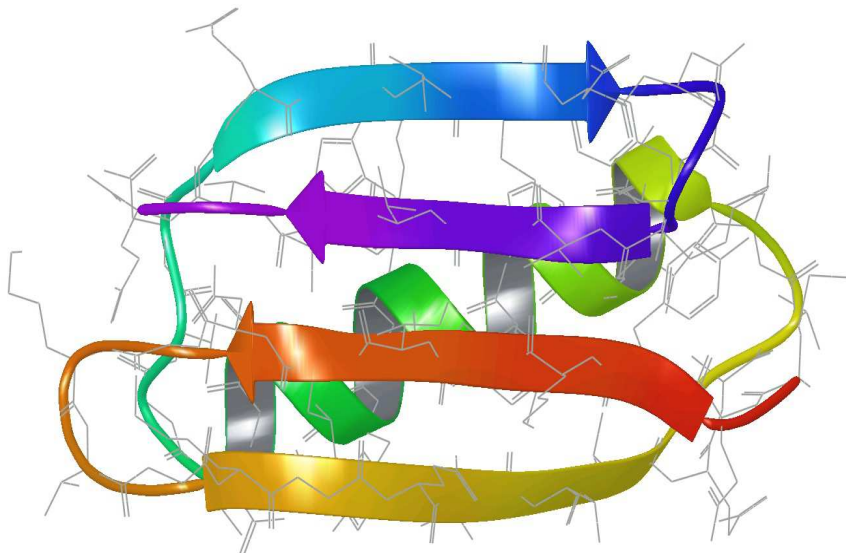
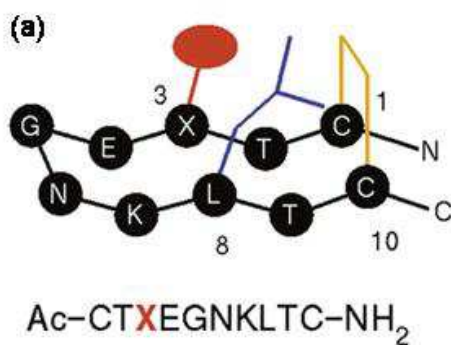


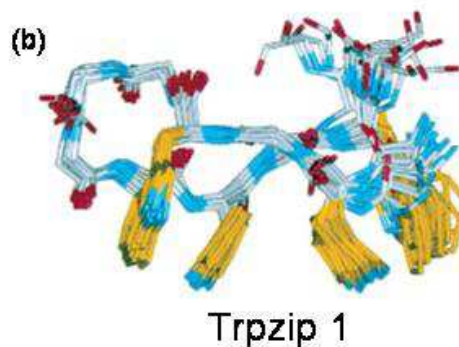
Figure 1: Structure de la protéine GB1 (56 acides aminés) tirée de la PDB (code 2QMT). Deux sous-unités en N et C terminal forment une structure en feuillet β , reliée par un domaine en hélice α au centre de la séquence.

Une étude par fluorescence de Munoz *et al.* a montré que la dynamique de repliement de ce fragment, entre la forme globulaire et en feuillet β , était assez longue en solution à 300 K, de l'ordre de 6 μ s.⁶ Par la suite, de nombreuses études théoriques ont été entreprises pour évaluer quels sont les facteurs clés qui déterminent la dynamique de repliement:^{7,8} formation du coude,^{9,10} interactions inter-brins¹¹ et influence des résidus hydrophobes.¹²

Le groupe de A. G. Cochran a présenté en 2001 une série d'études portant sur des petits peptides synthétiques contenant une dizaine d'acides aminés formant des épingles β stables en solution. Ils ont d'abord étudié des décapeptides protégés de la forme CX₈C, contenant un pont disulfure entre deux cystéines en N et C terminal qui assure une structure cyclique.¹³ Afin d'optimiser la formation d'une épingle, les séquences d'acides aminés EGN ou ENG composent la partie centrale du peptide car ils permettent de former un coude β de type II', avec la formation d'une liaison hydrogène C₁₀ NH...OC entre les acides aminés en position *i* et *i*+3. Ils ont montré que la présence d'un tryptophane en position 3 favorisait le plus la stabilité de la structure en feuillet β grâce à l'interaction inter-brin avec la leucine en position 8.



(Figure 2a).



(Figure 2b)

Figure 2 : (a) Représentation schématique des séquences peptidiques Ac-CX₈C-NH₂ étudiées par Cochran *et al.*¹³ (b) ensemble de 20 structures de TZ1 (les cycles indoles sont représentés en jaune).¹⁴

À partir de ce résultat, ils ont synthétisé une série de peptides contenant 12 à 16 acides aminés ne contenant pas de cystéines en N et C terminal mais dont le nombre de tryptophane et la séquence d'acides aminés en position centrale varient. Ces peptides ont été dénommés tryptophane zippers (TZ)¹⁴ et sont considérés comme les plus petits peptides non cycliques

stables en phase condensée. L'une des conclusions de cette étude a été de montrer l'importance des interactions inter-résidus entre les tryptophanes de chaque partie du feuillet β dans sa stabilité (Figure 2b). De plus, ces peptides restent très solubles en solution aqueuse sans former d'oligomères. Les séquences primaires des différents TZ sont reportées dans le tableau 1. TZ 2, 3 et 4 présentent la meilleure stabilité à haute température ($T_m \sim 340-350$ K).

Table 1 : Séquence primaire des tryptophane zipper proposés par Cochran *et al.*¹⁴ avec le type de coude β associé.¹⁵

TZ 1	SWTW EGNK WTWK	coude β type II'
TZ 2	SWTW EN GK WTWK	coude β type I'
TZ 3	SWTW E _p NK WTWK *	coude β type II'
TZ 4	GEWTWD DATK TWTWTE	coude β type I
TZ 5	GEWTYD DATK TFTWTE	coude β type I
TZ 6	GEWTWD DATK TWTVTE	coude β type I

* p désigne la D-proline.

Par la suite, des études spectroscopiques en phase condensée ont été réalisées sur ces peptides modèles. Une structure en feuillet β présente une bande amide I dédoublée avec deux maxima autour de 1635 cm^{-1} et 1670 cm^{-1} qui peut être sondée par spectroscopie FT-IR dans l'eau lourde.¹⁵ De plus, le couplage excitonique entre les cycles aromatiques en interaction π se caractérise par une bande UV autour de 230 nm dans les spectres de dichroïsme circulaire électronique. Les groupes de Gai¹⁶ et de Keiderling^{17,18,19} ont appliqué ces techniques et ont confirmé la plus faible stabilité de la structure en épingle dans les séquences où les tryptophanes sont substitués et l'existence d'une compétition entre les interactions hydrophobes des chaînes latérales des acides aminés aromatiques (indole, phénol) et la stabilité intrinsèque du coude qui assure la cohésion d'ensemble du feuillet β anti-parallèle. Ces molécules, de part leurs tailles réduites, ont aussi servi de systèmes modèles pour des études théoriques sur les structures, la dynamique de repliement et les propriétés thermodynamiques des peptides par des méthodes de dynamique moléculaire.²⁰⁻²⁴

A notre connaissance, une seule étude en phase gazeuse par mobilité ionique sur des dérivés acétylés au niveau des lysines K⁸ et K¹² et en position N terminal de TZ1 a été publiée très récemment par l'équipe de D.H. Russel en 2011.²⁵ L'acétylation sur les différents groupements amino de la séquence permet d'étudier le peptide simplement chargé en

contrôlant le site de protonation. Les mesures de mobilité ionique sont comparées aux sections efficaces de diffusion calculées pour les structures obtenues par dynamique moléculaire à 300K en utilisant le champ de force Amber. Les auteurs ont montré que la structure native de TZ1 n'était pas conservée dans le peptide simplement protoné. Ils ont proposé une série de structures compatibles avec les mesures de mobilité qui, pour certaines, contiennent un coude γ (liaison hydrogène C_7 entre les résidus i et $i+2$) au lieu d'un coude β . En l'absence du solvant, les interactions électrostatiques entre l'ammonium et les différents groupements accepteurs de liaisons hydrogènes déstabilisent la structure en feuillet β , et ceci quel que soit le site de protonation. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes de I. Compagnon *et al.*²⁶ et T. D. Vaden *et al.*²⁷ concernant les effets de protonation sur la stabilité des coudes β en phase gazeuse.

Dans cette thèse, j'ai étudié les structures adoptées en phase gazeuse par trois séquences TZ différentes à l'aide de techniques expérimentales complémentaires : mobilité ionique, spectroscopie IRMPD et fragmentation ECD. Je compare ces résultats expérimentaux aux résultats tirés de simulations de chimie quantique. Les peptides ont été synthétisés à la demande (Bachem) et sont protégés en C terminal. TZ1 contient 12 acides aminés et les deux autres 16. La plus grande longueur de la séquence d'acides aminés impliquée dans les interactions inter-brins du feuillet β dans TZ4 devrait favoriser le maintien de la forme native en phase gazeuse. Pour le peptide TZ4_{mod}, deux tryptophanes en position 5 et 12 sont substitués par des alanines afin d'évaluer l'importance des interactions entre les résidus des tryptophanes dans la stabilité du feuillet, si jamais la structure native est conservée. Je vais d'abord présenter l'étude sur le peptide TZ1 en fonction de l'état de charge (doublement et triplement protoné), puis comparer les résultats et les calculs obtenus sur les peptides TZ4 et TZ4 doublement chargés.

TZ1 : SWTW EGNK WTWK-NH₂

TZ4 : GEWTWD DATK TWTWTE-NH₂

TZ4 modifié : GEWTAD DATK TATWTE-NH₂

II. Etude structurale du tryptophane zipper 1 en phase gazeuse

1. Résultats expérimentaux

1.1 Expérience de mobilité ionique

Le spectre de mobilité ionique de TZ1 a été effectué au LASIM- Université Lyon I dans le groupe de Ph. Dugourd. Les brins TZ1 sont dissous dans de l'eau et du méthanol (50% :50%) à une concentration de quelques dizaines de μM . La source électrospray est utilisée pour mettre en phase gazeuse la molécule d'intérêt.

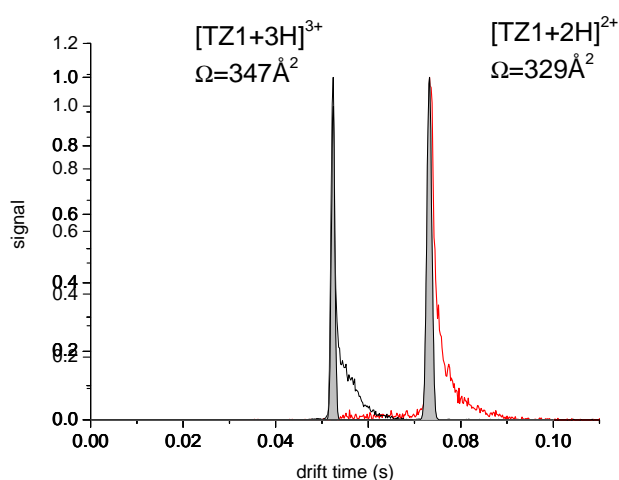


Figure 3: Profil temporel de diffusion (ms) des ions TZ1^{2+} (en trait rouge) et TZ1^{3+} (en trait noir). Les parties grisées correspondent aux temps de diffusion calculés pour une seule conformation ayant une section efficace de 329 \AA^2 pour TZ1^{2+} et 347 \AA^2 pour TZ1^{3+} .

Les profils temporels de diffusion (ATD) des TZ1 doublement et triplement chargés sont donnés sur la figure 3. Pour les deux états de charge, le spectre de mobilité ionique présente un seul pic principal correspondant à une section efficace de $329 \text{ \AA}^2 \pm 7 \text{ \AA}^2$ et $347 \text{ \AA}^2 \pm 7 \text{ \AA}^2$ pour $[\text{TZ1}]^{2+}$ et $[\text{TZ1}]^{3+}$ respectivement. Les parties grisées correspondent aux temps de diffusion calculés pour une seule configuration ayant une section efficace centrée sur le maximum du pic. La largeur intrinsèque de ces pics théoriques est déterminée par la diffusion des ions dans une cellule de gaz maintenue à 10 Torr et à 289 K. On constate que la largeur à mi-hauteur du spectre expérimental est quasiment égale à celle attendue pour une conformation unique. Les deux pics de mobilité ionique de $[\text{TZ1}]^{2+}$ et $[\text{TZ1}]^{3+}$ sont asymétriques avec un épaulement vers le temps d'arrivée plus grand. Cela peut être la

signature de la présence de structures ayant des sections efficaces plus grandes que celle correspondant au maximum du pic. Une partie de l'élargissement du pic est due à la largeur du paquet d'ion (de l'ordre de 1ms) qui diffuse dans la cellule de mobilité. Comme pour l'étude sur les peptides amyloïdes, nous nous intéressons uniquement au pic principal de mobilité. Comme sa largeur est similaire à celle attendue pour une conformation unique, on peut considérer qu'une ou qu'un nombre réduit de conformations dont les sections efficaces de diffusion ne peuvent pas être séparées sont présentes expérimentalement.

On observe l'augmentation de la section efficace de diffusion avec l'état de charge, comme attendu par l'effet de la répulsion coulombienne entre résidus chargés. L'augmentation observée est de l'ordre de 5%, plus grande que celle pour la séquence A β ₁₂₋₂₈. Récemment, l'équipe de D. Russel a mesuré les sections efficaces de diffusion de plusieurs peptides acétylés de TZ1 afin de bloquer les sites de protonation (en N terminale et sur les lysines) pour étudier les espèces simplement chargés. Suivant le site de protonation, les valeurs sont comprises entre 337 et 341 Å² (\pm 2%) avec une source ESI, alors qu'avec une source MALDI, les sections efficaces de diffusion sont plus petites, entre 328 et 333 Å² (\pm 2%). Pour le peptide non acétylé, la valeur est de 320 Å², mais il n'est pas précisé avec quelle source d'ions ce résultat est obtenu. Il n'est pas non plus donné d'explication à la différence observée entre les deux sources. On peut néanmoins noter que l'augmentation de section efficace de diffusion entre le simplement et le doublement chargé est faible, de l'ordre de 3%, et que la double acétylation engendre un changement de section efficace de diffusion similaire à celui observé avec l'augmentation de l'état de charge.

1.2 Expérience ECD

Toutes les expériences de ECD ont été effectuées au laboratoire LMR à l'école Polytechnique, avec les mêmes solutions que pour les expériences de mobilité mais des concentrations réduites à 1-2 μ M.

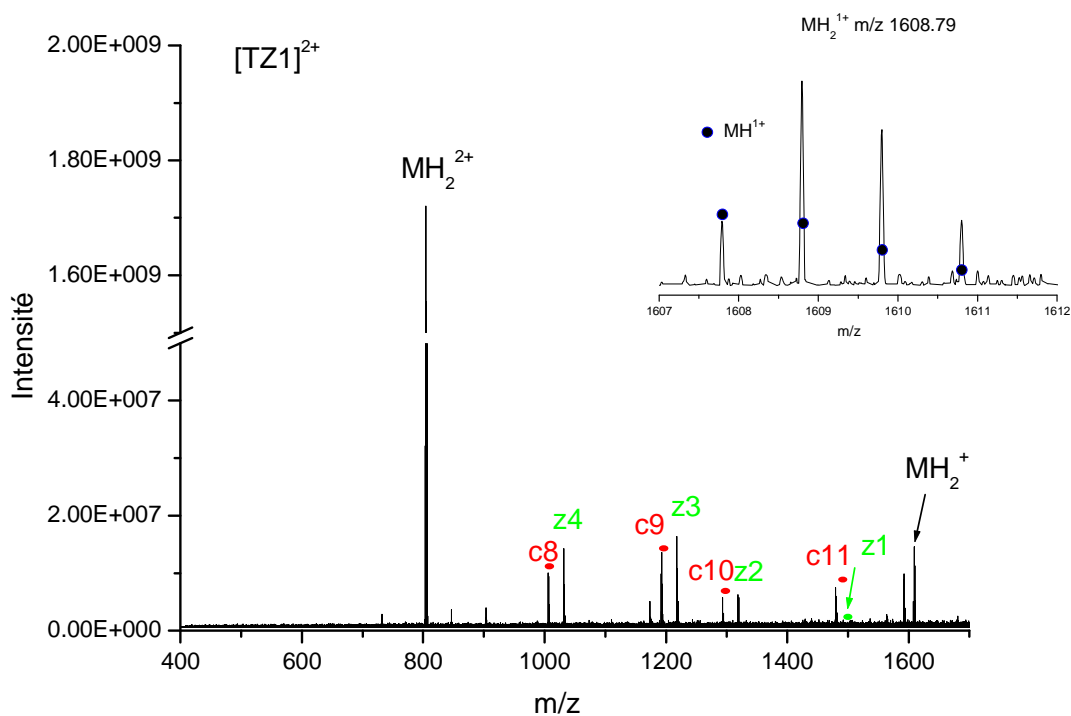


Figure 4: Spectre de masse ECD de l'ion $TZ1^{2+}$. A droite, zoom sur la région correspondant à la masse de peptide réduit.

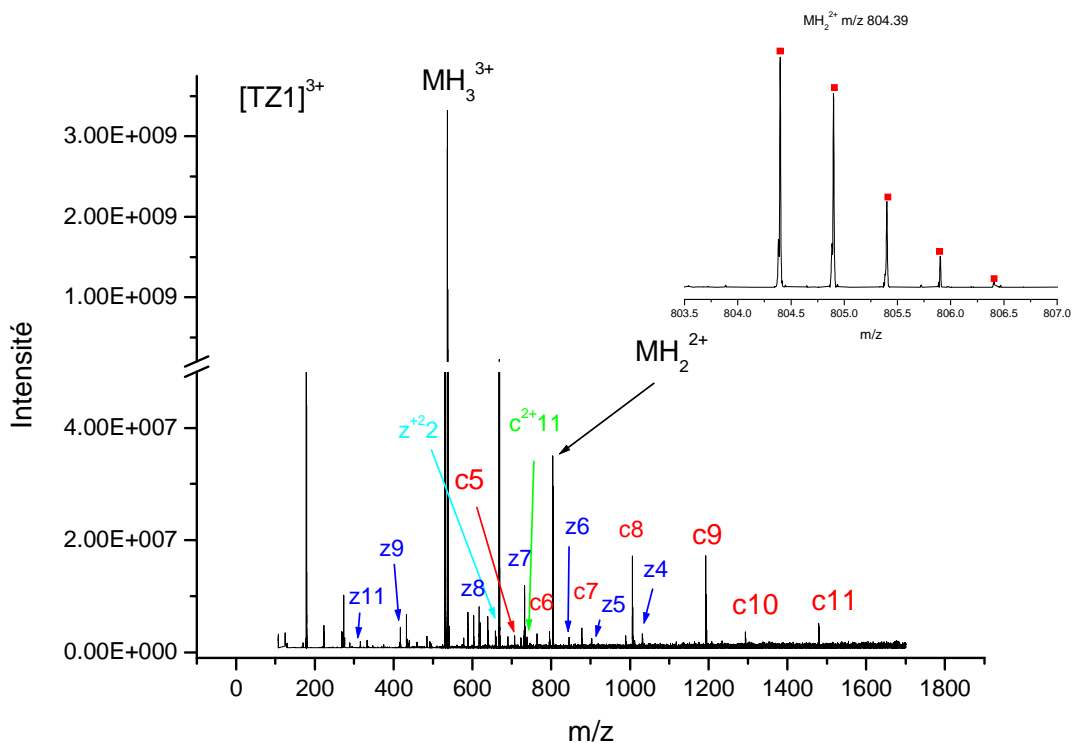


Figure 5: Spectre de masse ECD de l'ion $TZ1^{3+}$. A droite, zoom sur la région correspondant à la masse de peptide réduit.

Les figures 4 et 5 présentent les spectres de masse de TZ1 doublement et triplement chargé obtenus par dissociation induite par capture électronique à faible énergie (1 eV). Le taux de fragmentation est faible, de l'ordre du pourcent pour les ions fragments principaux. Les spectres se composent principalement d'une série de fragments caractéristiques c/z attendus après réduction de l'ion parent. Dans le cas du doublement chargé, la capture de l'électron se traduit par l'observation du pic de masse correspondant à l'espèce réduite MH_2^{+} à m/z 1608,79. On peut en conclure que tous les ions réduits ne dissocient pas dans ces conditions expérimentales. On détecte également une masse correspondante à l'ion réduit avec perte d'hydrogène MH^+ à m/z 1607,79. La distribution isotopique théorique pour cet ion est donnée sur la figure de droite. La formation de l'espèce simplement protonée engendre la détection d'autres types de fragments de type b/y par fragmentation secondaire. Nous avons réalisé une expérience complémentaire au LCP de post-excitation CO_2 et SORI-CID sur l'ion MH_2^+ pour $TZ1^{2+}$. Aucun fragment n'a été détecté lors de la post-excitation, malgré la perte de signal sur l'ion parent. Nous n'avons pas d'explication à ce résultat, sauf à supposer que l'intensité du réduit après isolation ($< 1.10^7 / 10^9$ pour le MH_2^{2+}) est trop faible pour pouvoir détecter ses fragments induits par la post-excitation.

Pour $TZ1^{3+}$, on n'observe que l'espèce réduite avec une perte d'hydrogène MH_2^{2+} correspondant à la masse m/z 804,39 (figure 5 à droite). On peut en déduire que tous les ions réduits ont fragmenté pour donner des ions c/z. Les ions fragments de type b/y sont reliés à la fragmentation secondaire de l'espèce doublement protonée. Le rapport d'intensité entre les voies de fragmentation de type b/y et c/z passe de 6% pour le doublement protoné à 18% pour le triplement protoné. D'une manière générale, la capture électronique produit principalement des fragments spécifiques c/z.

Comme décrit au chapitre I, les fragments c_i/z_i correspondent à la rupture de la même liaison $N-C_\alpha$, en débutant la numérotation à partir du résidu en N terminal. Les distributions des ions c/z (PIA) en fonction de la position dans la chaîne peptidique sont données sur la figure 6 pour $TZ1^{2+}$ et $TZ1^{3+}$ et sont assez différentes.

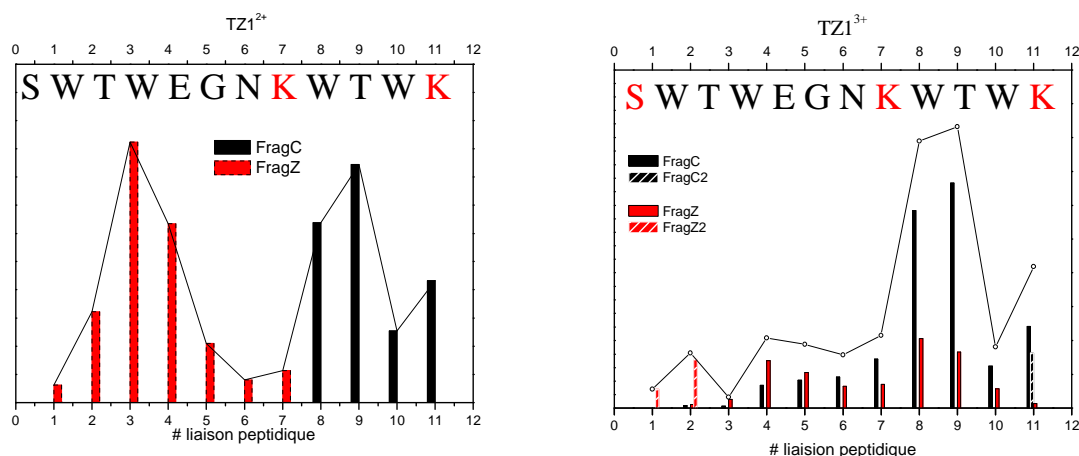


Figure 6: Distribution de l'intensité des fragments c/z le long de la chaîne peptidique pour $TZ1^{2+}$ et $TZ1^{3+}$.

Pour $TZ1^{2+}$, la distribution des ions fragments est très piquée autour des positions 3-4 avec la détection d'ions z et 8-9 avec la détection d'ions c. L'intensité de l'ion z_1 , correspondant à la rupture de la première liaison $N-C_{\alpha}$, est très faible, comme pour les ruptures en milieu de chaîne (positions 5-7). Cette région correspond à la séquence E^5GNK^8 qui forme un coude β dans une structure en feuillet β avec une interaction par liaison hydrogène C_{10} entre le carbonyle de E^5 et l'amide de K^8 .

Pour $TZ1^{3+}$, les ions c_8 et c_9 et, dans une moindre mesure, c_{11} restent majoritaires comme pour le doublement chargé, mais il n'existe plus de site de fragmentation spécifique autour des résidus T^3 et W^4 . On détecte la séquence d'ions z_4-10 avec une faible variation d'intensité le long de chaîne peptidique. Les fragments c/z sont principalement mono chargés, avec un signal faible pour les doublements chargés z_{1-2}^{2+} et c_{11}^{2+} . Le spectre ECD obtenu sur le montage du LCP est sensiblement différent de celui acquis sur le montage du DCMR (Figure 6). La distribution PIA est la même, mais pour chaque rupture de liaison $N-C_{\alpha}$, on détecte autant d'ions z_i que d'ions c_i .

1.3 Spectre IRMPD

Le spectre IRMPD a été enregistré à CLIO (Orsay) avec le laser à électrons libres. Les ions sont produits avec une source ESI, sélectionnés en masse et irradiés par le laser. Cette

expérience a été faite avant l'étude par mobilité ionique et par ECD. Nous espérons que la comparaison des spectres vibrationnels des différents peptides tryptophane zippers pour un même état de charge nous permettrait d'attribuer leurs structures. Nous avons donc enregistré uniquement le spectre du doublement protoné pour TZ1. Le spectre IRMPD du $TZ1^{2+}$ est reporté à la figure 7 et est caractérisé par les deux bandes intenses amide-I et amide-II. La bande amide-II, centrée à 1515 cm^{-1} , correspond au mode de pliage de N-H et d'élongation C-N. La bande amide-I centrée à 1680 cm^{-1} correspond à l'excitation des modes d'élongation C=O. Dans la région de basses fréquences inférieures à 1400 cm^{-1} , qui correspondent aux modes amide-III et aux pliages C-H, le taux de fragmentation chute fortement. La largeur des bandes vibrationnelles est de l'ordre de 50 cm^{-1} .

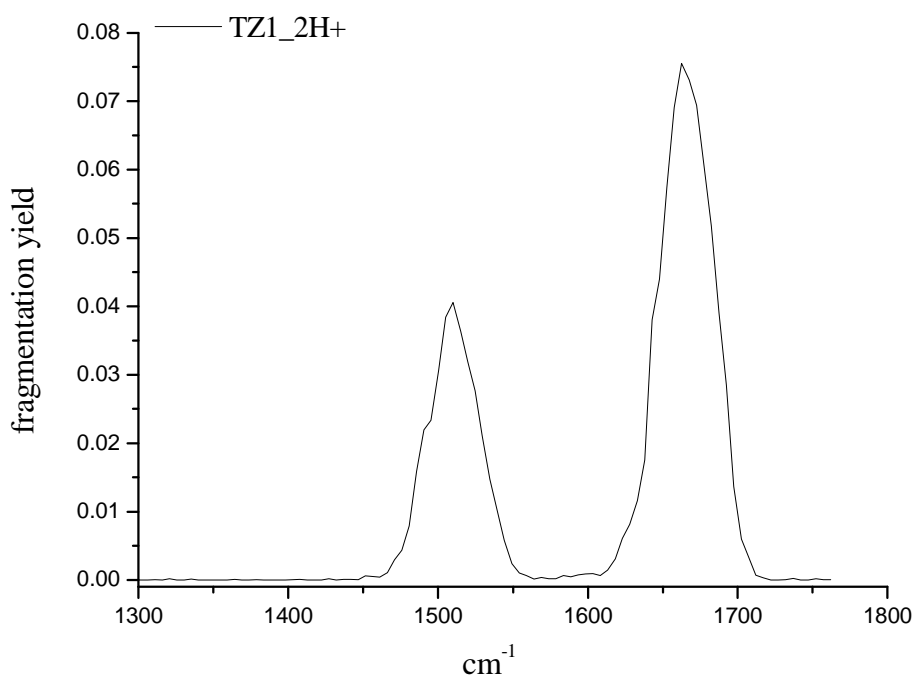


Figure 7: Spectre IRMPD d'ions $TZ1^{2+}$ dans la région 1100 cm^{-1} à 1800 cm^{-1} .

2. Interprétation des résultats

Dans un premier temps, nous allons présenter les résultats de la recherche conformationnelle pour $TZ1^{2+}$ et $TZ1^{3+}$ puis analyser indépendamment pour tous les conformères des tableaux 2 et 3 les calculs de sections efficaces de diffusion, l'analyse des spectres de fragmentation ECD et de spectroscopie IRMPD. La combinaison des trois

expériences nous permettra de proposer la ou les structures adoptées par ce peptide en fonction de l'état de charge.

2.1 Dynamique moléculaire REMD

Des simulations de dynamique moléculaire par échange de répliques au niveau Amber ont été effectuées afin d'explorer les différents bassins de la surface d'énergie potentielle des tryptophan zippers. Une dynamique a été propagée pendant plusieurs ns en partant d'une structure en zipper. La structure primaire de TZ1 est S¹WTWEGNK⁸WTWK¹²-NH₂. Les sites de protonation les plus favorables sont le groupement ammonium des deux lysines aux positions K⁸ et K¹² et le groupement amino en position N terminale. La valeur de pKa en phase condensée de la lysine est 10.5 et de 8 pour le N terminal de la serine. D'après les pKa en phase aqueuse, les deux protons du TZ1 doublement chargé se fixent sur K⁸ et K¹². Le troisième proton du TZ1 triplement chargé est certainement sur le N terminal. La dynamique moléculaire par échange de répliques donne plus 5500 conformères pour TZ1 doublement chargé et 1300 conformères pour TZ1 triplement chargé. L'augmentation de l'état de charge a diminué le nombre de structures générées, ce qui doit être relié au fait que l'augmentation des interactions électrostatiques fortes dans le triplement protoné contraint plus fortement la structure du peptide.

Le regroupement par familles de structures a réduit le nombre de structures mais reste important, de l'ordre de plusieurs dizaines pour chaque état de charge. Pour effectuer les regroupements, j'ai utilisé la distance d entre les deux carbones C_α en position C et N terminale et les distances N⁺-O entre les deux azotes des lysines protonées et tous les oxygènes des carbonyles des liaisons peptidiques. Pour chaque famille, j'ai ensuite calculé avec le logiciel Mobcal, mis au point par l'équipe de M. Jarrold, les sections efficaces de diffusion pour les structures optimisées en Amber. D'une manière générale, les conformations trouvées lors de la dynamique moléculaire ont des sections efficaces trop grandes par rapport à la valeur expérimentale et seul un petit nombre d'entre elles ont une valeur compatible avec l'expérience.

2.2 Analyse des sections efficaces de diffusion calculées

Dans les tableaux 2 et 3, nous présentons la valeur moyenne de la distance d , les valeurs des sections efficaces de diffusion, leur énergie en AMBER et en AM1, pour TZ1²⁺ et

TZ1³⁺ respectivement. Cette énergie est l'énergie relative par rapport à l'énergie la plus basse de chaque dynamique moléculaire.

Tableau 2: Section efficace de diffusion Ω (Å²) et énergie (kcal/mol) des groupes en zipper et repliés ou étendus calculées au niveau Amber, AM1 pour TZ1²⁺. La valeur de la section efficace de diffusion expérimentale est 329 Å².

Conformation	d (Å)	Ω (Å ²)		Energie (kcal/mol)	
		AMBER	AM1	AMBER	AM1
Zipper					
Z1	6.2	319	332	15	29
Z2	15.2	319	348	9	19
Z3	8.4	322	363	2	16
Z4	4.9	329	335	31	22
Z5	11.5	339	343	14	15
Repliée					
F1	11.0	314	350	3	11
F2	13.6	317	350	2	0
F3	15.3	318	354	8	16
F4	9.0	322	338	4	16
F5	11.5	325	355	4	22
F6	8.4	326	356	0	5
F7	13	327	360	4	11
F8	12.0	328	353	13	15
F9	15	327	360	3	13
F10	12.7	330	337	5	22
F11	10.3	337	360	2	11
Etendue					
E1	18	342	367	3	2
E2	20	358	364	5	15

Pour chaque état de charge, les conformations sont classées en trois grands groupes: structure repliée ou étendue et structure en zipper. Les conformations de plus basses énergies appartiennent aux groupes repliés et étendus. Les structures en zipper sont nettement plus hautes en énergie (10-20 kcal/mol). Le premier critère utilisé pour séparer les trois groupes est la distance d entre les carbones C_α des résidus en position N et C terminale qui donne la distance entre deux bouts de la chaîne peptidique (tableaux 2 et 3). Dans le cas de TZ1³⁺, ces valeurs donnent un moyen pour bien distinguer les familles de conformères : cette distance est la plus grande pour les étendus (12 -20 Å), le plus court pour les zippers (1,9 -2 Å) et celle des repliés est au milieu deux valeurs (7 -10 Å). Dans le cas de TZ1 doublement chargé, celle des groupe déplié (18-20 Å) est environ deux fois plus grande que celles des groupes en zipper (4-15 Å) et replié (8-15 Å). Il y a un mélange entre quelques groupes repliés et en zipper : par exemple le groupe en zipper Z2 et les groupes repliés F3, F9 ont une même distance d (15 Å) entre les deux extrémités mais une structure globale plutôt en zipper ou plutôt repliée. En

général, la distance des groupes zipper est légèrement plus petite que celle du groupe replié. Cependant, cette distance n'est pas le seul critère qui nous permet de déterminer les différentes familles de structure (voir différents critères dans le chapitre A β ₁₂₋₂₈).

Tableau 3: Section efficace de diffusion Ω (\AA^2) et énergie (kcal/mol) des groupes repliés, étendus et en zipper, calculées au niveau Amber et AM1 pour TZ1³⁺. La section efficace de diffusion expérimentale est 347 \AA^2 .

Conformation	d (\AA)	Ω (\AA^2)		Energie (kcal/mol)	
		AMBER	AM1	AMBER	AM1
Repliée					
F1	9.8	326	353	0	3
F2	9.2	331	370	3	0
F3	8.8	329	365	5	9
F4	10.4	336	361	7	8
F5	8.3	338	355	9	12
F6	11.9	339	382	5	9
F7	9.47	352	371	2	18
Etendue					
E1	12.6	336	374	1	3
E2	13.5	343	366	4	0
E3	12.2	353	374	9	16
E4	17.1	357	367	9	6
E5	17	372	389	8	15
E6	20.5	375	385	10	9
Zipper					
PDB		349			
Z1	1.9	334	342	18	17
Z2	2.0	334	344	18	19
Z3	1.9	341	349	8	10
Z4	1.9	342	349	8	10
Z5	1.9	342	349	8	13

En général, pour les deux états de charge, la section efficace de diffusion calculée des conformations étendues est plus grande d'environ 10 à 20 \AA^2 que celle des repliées et des zippers. On remarque que la section efficace de diffusion calculée en AMBER est systématiquement plus petite que celle calculée pour la structure optimisée au niveau semi-empirique AM1, comme observé pour les peptides amyloïdes [A β ₁₂₋₂₈].

Pour TZ1²⁺, les groupes en zipper et les groupes repliés ont une section efficace de diffusion en moyenne de 324 \AA^2 , compatible avec la valeur expérimentale (329 \AA^2). Les 6 structures en zipper sont présentées à la figure 8 avec un même coude à E⁵GNK⁸ (figure 9) sauf Z2 qui forme un coude à W⁴EGN⁷ et deux branches tordues. En AM1, la section efficace de diffusion des groupes repliés augmente à 352 \AA^2 en moyenne et celle des groupes en zipper

passé à 342 \AA^2 , ce qui devient trop grand par rapport à la valeur expérimentale. Les structures AMBER des conformères du groupe replié sont reportées sur la figure 10.

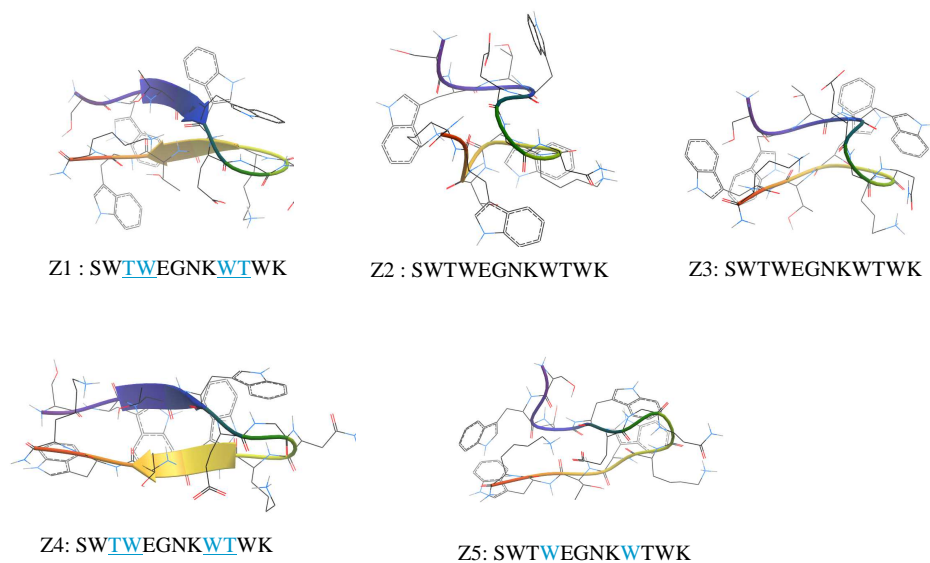


Figure 8: Structures en zipper de TZ1²⁺ avec la séquence d'acide aminé en lettres. Les parties feuillet β sont représentées par les lettres bleues surlignées.

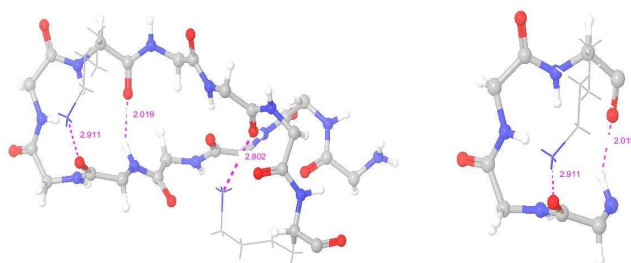


Figure 9 : Structure en zipper Z3 de TZ1²⁺. Le coude formé par la liaison d'hydrogène NH⁵-CO⁸ et liaison de NH³⁺ du K⁸ avec CO⁵, K¹² et CO¹⁰. A droite, zoom sur le coude.

Les conformères étendus E1, E2 possèdent une section efficace de diffusion AMBER de 342 \AA^2 et 358 \AA^2 respectivement. Leurs sections efficaces AM1 augmentent à 367 \AA^2 et 360 \AA^2 . Ces valeurs sont toutes plus grandes que l'expérience. Leurs structures sont illustrées sur la figure 11: la structure E1 est formée par des liaisons de type C₁₀ entre CO et NH de S¹ - W⁴, E⁵-K⁸, N⁷-T¹⁰. Le groupe E2 possède des liaisons hydrogène de type hélice C₁₃ entre CO et NH de S¹-E⁵, T³-N⁷ et type C₁₀ entre G⁶-W⁹.

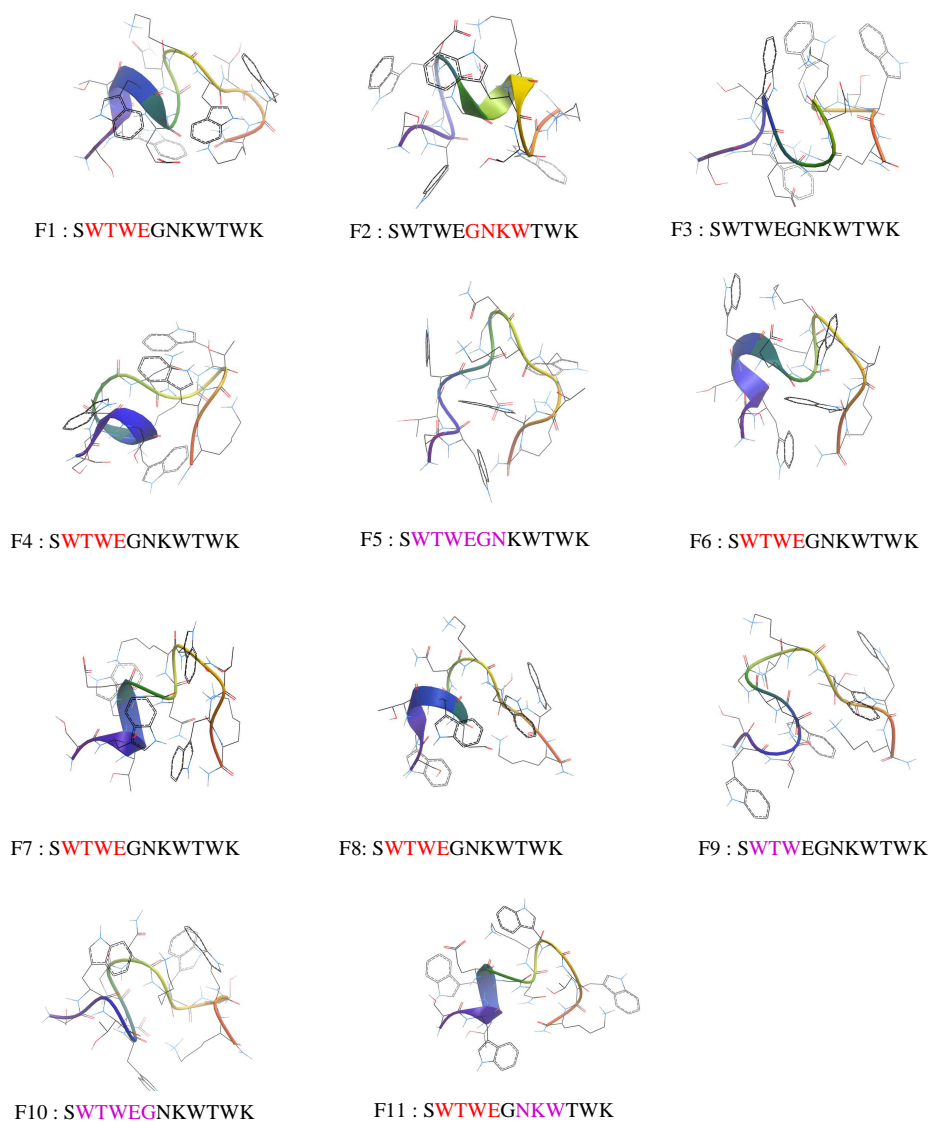


Figure 10: Structures repliées de TZ1²⁺. Les parties en hélice α sont représentées par des lettres rouges, les hélices C₁₀ en violet.

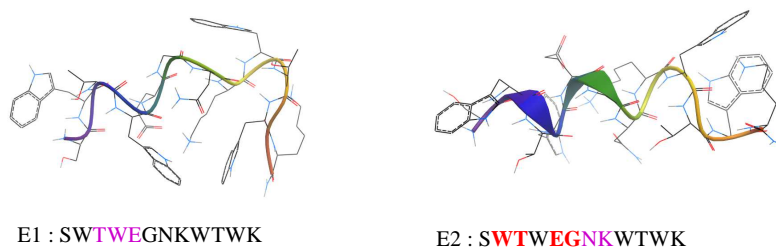


Figure 11: Structures étendues de TZ1²⁺. Les parties en hélice α sont représentées par des lettres rouges, les hélices C₁₀ en violet.

En conclusion, les conformations étendues peuvent être exclues de l'analyse car leurs sections efficaces de diffusion sont trop grandes et ceci quelle que soit la méthode de calcul utilisée. Au niveau AMBER, certaines conformations en zipper (Z3-Z5) et repliées (F4-F10) ont des sections efficaces de diffusion proches de la valeur expérimentale. L'optimisation au niveau AM1 engendre une augmentation des sections efficaces, et seules les conformations en zipper Z1, Z3, Z5 et repliées F4 et F10 seraient compatibles avec l'expérience. Au niveau énergétique, les structures repliées sont les plus basses alors que les structures en zipper, proches de celle adoptée en phase condensée, sont nettement plus hautes en énergie. La présence de ce type de conformères en phase gazeuse ne peut s'expliquer que si la structure native du peptide est conservée durant la désolvatation et que la force des liaisons intramoléculaires présentes dans les structures en zipper est grande par rapport à l'énergie de désolvatation.

La dynamique moléculaire sur TZ1 triplement chargé donne le même type de familles de structures que pour le doublement chargé, c'est-à-dire des conformations en zipper, repliées et dépliées. En comparant les structures en zipper des deux états de charge, on constate que la section efficace de diffusion de la structure en zipper de TZ1³⁺ est légèrement plus grande que celle de TZ1²⁺. Toutes les structures en zipper ont une distance d inférieure à 2 Å et sont globalement très proche de la structure native. La figure 12 montre les structures en zipper de TZ1³⁺ et la figure 13 détaille une structure avec le coude β central E⁵GNK⁸ formé par la liaison de NH (E⁵) et CO (K⁸) ; les liaisons inter-branches CO¹-NH¹², NH³-CO¹⁰, CO³-NH¹⁰ sont également présentées. Comme pour TZ1²⁺, ces conformations se trouvent hautes en énergie. Elles possèdent une section efficace de diffusion moyenne de 338 Å² en AMBER. En AM1, cette valeur passe à 347 Å² qui est en accord avec la valeur expérimentale (347 Å²).

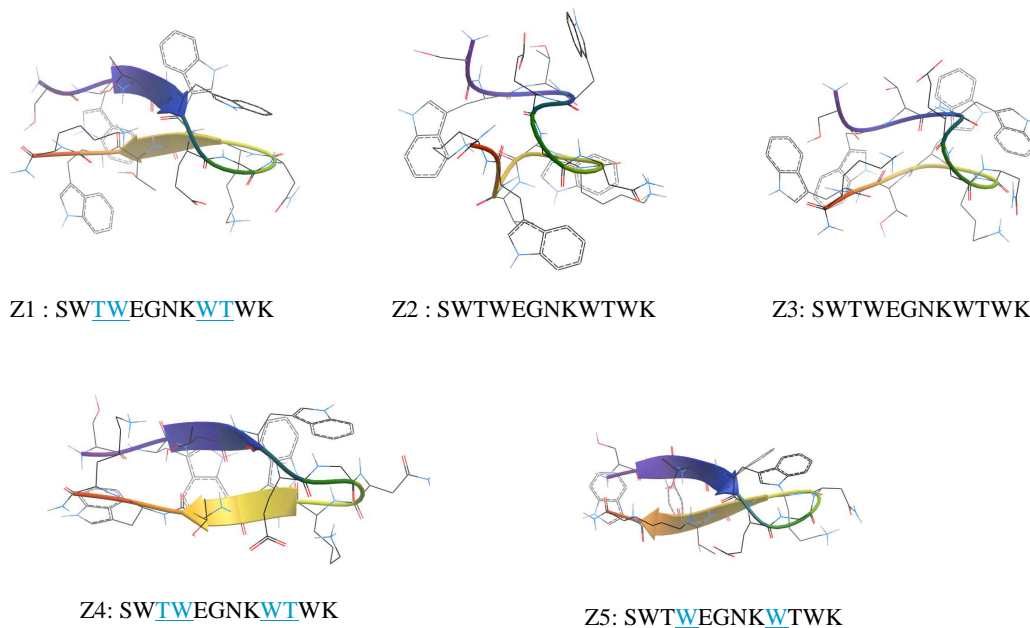


Figure 12: Structures en zipper de TZ1³⁺. Les parties en feuillet β sont représentées par les lettres bleues surlignées.

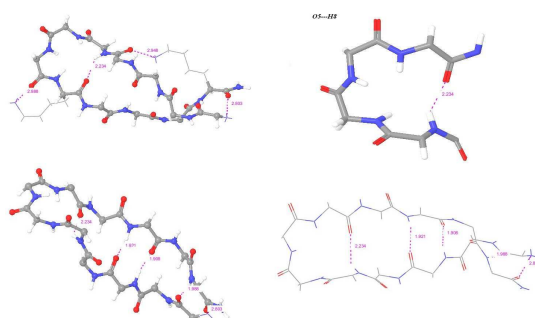


Figure 13: La structure de la conformation en zipper Z1 de TZ1³⁺ avec le coude NH⁵-CO⁸, les liaisons inter-branches : CO¹-NH¹², NH³-CO¹⁰, CO³-NH¹⁰, NH⁵-CO⁸.

Nous avons sélectionné sept structures repliées dont la distance d entre les C_{α} des résidus en position N et C terminale est comprise entre 8 et 12 Å. Pour ces conformères, on constate une perte de la structure type en zipper. Les deux bouts de la chaîne peptidique se sont éloignés et il y a formation de liaisons hydrogène intramoléculaires C₁₀ et C₁₃. La partie centrale E⁵GN⁷ peut conserver la structure initiale en zipper, soit avec un coude soit en étant dépliée sans liaison hydrogène. Excepté F7, toutes ces conformations ont une section efficace de diffusion inférieure à 340 Å² et donc plus petite que la valeur expérimentale (347 Å²). F7 et, dans une moindre mesure, F5 et F6 sont a priori compatibles avec la mesure de mobilité. Les structures de ces 7 conformations repliées sont présentées sur la figure 14. Par contre, l'optimisation de géométrie en AM1 engendre des structures avec une section efficace de

diffusion nettement supérieure à l'expérience, sauf pour F1 et F5 qui sont dans la limite haute de tolérance (353 et 355 Å²).

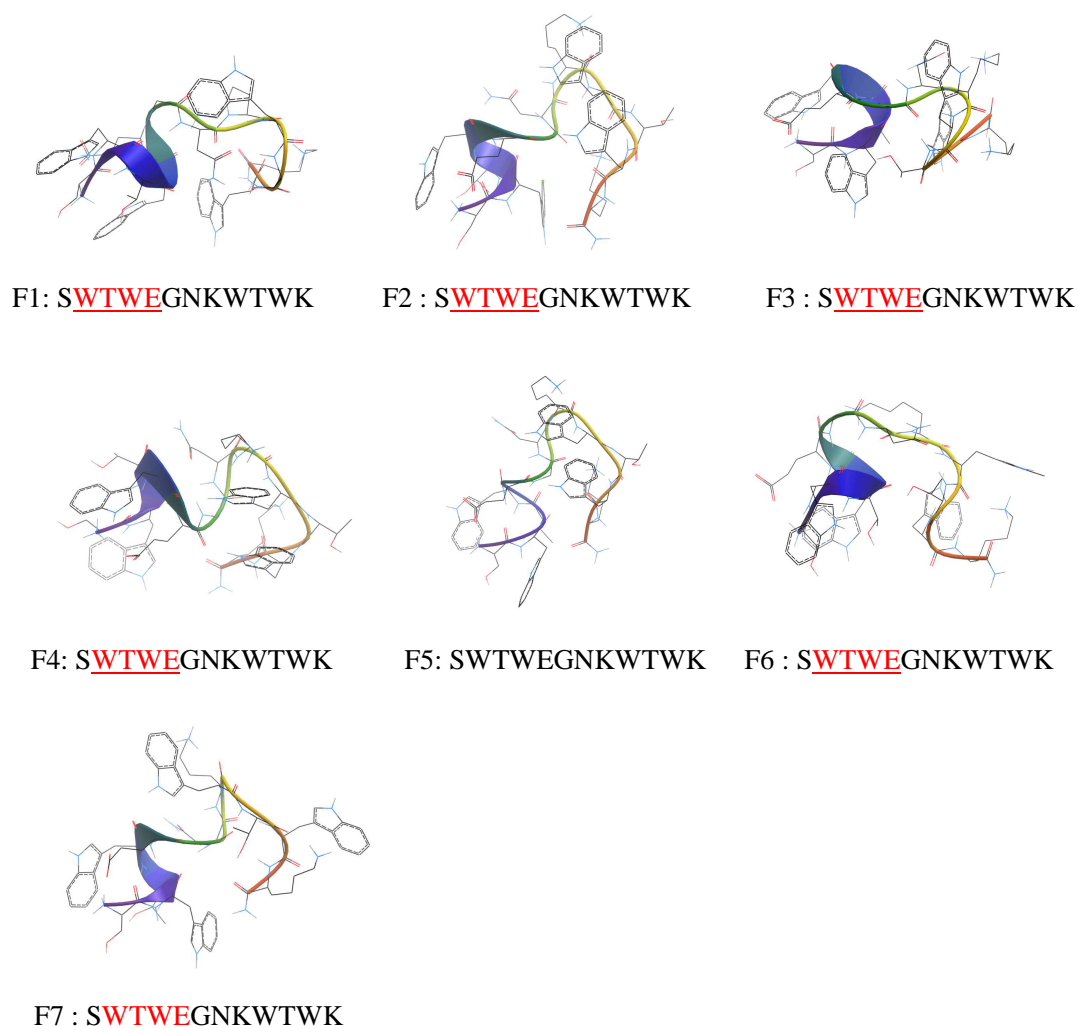


Figure 14: Structures repliées de TZ1³⁺ : Les parties en hélice α sont représentées par des lettres rouges.

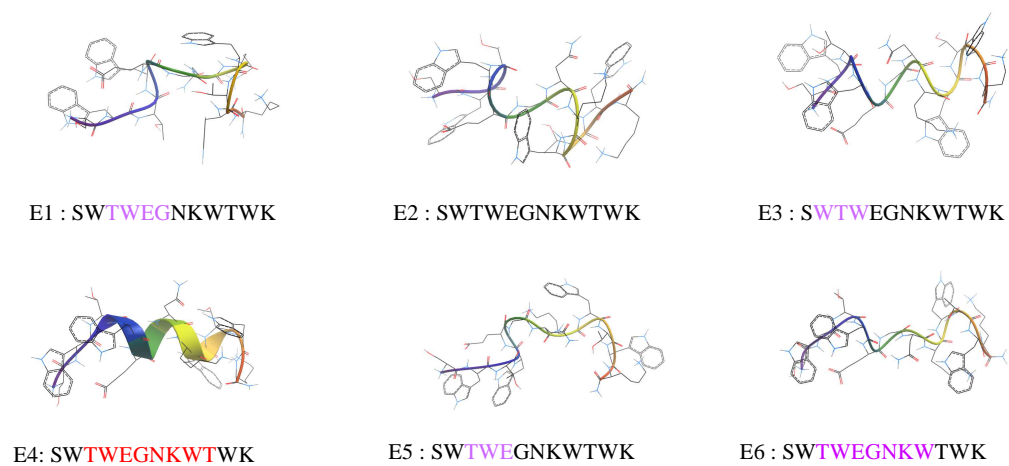


Figure 15: Structures étendues de TZ1³⁺. Les parties en hélice α sont représentées par des lettres rouges, les hélices 3_{10} en violet.

Les structures dépliées (figure 15) ont été définies par rapport à la distance d qui est comprise entre 12 et 20 Å. Les conformères E4-E6 sont les plus étendus ($d > 17$ Å) avec une section efficace de diffusion nettement supérieure à l'expérience. Pour les autres structures dépliées E1-E3 (d comprise entre 12 et 14 Å), les sections efficaces de diffusion calculées sont compatibles avec la mesure expérimentale, autour de 340 Å². Par contre, aucun conformère optimisé en AM1 n'a une section efficace de diffusion (> 366 Å) compatible avec la valeur expérimentale.

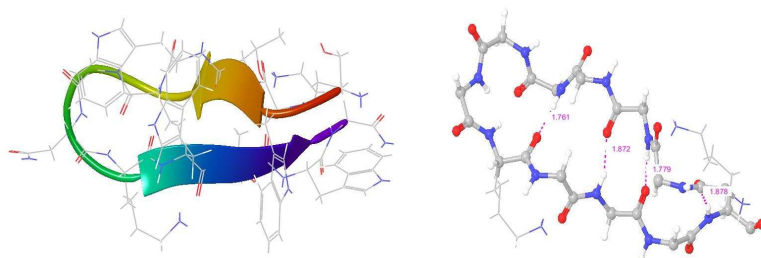


Figure 16: Structure en zipper de la conformation tirée du site PBD du TZ1³⁺

On remarque qu'en passant du champ de force AMBER à la méthode semi-empirique AM1, la section efficace des zippers change moins que celle des conformations repliées et étendues. La section efficace de diffusion des structures en zipper a changé de 4%, contre 10% pour les groupes repliés et 7% pour les groupes dépliés. La structure en zipper trouvée par dynamique moléculaire REMD ressemble à la structure en zipper tirée du site PDB (code 1LE0) présentée sur la figure 16, sauf que celle-ci a un coude β entre CO(E⁵) et NH(K⁸). Sa section efficace de diffusion calculée en AMBER est 349 Å² compatible avec la valeur expérimentale (347 Å²).

En conclusion, les conformations en zipper optimisées en AMBER et AM1 sont en moyenne compatibles avec l'expérience. Par contre, l'analyse des groupes repliés et dépliés est assez compliquée car les changements de sections efficaces de diffusion entre les deux méthodes d'optimisation de structures sont importants. Au niveau AMBER, les conformères repliés F5-F7 ainsi que les structures dépliées E2-E3 sont en accord avec la mesure expérimentale. Au niveau AM1, seuls les conformères repliés F1 et F5 ont une section efficace de diffusion proche de la valeur expérimentale.

2.3 Interprétation du spectre ECD

Dans le cas des peptides amyloïdes, l'analyse de la distribution d'intensité (PIA) des fragments c/z nous a permis de sélectionner, parmi les conformations dont la section efficace de diffusion était compatible avec l'expérience, les structures les plus probables adoptées en phase gazeuse. Nous avons donc décidé de généraliser cette approche pour l'étude des peptides tryptophane zipper, en cherchant une corrélation entre l'inverse des distances des groupements protonés avec les différents carbonyles le long de la chaîne peptidique et la distribution d'intensité des fragments c/z pour chaque conformère des tableaux 2 et 3. A l'inverse de l'étude sur les peptides amyloïdes, la largeur des pics de diffusion enregistrés pour TZ1 est réduite et proche de la largeur théorique attendue pour une seule conformation. Il semble donc que l'hétérogénéité conformationnelle de TZ1 soit moins grande que pour A β ₁₂₋₂₈ où, en moyenne, 4 structures différentes sont compatibles avec les résultats expérimentaux.

Les deux sites de protonation pour TZ1²⁺ sont sur les résidus des lysines K⁸ et K¹² et la troisième charge pour TZ1³⁺ est en position N terminale. Dans tous les cas, il existe des interactions fortes entre les groupements protonés et les carbonyles avec des distances proton-oxygène NH⁺...O comprises entre 1.8 Å et 3 Å, ce qui se traduit par des distances inverses N...O dans la gamme 0.25 - 0.4 Å⁻¹. Les histogrammes des inverses des distances pour les conformères en zipper sont représentés sur la figure 17, ceux des conformères repliés sur les figures 18-19. La figure 20 présente l'histogramme des structures dépliées qui ne sont pas satisfaisantes en IMS.

2.3.1 TZ1²⁺

Pour TZ1²⁺, le spectre expérimental a été présenté sur la figure 6a. Pour les fragments c₈₋₁₁ observés, la charge est du côté N terminal et devrait donc correspondre à la capture de l'électron par la lysine K¹². On va plutôt chercher des groupes dans lesquels il existe une interaction forte du groupement ammonium du résidu K¹² avec les CO aux positions 8-9,11 et, dans une moindre mesure, 10 (les traits en noir). Par contre, les fragments z sont détectés aux positions z₁₋₇, avec un maximum à z₃₋₄. Ces ions, pour lesquels la charge est localisée du côté C terminal, peuvent avoir été produits par capture électronique sur l'une ou l'autre des lysines en position K⁸ ou K¹². Puisque les deux sites de protonation sont a priori de même basicité, on ne s'attend pas à un transfert du proton lors de la dissociation du peptide entre le fragment

chargé et le fragment neutre issus de la rupture de la liaison N-C α . Une caractéristique importante du spectre ECD de TZ1²⁺ est la très faible fragmentation au milieu de la chaîne peptidique, autour des résidus 6-7. L'un des critères pour trouver une corrélation entre l'inverse des distances N_{K+}...O avec la distribution des fragments c/z sera donc l'absence d'interaction entre les ammoniums des lysines et les carbonyles des résidus G⁶ et N⁷.

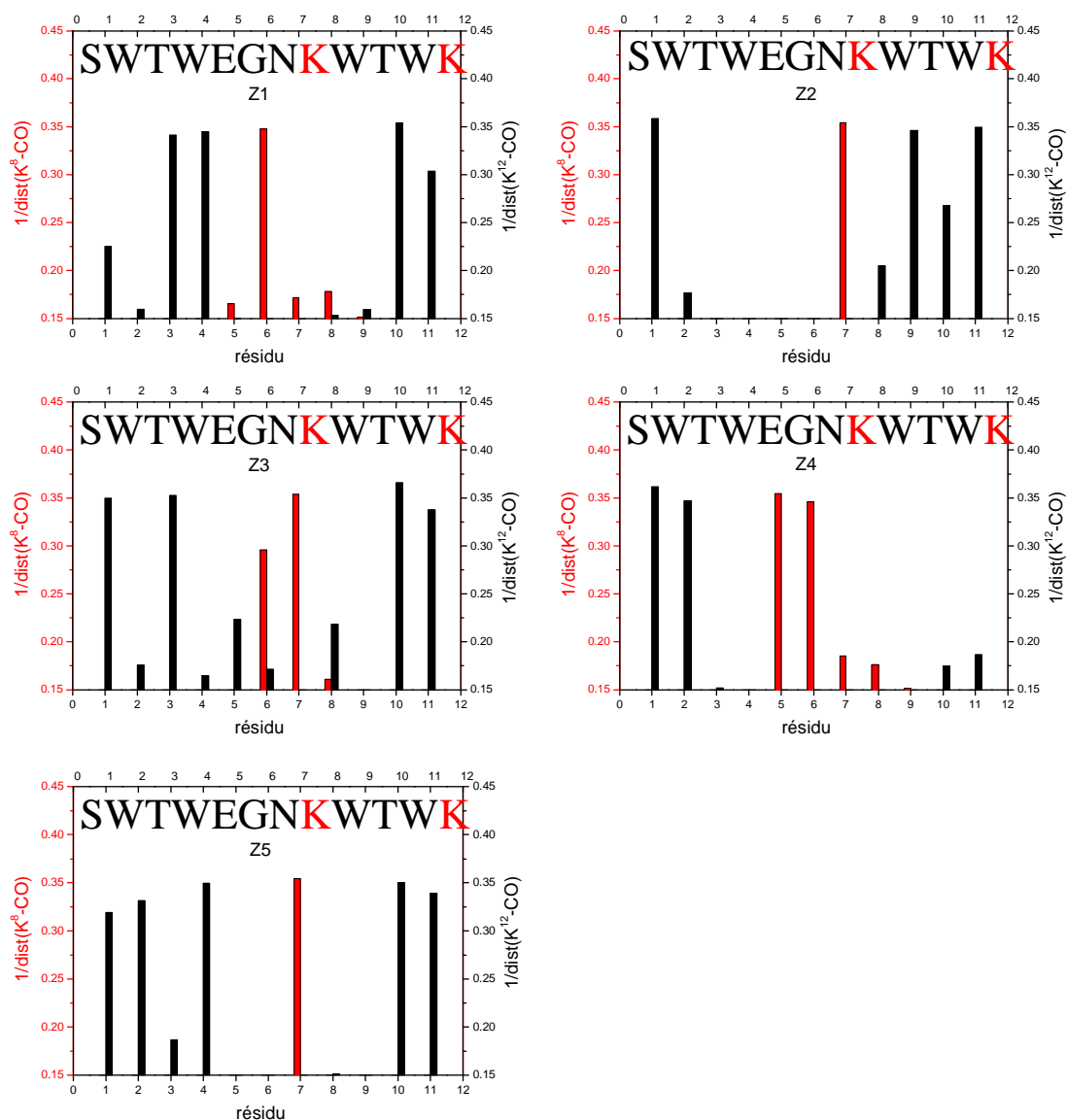


Figure 17: Inverse des distances entre NH₃⁺ (K⁸, K¹²) et les CO carbonyles pour les groupes en zipper de TZ1²⁺

Dans la plupart des groupes en zipper, le groupement ammonium de la lysine K¹² interagit avec les CO³⁻⁴ et CO⁹⁻¹¹, ce qui est cohérent avec les maxima observés expérimentalement. Par contre, le groupement ammonium de K⁸ interagit principalement avec les CO au milieu de la chaîne CO⁶⁻⁷ (figure 17). Seul le conformère Z3 serait compatible avec

la distribution c/z observée expérimentalement, l'interaction de la lysine K^8 sur le carbonyle de E^5 pouvant expliquer l'observation du fragment z_5 .

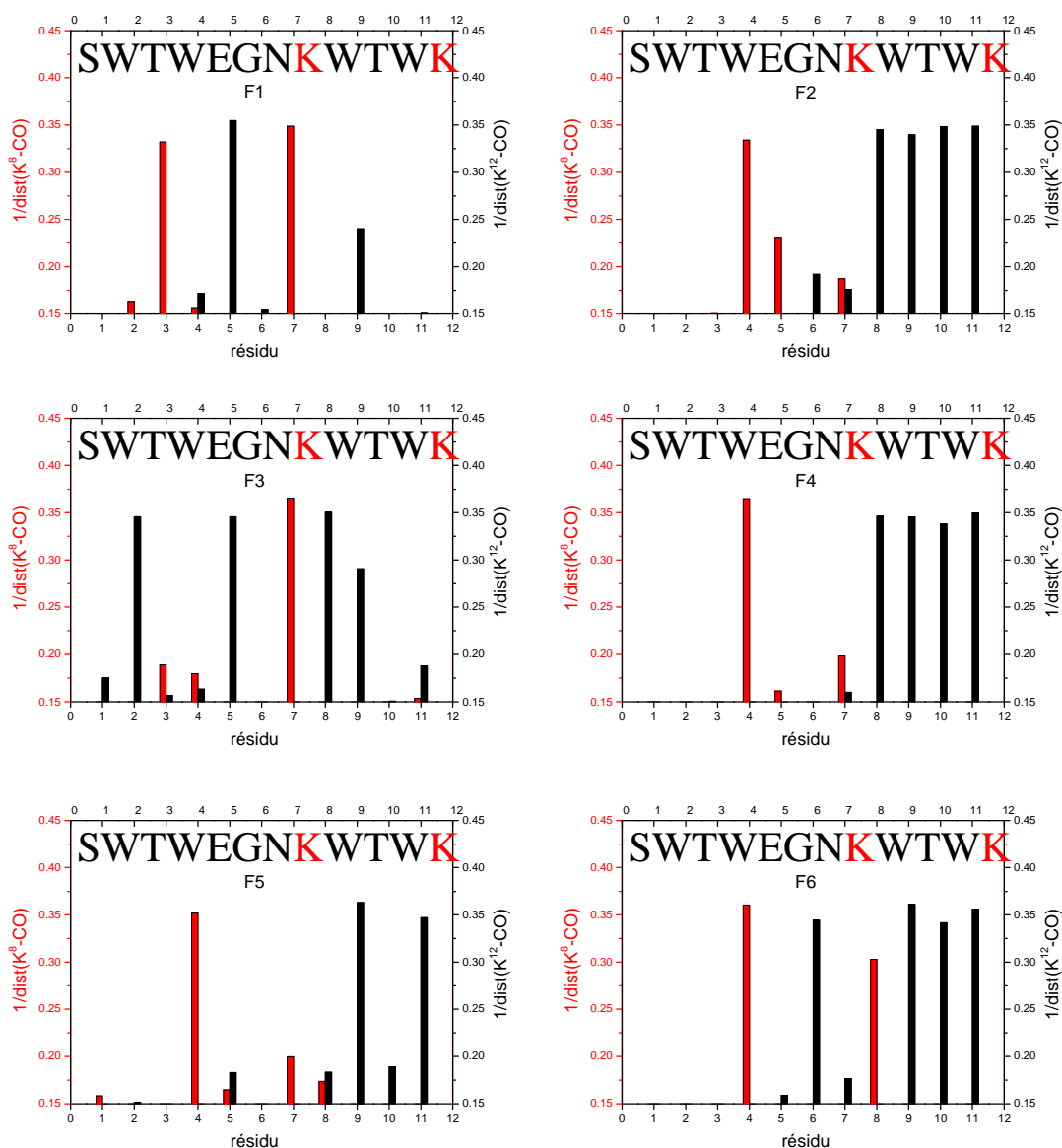


Figure 18: Inverse des distances entre NH_3^+ (K^8 , K^{12}) et les CO carbonyles pour les groupes repliés F1-F6 de $TZ1^{2+}$

Il existe aussi une interaction forte entre le groupement protoné de la lysine K^8 et la fonction amide ($CONH_2$) de l'asparagine N^7 pour toutes les structures en zipper (sauf Z6) et avec la fonction carboxyle ($COOH$) de l'acide glutamique pour les conformères Z1, Z3 et Z5. L'interaction des carbonyles avec le résidu de la lysine K^8 est donc en compétition avec les résidus de l'asparagine et de l'acide glutamique accepteurs de liaisons hydrogènes.

Pour les structures repliées, on peut exclure les groupes F1, F3, F8 et F9 car il existe une interaction entre le groupement ammonium de la lysine K^8 avec les CO^{6-7} , ce qui devrait

engendrer un fragment c ou z à la position 6 et 7. La structure F11 est également exclue car il n'existe aucune interaction du groupement ammonium de la lysine K⁸ ou K¹² avec les CO^{3-4, 8-9} qui correspondent aux maxima de la distribution des fragments c/z.

On constate que les groupes repliés F2, F4, F5, F10 et les conformères étendus E1, E2 donnent une liaison forte du proton avec CO⁴ et CO⁸⁻¹¹ ce qui pourrait expliquer les maxima observés sur les distributions PIA. Comme les conformations étendues ne sont pas compatibles avec les résultats de mobilité, nous devons néanmoins les exclure. Les conformères F6 et F7 permettent de retrouver les maxima z₄, c₈₋₁₁, mais ils présentent en plus une interaction entre le groupement protoné K¹² et CO⁶⁻⁷ qui n'est pas déduite de la distribution PIA.

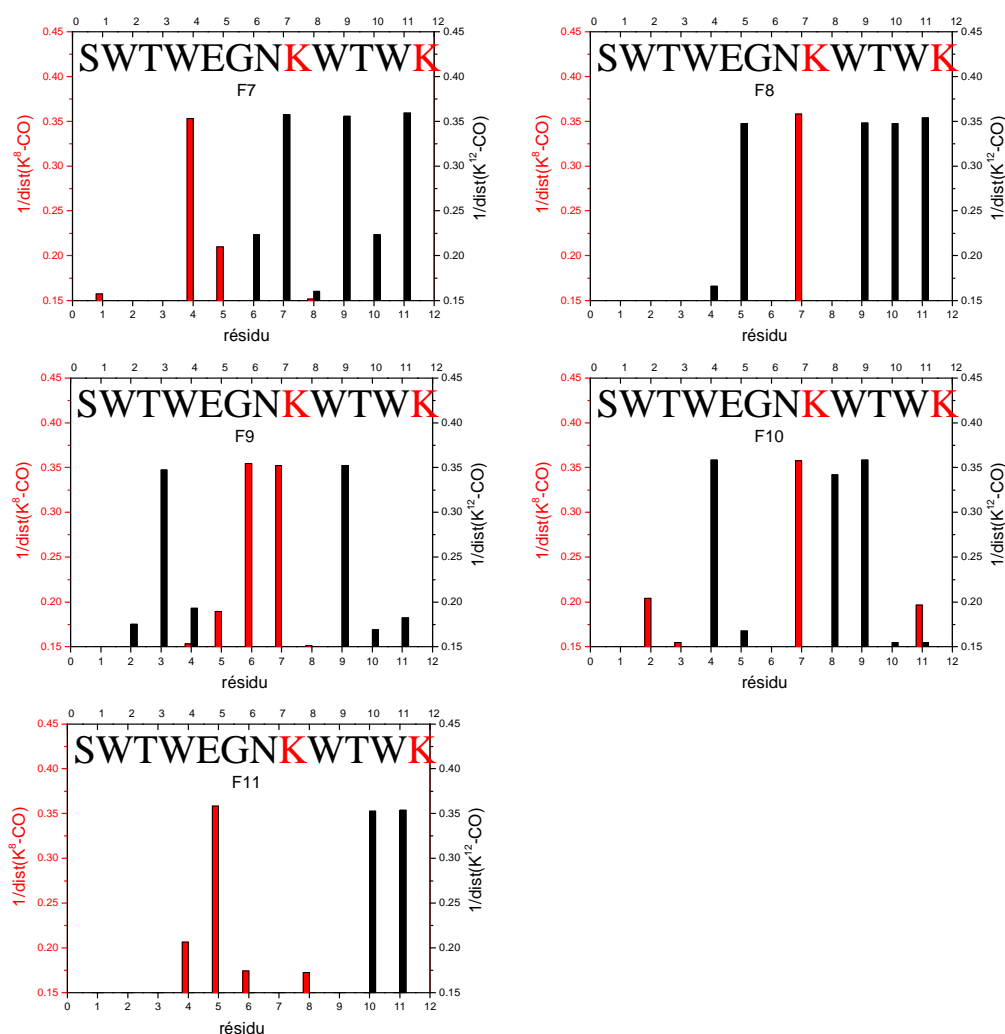


Figure 19: Inverse des distances entre NH₃⁺ (K⁸, K¹²) et les CO carbonyles pour les groupes repliés F7-F11 de TZ1²⁺

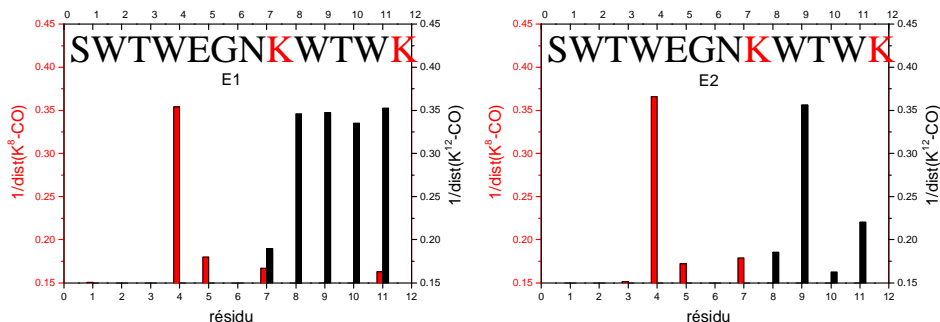


Figure 20: Inverse des distances entre NH_3^+ (K^8 , K^{12}) et les CO carbonyles pour les groupes étendus de TZ1^{2+}

En conclusion, seuls les groupes repliés F4, F5, F10 et en zipper Z3 sont à la fois satisfaisants avec les résultats de mobilité et de fragmentation ECD. Nous verrons que l'analyse du spectre IRMPD permet d'affiner ces attributions. Les deux structures dépliées présentent une corrélation satisfaisante entre l'inverse des distances K^+-O et la distribution PIA ECD, mais sont incompatibles avec la mesure de mobilité ionique. Inversement, les structures en zipper ont en moyenne une section efficace de diffusion compatible avec l'expérience mais seule Z3 permet de reproduire la distribution PIA observée en ECD. Les conformations en zipper devraient présenter une fragmentation intense c/z en milieu de la chaîne peptidique qui n'est pas observée expérimentalement. Nous pouvons rappeler ici que nous n'avons pas observé de nouveaux fragments c/z par post excitation de l'ion réduit $\text{TZ}_{1-}\text{H}_2^+$, ce qui indique que la faible intensité des ions c/z notamment en position 6 et 7 n'est pas due à la formation de complexes métastables ion-neutre qui empêcherait la détection des fragments ioniques.

2.3.2 TZ1^{3+}

La distribution PIA de TZ1^{3+} donne deux maxima c_8 , c_9 et des fragments c/z moins intenses (8%-25%) sur toute la chaîne peptidique. Les figures 21-23 présentent l'histogramme des distances pour tous les groupes du tableau 3, en zipper, étendus et repliés respectivement. Seules les interactions du proton de la lysine K^8 et K^{12} avec les CO carbonyles sont reportées. Le troisième site de protonation est localisé sur le groupement amine du N-terminal et interagit quasiment exclusivement avec le carbonyle de la première liaison peptidique. Cette interaction n'apporte donc pas d'information pour déterminer la structure adoptée par le peptide triplement chargé. Par contre, ceci peut expliquer l'observation des ions doublement chargés z_{1-2}^{2+} .

Expérimentalement, tous les ions c/z détectés sont simplement chargés, à l'exception des fragments aux extrémités de la chaîne, en position z_{1-2}^{2+} et c_{11}^{2+} . Pour chaque fragmentation de la liaison $N-C_\alpha$ le long de séquence peptide, on détecte deux fragments c_i et z_i , ce qui indique que le peptide se fragmente en deux ions simplement chargés. Les trois sites de protonation du peptide étant en position 1, 8 et 12, si l'électron est capturé par le groupement protoné de la lysine K^8 , deux fragments ioniques c_i/z_i sont alors produits, en accord avec la distribution PIA observée. Si la capture s'effectue sur la lysine K^{12} et que ce dernier interagit avec l'un des carbonyles CO entre les résidus S^1 et N^7 , de la même manière, deux fragments ioniques c/z seront détectés. Par contre, si le groupement protonés de la lysine K^{12} est en interaction avec l'un des carbonyles des résidus K^8-W^{11} , on devrait détecter des ions doublement chargés c_{8-11}^{2+} , ce qui n'est observé que pour l'ion c_{11}^{2+} . Cependant, lors de la capture électronique par l'une des lysines et après transfert d'hydrogène vers un carbonyle adjacent, un transfert de proton entre le site de plus faible affinité protonique (NH_2 terminal) vers le groupement amine neutre du résidu de la lysine est énergétiquement favorable.

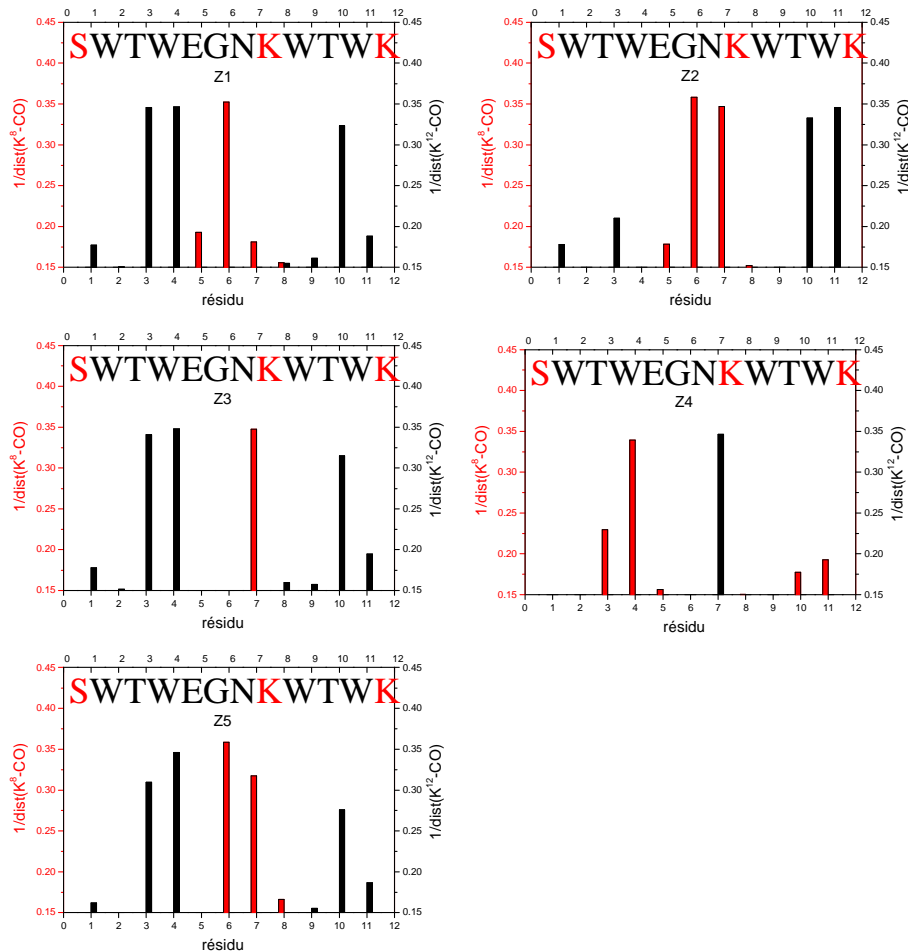


Figure 21: Inverse des distances entre NH_3^+ (K^8 , K^{12}) et les CO carbonyles pour les structures en zipper de $TZ1^{3+}$

Les conformères en zipper ont des sections efficaces de diffusion calculées pour les structures optimisées en AMBER et AM1 compatibles avec la mesure expérimentale, mais les groupements protonés de la lysine K⁸ ou K¹² n'interagissent pas avec les CO carbonyles des résidus K⁸ et W⁹. Ils sont en interaction avec les carbonyles CO^{3-4, 6-7, 10-11}. Il n'y a donc pas de corrélation avec les maxima de la distribution des fragments c/z pour ces structures. Seule la conformation Z4 présente deux interactions des ammoniums des lysines K¹² et K⁸ avec les carbonyles en position 4 et 7 respectivement, ce qui reste compatible avec le spectre ECD.

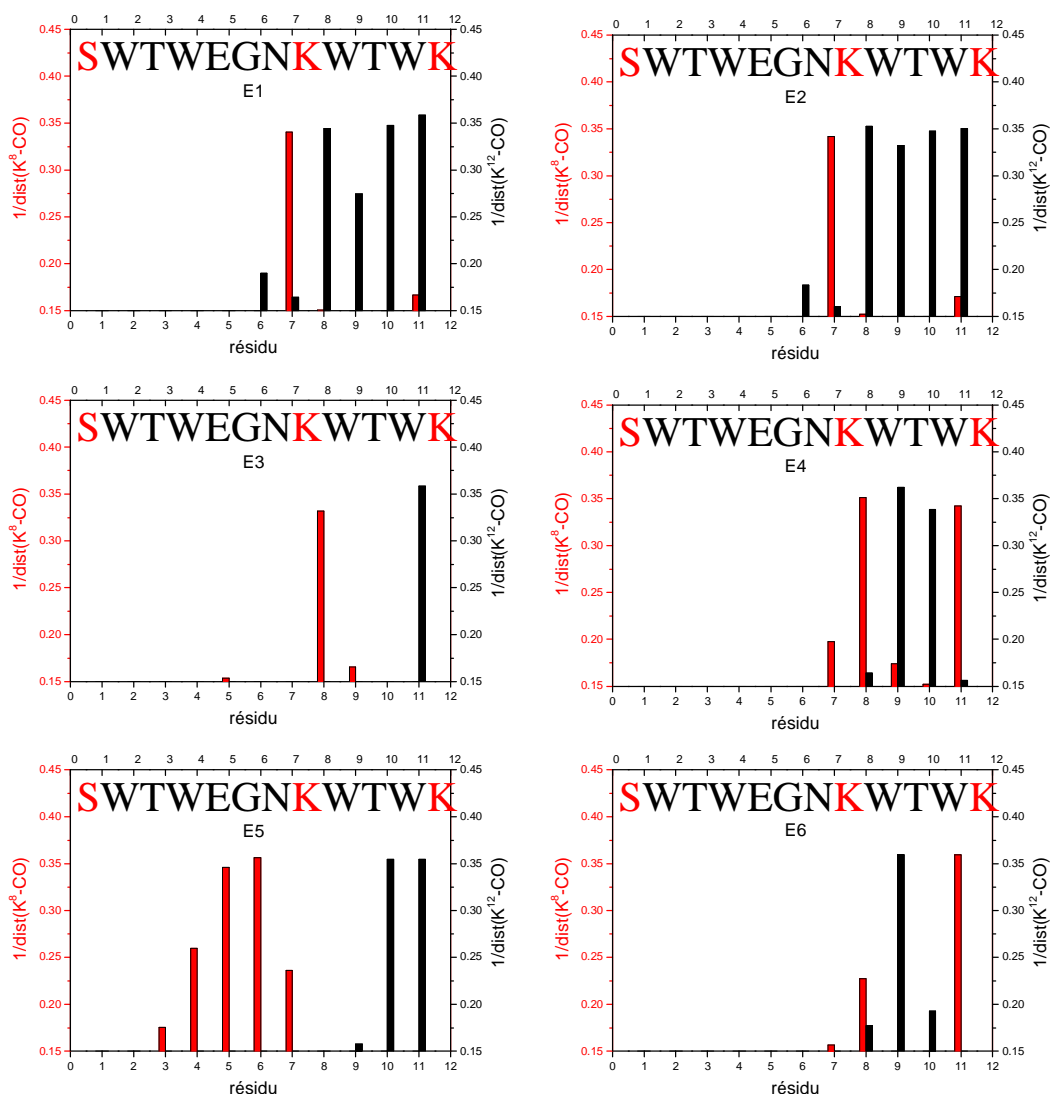


Figure 22: Inverse des distances entre NH_3^+ (K⁸, K¹²) et les CO carbonyles pour les structures étendues de TZ1³⁺

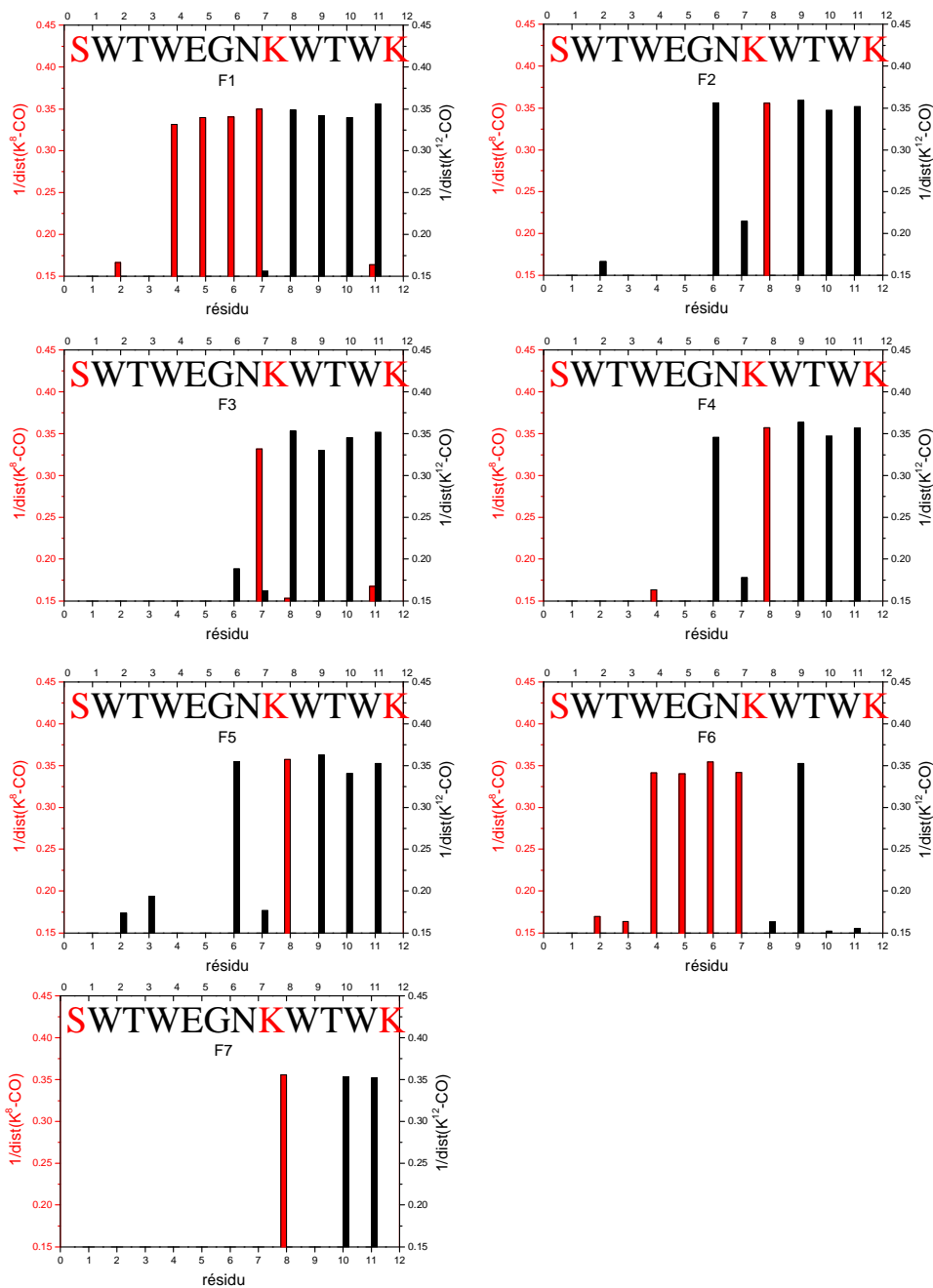


Figure 23: Inverse des distances entre NH_3^+ (K⁸, K¹²) et les CO carbonyles pour les structures repliées de TZ1³⁺

Pour les structures étendues, seul le conformères E3 a une interaction sélective des protons de la lysine K⁸ avec le carbonyle du résidu 8 et de la lysine K¹² avec le CO¹¹, en accord avec la distribution PIA de TZ1³⁺. La structure E5 peut être exclue car elle ne permet pas de reproduire les maxima observés aux positions 8-9. Pour les conformères E1 et E2, le résidu protoné de la lysine K¹² interagit avec les carbonyles adjacents aux positions 8-11 sans spécificité, ce qui devrait se traduire par l'observation de fragments c_{8-11}^{2+} , et la lysine K⁸ est en forte interaction avec le carbonyle CO⁷, ce qui ne permet pas de reproduire la distribution

des fragments *c/z* observée. Pour les structures E₄ et E₆, le résidu de la lysine K⁸ forme une liaison hydrogène avec le carbonyle W¹¹, ce qui devrait se traduire par la détection de fragments z₁₁⁺ et c₁₁⁺ (alors que l'on détecte un c₁₁²⁺), et le groupe ammonium de la lysine K¹² interagit avec les carbonyles des résidus K⁸ et W⁹, ce qui devrait engendrer la formation de fragments c_{8,9}²⁺. Le conformère E3 est le seul à avoir une section efficace de diffusion calculée (353 Å² pour l'optimisation en AMBER) compatible avec la valeur expérimentale (347 Å²) et qui présente une corrélation satisfaisante des distances avec le spectre ECD.

Pour les groupes repliés, les groupes F1 et F6 présentent une interaction entre le proton de la lysine K⁸ avec les quatre carbonyles des résidus W⁴, E⁵, G⁶ et N⁷ qui pourrait expliquer l'observation des ions fragments *c/z* d'intensité constante aux positions 4-7. Mais le groupement ammonium de la lysine K¹² interagit soit avec tous les carbonyles aux positions 8-11, soit uniquement à la position 9 (pour F6), ce qui n'est pas cohérent avec la distribution des fragments *c/z* obtenue expérimentalement. D'une manière générale, toutes les structures repliées (à l'exception de F7) présentent des interactions de la lysine K¹² avec les carbonyles des résidus en position 8-11, ce qui ne permet pas de reproduire la distribution des fragments ECD. Seule la conformation F7 serait compatible, avec une interaction K⁸ en position 8 et la lysine K¹² en interaction avec uniquement les deux derniers carbonyles en C terminal.

En conclusion pour le TZ1³⁺, l'attribution de la structure adoptée par ce peptide par l'analyse des mesures de mobilité ionique et de fragmentation ECD reste ambiguë. Les structures en zipper ont des sections efficaces de diffusion calculées à partir des optimisations AM1 en accord avec l'expérience de mobilité ionique, mais seule la structure Z4 peut être compatible avec la distribution de fragments *c/z*, sans reproduire les maxima observés en position 8 et 9. Les structures F7 et E3 donnent le meilleur accord pour retrouver la distribution des fragments *c/z* et ont des sections efficaces de diffusion calculées pour les structures en AMBER (352 et 357 Å²) compatibles avec la mesure expérimentale (347 Å²). Par contre, les sections efficaces de diffusion calculées à partir des optimisations en AM1 sont nettement plus grandes (371 et 374 Å²). A l'inverse, les structures F1 et F5 sont les seules ayant une section de diffusion calculée en AM1 en accord avec l'expérience, mais il n'existe pas de réelle corrélation entre l'inverse des distances K⁺-CO et la distribution des fragments *c/z*.

2.4 Interprétation du spectre IRMPD

2.4.1 Simulation de spectre IRMPD TZ1²⁺

Le spectre IRMPD de TZ1²⁺ est simulé par la méthode hybride ONIOM DFT/B3LYP/6-31*/AM1 implémentée dans Gaussian 09. La répartition des atomes dans les deux couches est illustrée sur la Figure 24. Les atomes des résidus tryptophane W^{2,4,9,11} ainsi que la chaîne alkyle (CH₂)₂ du résidu lysine K^{8,12} sont inclus dans la couche basse (AM1), tous les autres atomes étant inclus dans la couche haute (DFT/B3LYP/6-31*). Le spectre simulé est présenté après une convolution par une fonction gaussienne de largeur 25cm⁻¹.

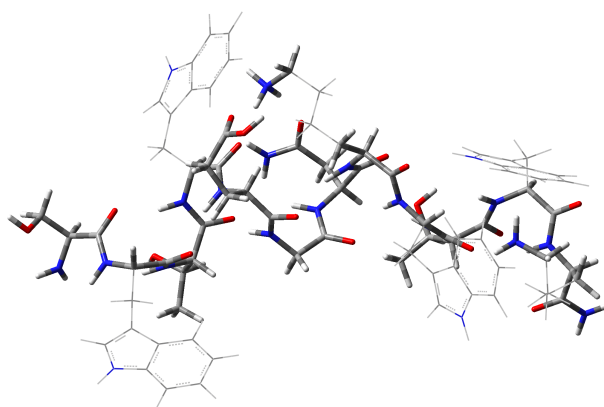


Figure 24: Partition en couches haute et basse dans le cas de TZ1 pour les calculs en ONIOM. Les atomes de la couche haute sont représentés en tube et les atomes de la couche basse sont représentés en fil.

La simulation du spectre IR des trois structures en zipper Z1, Z3 et Z5 qui ont une section efficace de diffusion compatible avec l'expérience est reportée sur la Figure 25. En moyenne, la bande amide I n'est pas bien reproduite, notamment dans la partie des hautes fréquences qui correspondent aux modes CO non engagés dans des liaisons hydrogènes. Les structures en zipper présentent en moyenne autant de groupements carbonyles libres qu'en interaction avec des amides peptidiques, ce qui se caractérise par une bande amide I simulée large avec une structure de bande dédoublée en deux maxima. De plus, les intensités calculées des bandes amides I et amide II sont en moyenne égales, alors que l'on observe expérimentalement une bande amide I plus intense. La structure Z3 est celle qui reste compatible avec le spectre IRMPD et c'est celle qui a été sélectionnée après l'analyse de la fragmentation ECD.

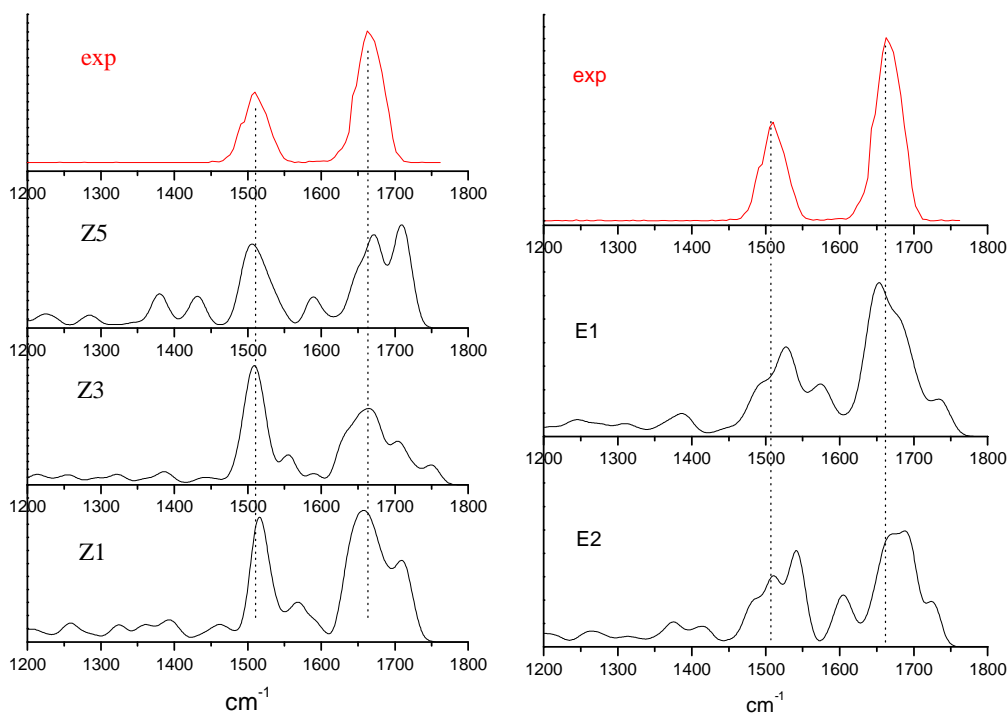


Figure 25: Simulations des spectres IR des conformations en zipper Z1, Z3 et Z5, des conformations dépliées E1 et E2 et comparaison avec le spectre expérimental de TZ1²⁺.

Les simulations IR des structures repliées F4-F11 sont reportées sur la Figure 26. Les conformations F5 et F10 sont celles qui donnent le meilleur accord avec le spectre IRMPD, sans être parfait. La position des maxima des bandes amide I et amide II est bien reproduite et la forme des bandes est la plus proche de l'expérience. Pour ces deux conformations, une bande de faible intensité autour de 1725 cm^{-1} est calculée et correspond aux élongations carbonyles des groupements CO-NH_2 du C terminal et du résidu asparagine, ainsi que du groupement acide COOH du résidu acide glutamique. Nous avons enregistré le spectre expérimental en réduisant la puissance et le temps d'irradiation du laser CLIO afin d'éviter les effets de saturation des bandes intenses amide I et amide II et il est possible que, dans ces conditions, les bandes de faibles intensités ne sortent pas du bruit. Pour les autres conformations repliées, l'accord avec le spectre expérimental est encore plus mauvais, notamment pour le conformère F4 qui avait été sélectionné par l'analyse de spectre de fragmentation ECD et la mesure de section efficace de diffusion.

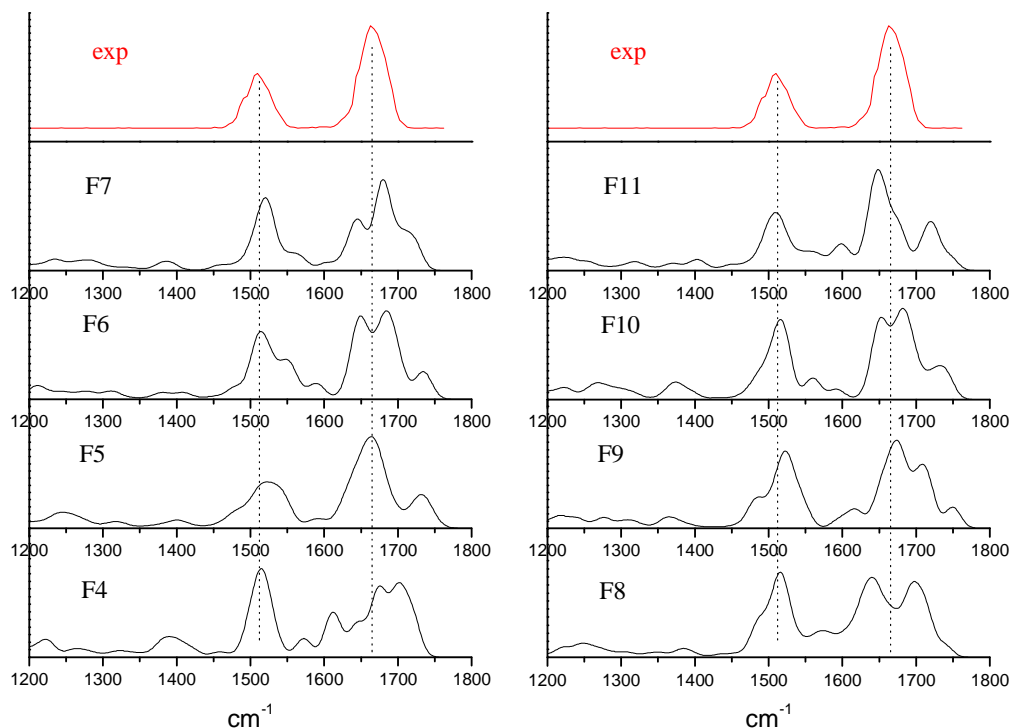


Figure 26: Simulations des spectres IR des conformations repliées F4-F11 et comparaison avec le spectre expérimental de TZ1²⁺.

3. Conclusion

Nous avons effectué une étude combinée mobilité ionique, fragmentation ECD et spectroscopie IRMPD pour déterminer les structures des peptides tryptophane zipper TZ1 doublement et triplement chargés. Pour le doublement protoné, les trois structures Z3, F5 et F10 permettent de reproduire correctement les mesures expérimentales (Figure 27). Pour le triplement protoné, plusieurs structures sont compatibles avec les mesures de mobilité ionique et fragmentation ECD, mais l'accord est en moyenne moins satisfaisant (Figure 28). Les conformères Z4, F7 et E3 ont une section efficace de diffusion moyenne calculée à partir des optimisations AMBER de 349 \AA^2 et donnent la meilleure corrélation sur le spectre ECD. Les structures Z4, F1 et F5 ont une section efficace de diffusion moyenne calculée à partir des optimisations AM1 de 352 \AA^2 mais l'accord avec le spectre ECD n'est pas très bon. Nous avons constaté, comme pour l'étude sur les peptides amyloïdes, une augmentation importante de la section efficace de diffusion quand on passe des structures optimisées en AMBER à AM1. De plus, ces changements dépendent de la structure adoptée par le peptide, les formes repliées étant celles qui voient leurs sections efficaces de diffusion augmenter le plus, à

l'inverse des formes en zipper. Il est par conséquent difficile de se fier à l'une ou l'autre des méthodes et l'attribution des structures est donc délicate. Pour les deux états de charge, la forme native en zipper est partiellement, voire complètement perdue au passage à la phase gazeuse.

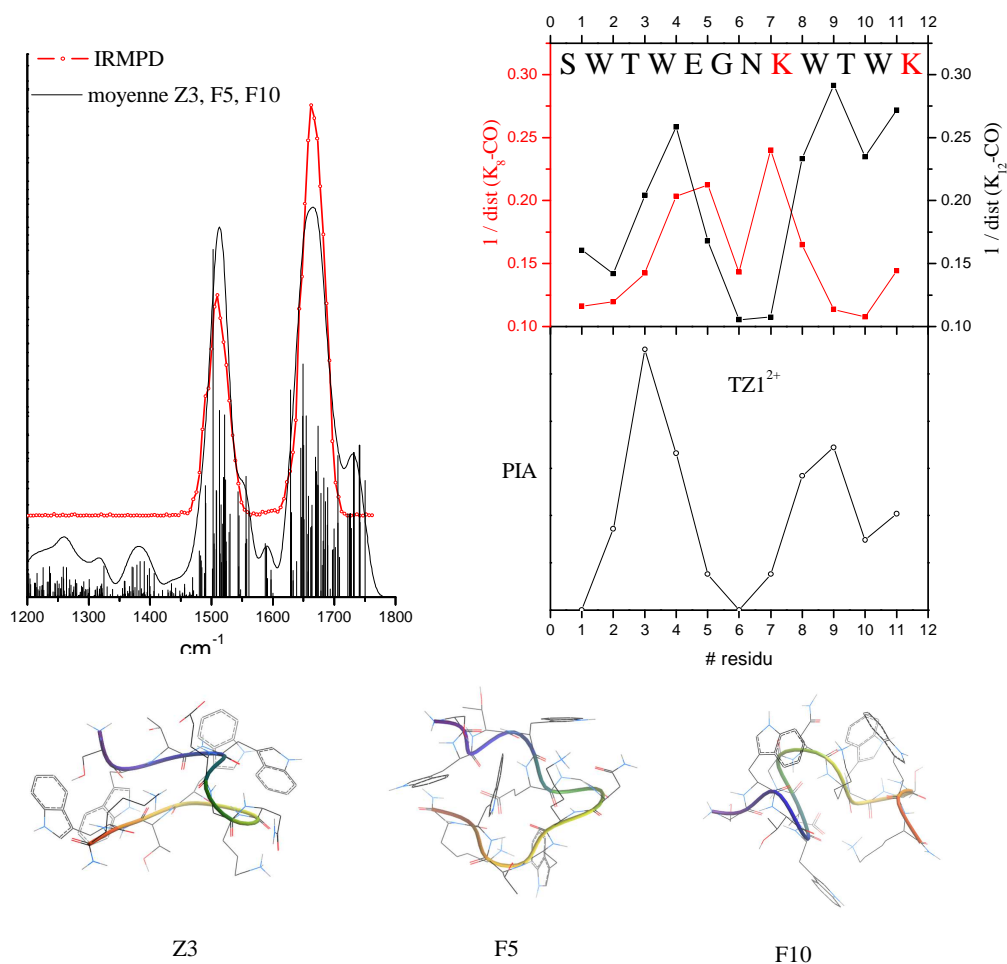


Figure 27: Simulation du spectre vibrationnel et comparaison entre la distribution des fragments c/z (bas) et les interactions des groupements protonés en K⁸ et K¹² avec les carbonyles des résidus le long de la chaîne peptidique pour les trois conformères Z3, F5 et F10 de TZI²⁺, dont la section efficace moyenne calculée pour les structures optimisées en AMBER et AM1 est de 325 Å² et 340 Å² (expérimentale 329 Å²).

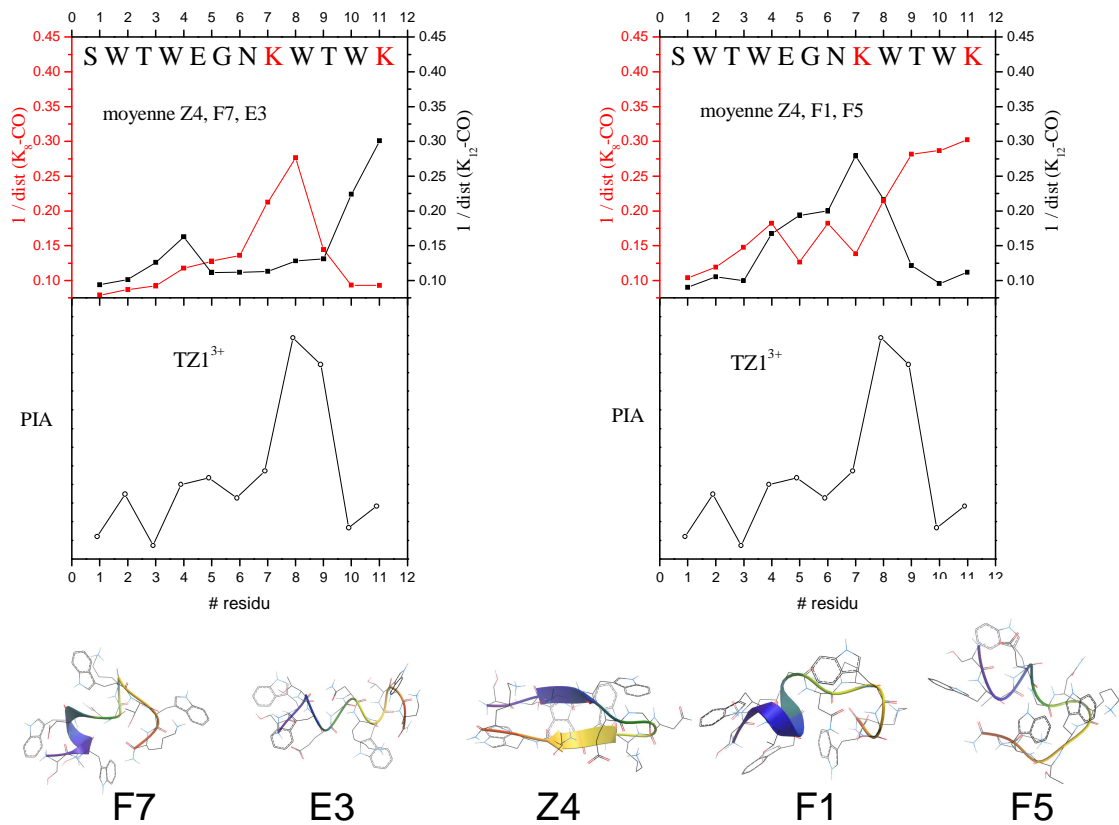


Figure 28: TZI³⁺: Comparaison entre la distribution des fragments c/z et les interactions des groupements protonés en K⁸ et K¹² avec les carbonyles des résidus le long de la chaîne peptidique pour : (haut) les conformères Z4, F7 et E3 dont la section efficace moyenne calculée pour les structures optimisées en AMBER est de 349 Å². (bas) les conformères Z4, F1 et F5 dont la section efficace moyenne calculée pour les structures optimisées en AM1 est de 352 Å² (expérimentale 347 Å²).

III. Etude structurale de TZ4^{2+} et $[\text{TZ4mod}]^{2+}$ en phase gazeuse

4. Résultats expérimentaux

4.1 Expérience de mobilité ionique

Les profils temporels de diffusion (ATD) des peptides TZ4^{2+} et $[\text{TZ4mod}]^{2+}$ sont donnés à la Figure 29. Deux séries de mesures ont été effectuées au LASIM (Université Lyon I) en 2011 et 2013. Le profil temporel de chaque séquence se compose de deux pics principaux bien distincts. L'analyse en masse, par le spectromètre de masse à temps de vol de type reflectron, nous permet de déterminer le rapport m/z des ions correspondant aux deux temps de diffusion dans la cellule de collision. Pour les deux systèmes, les ions ayant le temps de diffusion le plus grand correspondent bien au peptide doublement chargé. La très bonne résolution en masse du spectromètre permet de retrouver la distribution isotopique de TZ4^{2+} à m/z 1606.57, 1607.08, 1607.58 pour les ions correspondant au temps de diffusion de 78 ms (Figure 30 a). Les ions arrivant au temps de diffusion de 66 ms ont le même rapport m/z , mais avec des pics de masse supplémentaires à 1606.82 et 1607.32. Il s'agit donc de dimère de TZ4 quatre fois protoné. L'analyse est identique pour TZ4mod (Figure 30 b).

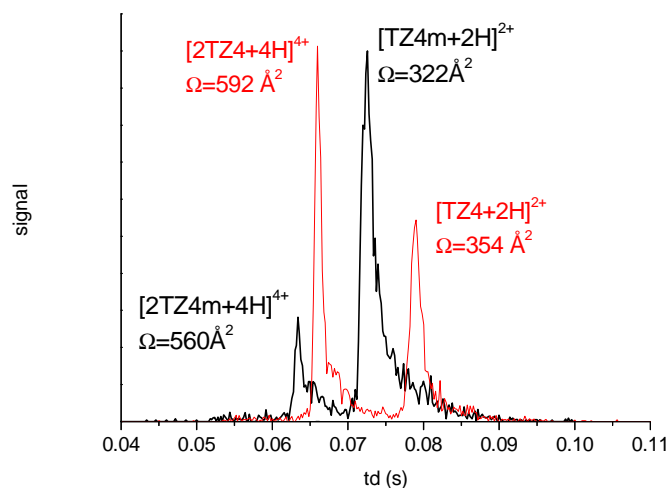


Figure 29 : Distribution en temps de l'intensité des ions correspondant à la masse m/z de TZ4^{2+} (en trait rouge) et $[\text{TZ4mod}]^{2+}$ (en trait noir).

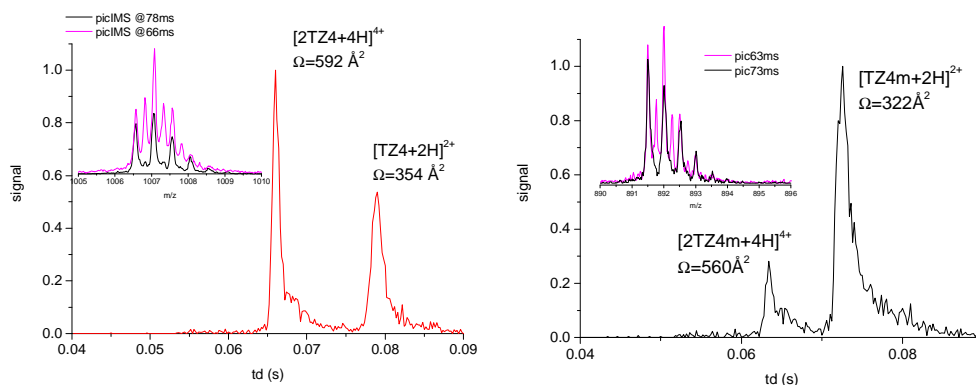


Figure 30 : Distribution isotopique des ions $TZ4^{2+}$ et $[TZ4mod]^{2+}$ sélectionnés par mobilité.

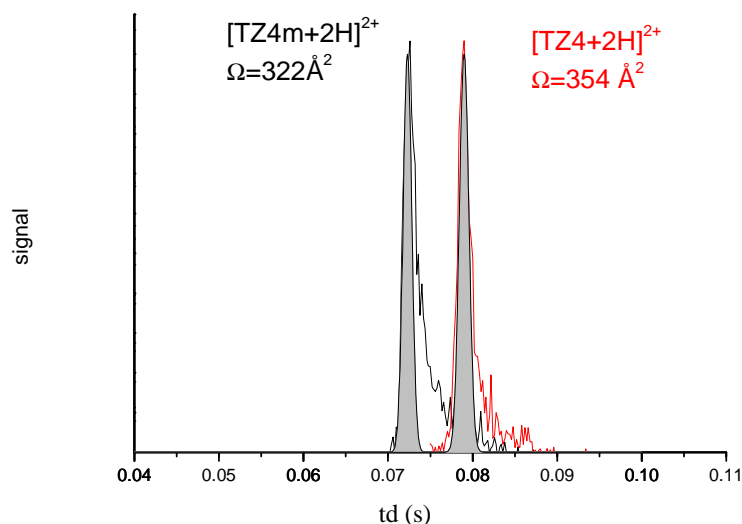


Figure 31: Profil temporel de diffusion (s) des ions des ions monomères de $TZ4^{2+}$ (en trait rouge) et $[TZ4mod]^{2+}$ (en trait noir). Les parties grisées correspondent aux temps de diffusion calculés pour une seule conformation ayant une section efficace de 322 \AA^2 et 354 \AA^2

Les améliorations techniques sur l'expérience en 2013 (introduction d'un funnel en amont de la cellule de mobilité pour mieux guider et transmettre les ions produits par la source ESI) ont permis d'augmenter sensiblement le signal d'ion à la sortie du tube de mobilité et de déterminer précisément le rapport m/z associé aux deux pics de diffusion. Ceci n'avait pas pu être possible sur la première série de mesure en 2011. Nous pensions alors que deux types de structures des peptides doublement protonés étaient présents, le pic de diffusion aux temps courts correspondant à une section efficace de diffusion beaucoup plus petite (autour de 285 \AA^2).

On peut noter que l'intensité du signal de dimère est plus grande pour TZ4 que pour TZ4mod, alors que les solutions ont la même concentration (20 μM). Ces deux peptides diffèrent uniquement par la substitution de deux tryptophanes par des alanines aux positions 5 et 12. On peut aussi rappeler que nous n'avons pas détecté de signal de dimère pour TZ1, quelle que soit la concentration utilisée. Les études en phase condensée ont montré que TZ4 avait la température de dénaturation la plus haute (70 °C) et que les interactions en stacking des résidus indoles des tryptophanes renforcent la stabilité de la forme en zipper pour ces peptides.¹⁴ Ils semblent donc que l'observation et l'intensité des ions dimères en phase gazeuse soit corrélée à la stabilité de la forme en zipper connue en phase condensée. Des résultats préliminaires sur les structures possibles du dimère de TZ4 seront donnés en Annexe.

Dans ce chapitre, on ne considère que les monomères de $[\text{TZ4}]^{2+}$ et $[\text{TZ4mod}]^{2+}$. La section efficace de diffusion de TZ4 doublement chargé est de $354 \text{ \AA}^2 \pm 7 \text{ \AA}^2$ et celle de TZ4mod doublement chargé est de $322 \text{ \AA}^2 \pm 7 \text{ \AA}^2$ (Figure 31). La section efficace de diffusion du monomère de TZ4 est plus grande que celle du TZ4mod. Cela peut s'expliquer par la taille de la chaîne latérale du tryptophane (indole) par rapport à celle de l'alanine (CH_3). Les parties grisées sont les simulations du temps de diffusion pour une seule conformation dont la section efficace correspond au maximum du pic de mobilité. Cette largeur intrinsèque dépend de la diffusion des ions dans la cellule maintenue à 300K et à une pression de 10 Torr. La largeur à mi-hauteur expérimentale du pic de diffusion est légèrement supérieure à celle calculée pour une conformation unique. L'épaule aux grands temps de diffusion est, d'une part, dû à la largeur initiale du paquet d'ion (1 ms) et, d'autre part, à la possibilité d'avoir des conformations ayant des sections efficaces plus grandes. Comme pour l'étude de TZ1, la largeur expérimentale est plus petite que celle observée pour les peptides amyloïdes $\text{A}\beta_{12-28}$. On peut considérer qu'un nombre réduit de conformations ayant une dispersion des sections efficaces de diffusion inférieure à la résolution de l'expérience est présent dans ces conditions expérimentales.

4.2 Expérience ECD

Les spectres de masse ECD des ions $[\text{TZ4}]^{2+}$ (m/z 1006.95) et $[\text{TZ4mod}]^{2+}$ (m/z 891.41) ont été obtenus au Laboratoire des Mécanismes Réactionnels (LMR, Palaiseau) et sont reportés sur les Figures 32 et 33. Dans les deux cas, ils présentent une série de fragments

c/z. Pour les deux peptides doublement chargés, on observe un pic de masse correspond à l'espèce réduite MH_2^+ après capture électronique à m/z 2012.92 pour $TZ4^{2+}$ et à m/z 1782.85 pour $[TZ4mod]^{2+}$. La distribution isotopique de ces ions réduits est présentée sur les Figures 32 et 33. On note aussi la détection de l'espèce réduite avec perte d'hydrogène à la masse du peptide simplement protoné MH^+ . L'observation des fragments (b/y) est reliée à la fragmentation secondaire de MH^+ .

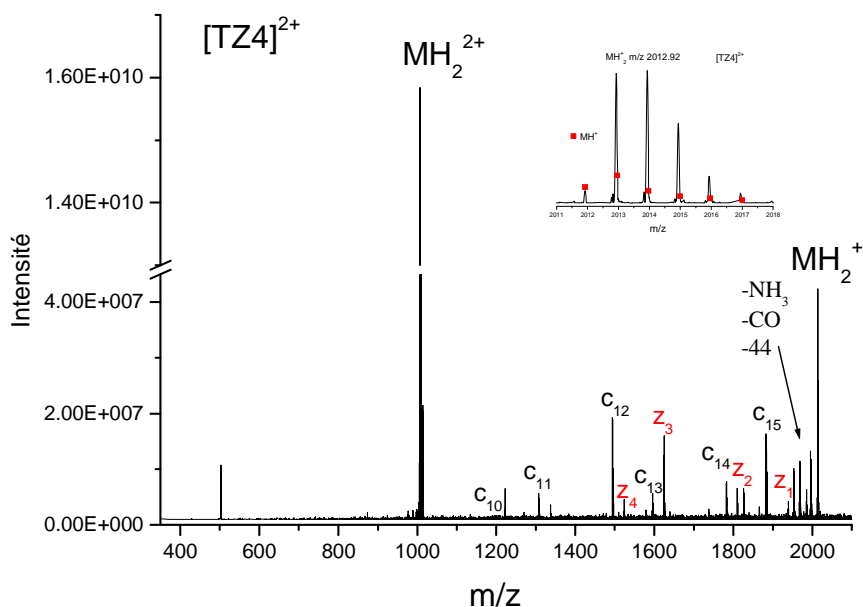


Figure 32: Spectre de masse ECD de l'ion $TZ4^{2+}$. Dans l'encart, zoom sur la région correspondant à la masse de peptide réduit.

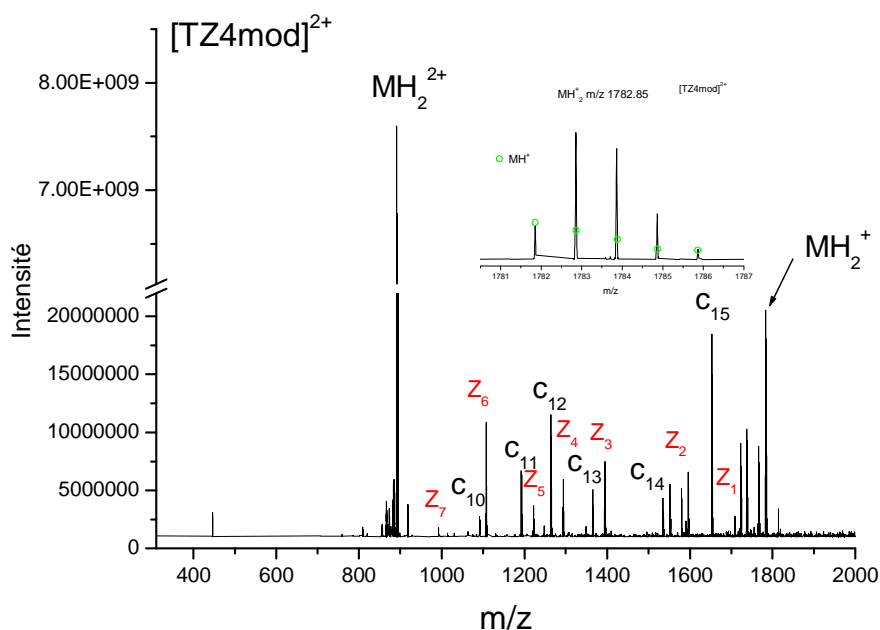


Figure 33: Spectre de masse ECD de l'ion $[TZ4mod]^{2+}$. Dans l'encart, zoom sur la région correspondant à la masse de peptide réduit.

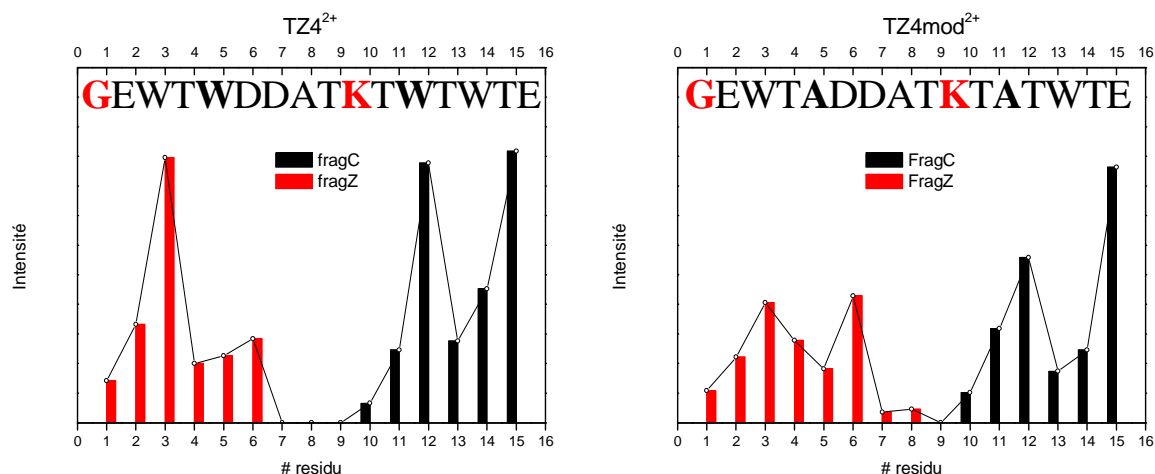


Figure 34: Distribution de l'intensité des fragments c/z le long de la chaîne peptidique pour $TZ4^{2+}$ et $[TZ4mod]^{2+}$.

La distribution des fragments c/z (PIA) le long de chaîne peptidique est reportée sur la Figure 34 pour $TZ4^{2+}$ et $TZ4mod^{2+}$. La nomenclature de fragmentation ECD est toujours la même : les fragments c_i/z_i correspondent à la rupture de la même liaison peptidique $N-C_\alpha^{i+1}$ et sont numérotés en partant du N terminal. Les fragmentations b/y sont aussi observées dans l'expérience ECD. On constate que les fragments y_{1-3} sont détectés dans les deux séquences, les fragments b_{12-14} ne sont observés que pour $[TZ4mod]^{2+}$.

La distribution globale des fragments c/z est relativement identique pour les deux séquences. Elle est principalement centrée aux deux bouts de la chaîne. La fragmentation au milieu de la chaîne entre les résidus D^7 et T^9 est absente pour $TZ4$ et très faible pour $TZ4mod$. Les ions z_{1-6} sont associés à la rupture de la liaison $N-C_\alpha$ avec la charge qui est du côté C terminal alors que pour les ions c_{10-15} , la charge est localisée du côté N terminal. Pour les deux séquences, on observe des maxima pour z_3 , c_{12} et c_{15} . La seule différence notable est qu'un fragment intense z_6 est observé dans $TZ4mod^{2+}$, qui correspond à la rupture de la liaison $N-C_\alpha$ entre les résidus D^6 et D^7 .

4.3 Spectres post-ECD

Pour les deux peptides, on détecte un signal d'ion intense à la masse du peptide réduit MH_2^+ , ce qui indique qu'une partie des molécules ne se dissocie pas après capture

électronique. Nous avons effectué une série d'expériences complémentaires d'excitation post-ECD au laboratoire LCP (Orsay) sur le dispositif FT-ICR du groupe de Ph. Maitre. La Figure 35 présente le spectre post-ECD des deux séquences. Pour $TZ4^{2+}$, deux fragments z_6 et z_9 sont produits par l'excitation de l'ion réduit par absorption IR (laser CO_2). On peut noter que le fragment z_9 n'est pas observé sans post-excitation. Pour $TZ4mod^{2+}$, on détecte les fragments z_{7-9} par post-excitation. Ce sont ceux qui avaient la plus faible intensité sur le spectre ECD. On peut noter que l'intensité des fragments produits par post-excitation est très faible par rapport au signal d'ion détecté sur les spectres ECD. On peut en conclure qu'une partie des ions ne se dissocie pas après capture électronique, sûrement par formation de complexes métastables ion-neutre, mais que ce processus reste peu important par rapport à la fragmentation directe qui amène à la détection des fragments c/z . La deuxième remarque est que les fragments induits par post-excitation correspondent aux ruptures de liaisons $N-C_\alpha$ au milieu de la chaîne peptidique entre les résidus D^6 et T^9 . Cela peut être relié à la structure secondaire du peptide. Dans une forme repliée, des liaisons hydrogènes entre les résidus des deux bouts du peptide peuvent empêcher la dissociation des fragments neutre et ionique au centre du peptide.

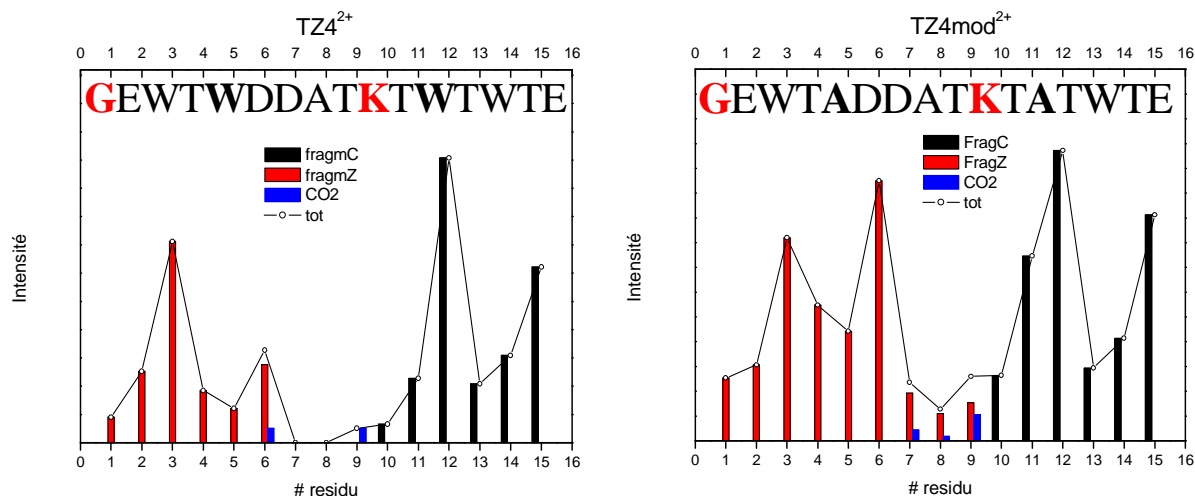


Figure 35: Distribution des fragments c/z de $TZ4^{2+}$ et $TZ4mod^{2+}$ de l'expérience ECD et excitation post-ECD.

4.4 Spectres IRMPD

Les ions deux fois chargés de TZ4 et TZ4mod, aux masses m/z 1006.95 et m/z 891.41 respectivement, ont été sélectionnées et irradiées par le laser à électron libre. Les spectres

IRMPD sont reportés sur la Figure 36 et présentent les bandes caractéristiques amide-I et amide-II d'une largeur de 55 cm^{-1} . Les deux peptides ont la même spectroscopie. La bande amide-I centrée à 1670 cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation de C=O. L'épaulement vers le bleu de la bande principale à 1740 cm^{-1} est caractéristique des modes CO des groupements acides COOH présents dans les résidus acide glutamique E² et E¹⁶ et acide aspartique D⁶ et D⁷. La bande amide-II, dont le maximum est centré à 1510 cm^{-1} , correspond aux modes de pliage N-H et d'élongation C-N. Le taux de fragmentation chute d'un ordre de grandeur dans la région amide III ($1200\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$) et il est très difficile de distinguer sans ambiguïté des bandes. Comme pour les autres systèmes, on ne considère que les fréquences des bandes amide-I et amide-II pour interpréter les spectres IRMPD par comparaison avec des simulations des spectres vibrationnels par la méthode ONIOM.

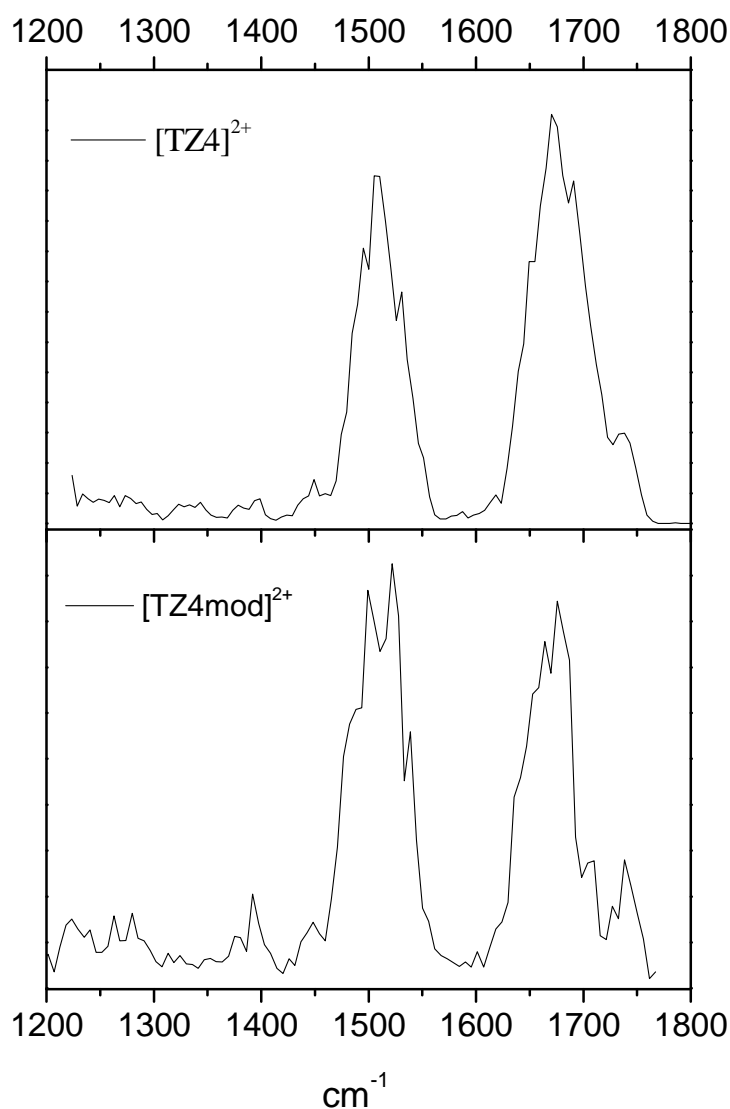


Figure 36: Spectre IRMPD expérimental du TZ4^{2+} et de $[\text{TZ4mod}]^{2+}$ dans la région $1200\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$

5. Interprétation des résultats

5.1 Simulation de REMD

Plusieurs simulations de dynamique moléculaire par échange de réplique REMD ont été réalisées pour TZ4 et TZ4mod. La structure primaire de TZ4 est GEWTW⁵DDATK¹⁰TW¹²TWTE-NH₂. Pour TZ4mod, deux tryptophanes en position 5 et 12 sont substitués par des alanines. Pour les deux peptides, les deux sites de protonation les plus favorables sont sur le résidu basique (lysine K¹⁰) et le groupement amine de la glycine en N terminal. Une première dynamique a été propagée sur plusieurs nanosecondes en partant d'une forme en zipper pour les deux peptides. Une première analyse rapide nous a indiqué qu'il ne serait pas possible de trouver des structures pour lesquelles la section efficace de diffusion serait inférieure à 300 Å². Les résultats de mobilité ionique obtenus en 2011 nous laissaient penser qu'il y avait deux types de structures pour ces peptides, le pic diffusion aux temps courts (autour de 65 ms) correspondant à une section efficace de diffusion d'environ 285 Å². Nous avons donc réalisé d'autres dynamiques REMD en partant d'une forme zwitterionique des peptides où tous les sites basiques sont déprotonés afin de favoriser les structures très compactes maintenues par des interactions électrostatiques fortes. L'état de charge des structures zwitterioniques est alors -2. Une fois le regroupement en famille de structures effectué, on rajoute les protons manquant pour obtenir le bon état de charge (+2) et calculer les sections efficaces de diffusion.

Comme pour l'étude de TZ1, nous avons recherché des familles de structures à partir de paramètres structuraux tels que la distance d entre les deux carbones C_α des résidus en position C et N terminale, les distances N⁺-O entre les deux azotes quaternaires et les oxygènes des 15 liaisons peptidiques. Les différentes familles de structures ayant une section efficace de diffusion la plus proche de la valeur expérimentale sont reportées dans les tableaux 4-5 pour TZ4 et les tableaux 6-7 pour TZ4mod.

Tableau 4: Sections efficaces de diffusion Ω (\AA^2) et énergies (kcal/mol) des groupes en zipper et repliés, calculées au niveau AMBER et AM1 pour TZ4²⁺. La section efficace de diffusion expérimentale est 354 \AA^2 .

Conformation	d(\AA)	Ω (\AA^2)		Energie		
		AMBER	AM1	AMBER	AM1	
Zipper						
PDB		407				
Z1	2.8	387	409	45	29	18
Z2	6.7	386	413	35	22	25
Repliée						
F1	6.9	356	384	2	1	5
F2	4.3	359	396	23	18	10
F3	6.6	361	388	12	9	0
F4	4.7	366	419	9	4	5
F5	4.9	369	400	3	0	10
F6	4.5	372	392	13	9	0
F7	5.7	374	400	19	10	17
F8	8.2	377	417	17	13	16
F9	5.0	380	392	22	13	11

Tableau 5: Sections efficaces de diffusion Ω (\AA^2) et énergies (kcal/mol) des groupes en zipper et repliés, calculées au niveau AMBER et AM1 pour TZ4²⁺ en forme zwitterion. La valeur de section efficace de diffusion expérimentale est 354 \AA^2 .

Conformation	d(\AA)	Ω (\AA^2)		Energie		
		AMBER	AM1	AMBER	AM1	
Repliée						
F10	4.0	356	406	0	1	36
F11	4.6	359	413	24	24	12
F12	3.8	359	392	19	23	19
F13	5.2	370	414	17	36	4
F14	7.5	373	395	25	31	16

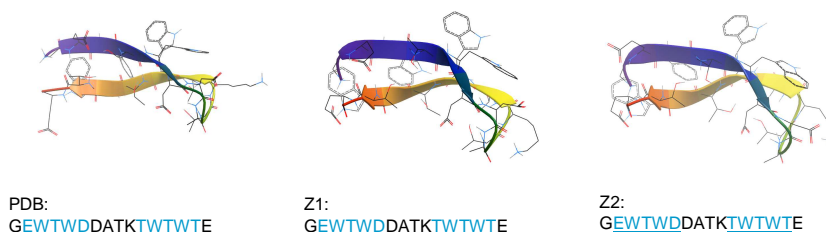


Figure 37 : Les conformations en zipper du TZ4²⁺ avec la séquence en lettres. Les parties feuillet β sont représentées par les lettres bleues surlignées.

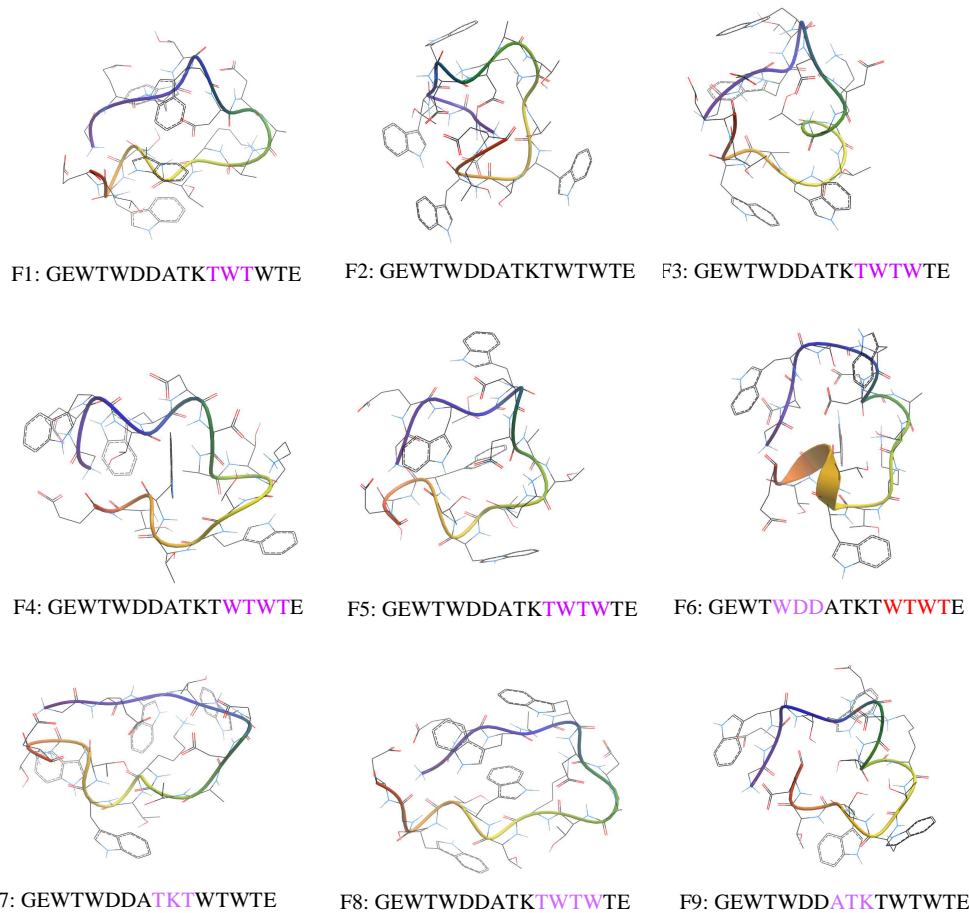


Figure 38 : Les conformations repliées du TZ4²⁺ avec la séquence en lettres, les parties en hélice α sont représentées en rouge, les hélices 3_{10} en violet.

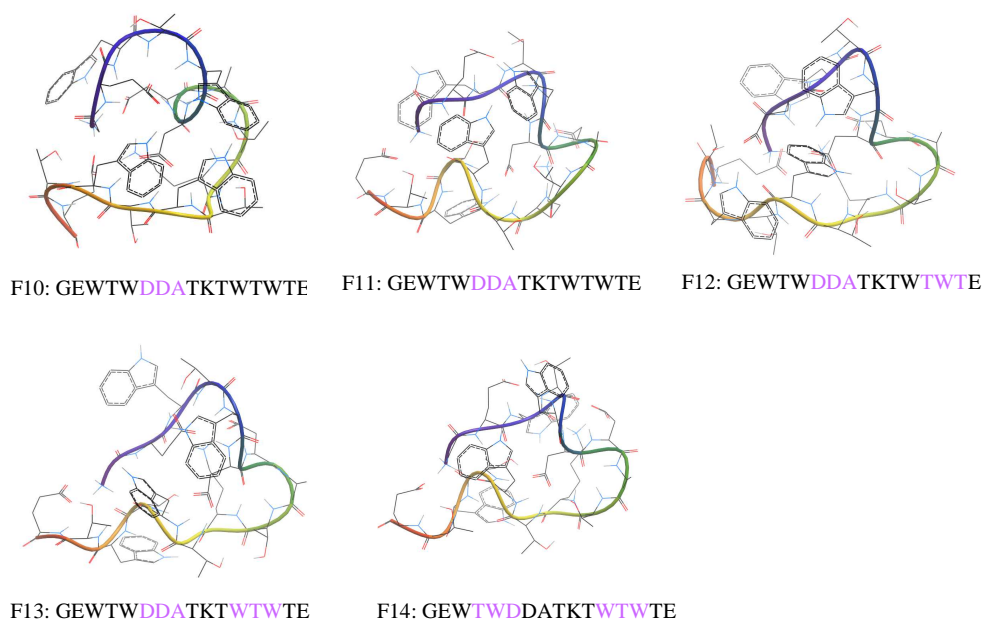


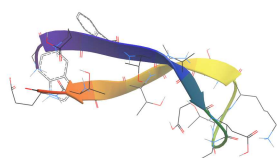
Figure 39 : Les conformations repliées du TZ4²⁺ en forme zwitterionique avec la séquence en lettres, les parties 3_{10} sont représentées en violet.

Tableau 6: Sections efficaces de diffusion Ω (\AA^2) et énergies (kcal/mol) des groupes en zipper et repliés, calculées au niveau AMBER et AM1 pour [TZ4mod]²⁺. La valeur de section efficace de diffusion expérimentale est 322 \AA^2 .

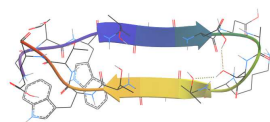
Conformation	d(\AA)	Ω (\AA^2)		Energie		
		AMBER	AM1	Amber	AM1	
Repliée						
F1	6.2	326	363	8	7	8
F2	4.2	332	358	5	3	6
F3	6.4	326	357	11	10	9
F4	4.9	339	366	18	10	2
F5	2.9	341	360	14	12	12
F6	2.9	343	379	3	0	4
F7	2.9	344	372	17	5	0
F8	6.9	356	382	13	10	9
F9	6.6	357	378	15	7	8
Zipper						
Z1	2.8	362	389	54	31	34
Z2	2.8	375	383	50	30	33

Tableau 7: Sections efficaces de diffusion Ω (\AA^2) et énergies (kcal/mol) des groupes en zipper et repliés, calculées au niveau AMBER et AM1 pour [TZ4mod]²⁺ en forme zwitterion. La valeur de section efficace de diffusion expérimentale est 322 \AA^2 .

Conformation	d(\AA)	Ω (\AA^2)		Energie		
		AMBER	AM1	AMBER	AM1	
Repliée						
F10	8.4	337	350	0	0	21
F11	7.5	332	357	8	7	0
F12	7.3	334	369	34	16	1
F13	8.0	346	376	16	14	6
F14	7.9	349	375	21	10	10
F15	7.3	349	378	19	15	3



Z1: GEWTADDATKTATWTE



Z2: GEWTADDDATKTATWTE

Figure 40: Les conformations en zipper du [TZ4mod]²⁺ avec la séquence en lettres. Les parties feuillet β sont représentées par les lettres bleues surlignées.

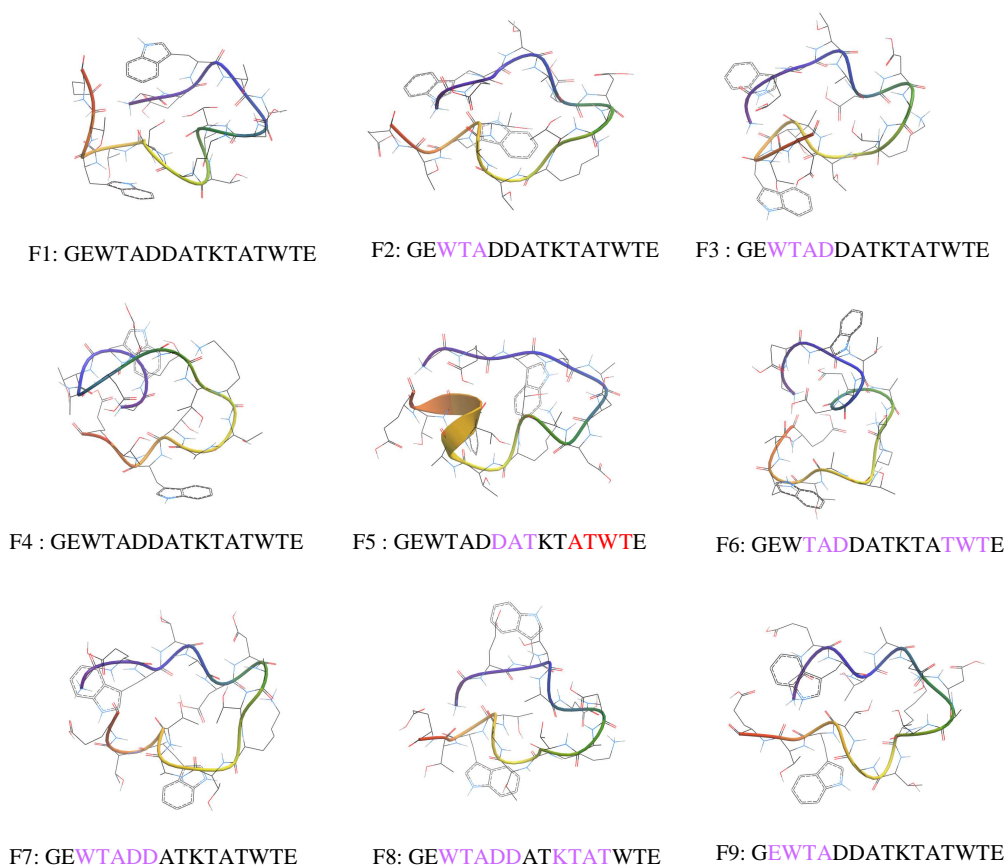


Figure 41: Les conformations repliées du [TZ4mod]²⁺ avec la séquence en lettres. Les parties en hélice α sont représentées en lettres rouges, les hélices 3_{10} en violet.

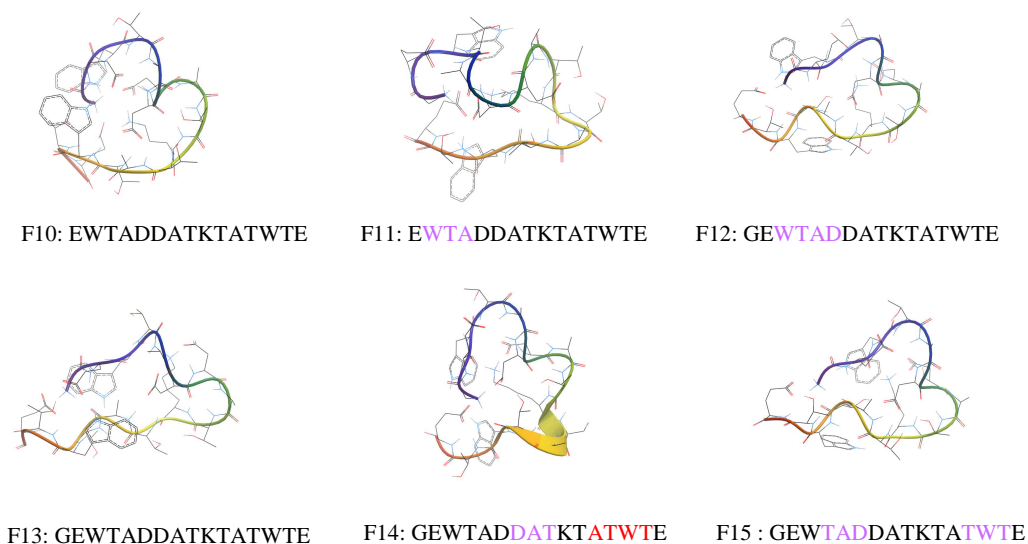


Figure 42: Les conformations repliées du [TZ4mod]²⁺ zwitterionique avec la séquence en lettres. Les parties en hélice α sont représentées en lettres rouges, les hélices 3_{10} en violet.

Toutes les conformations trouvées pour TZ4 et TZ4mod peuvent être classées en deux grands groupes, repliés et en zipper. Il n'y a pas de structures étendues comme trouvées dans l'étude des amyloïdes A β ₁₂₋₂₈ et TZ1. Pour les dynamiques REMD des formes zwitterioniques, aucune structure en zipper n'a été trouvée (tableaux 5 et 7). Les structures en zipper sont nettement plus hautes en énergie que les structures compactes, comme observé pour TZ1. Elles sont caractérisées par une distance d courte inférieure à 3 Å. Pour les structures repliées, la distance d est comprise entre 3 et 8 Å, ce qui n'est pas très discriminant par rapport aux structures en zipper.

D'une manière générale, peu de familles ont une section efficace compatible avec la mesure expérimentale, la plupart des conformations trouvées ayant une section efficace trop grande. On peut remarquer qu'un plus grand nombre de structures compactes sont générées à partir de la forme zwitterionique. Les conformations en zipper ont en moyenne une section efficace de diffusion plus grande que les structures repliées et incompatible avec les mesures expérimentales pour TZ4 (354 Å²) et TZ4mod (322 Å²). La valeur moyenne des structures en zipper de TZ4 est 386 Å² et celle des structures repliées est 365 Å². Pour TZ4mod, ces valeurs moyennes diminuent et sont de 367 Å² et 340 Å². Comme attendu, la substitution de deux tryptophanes par des alanines dans TZ4mod se traduit par des sections efficaces de diffusion plus petites.

De plus, comme nous l'avons remarqué pour les autres peptides, l'optimisation en AM1 engendre des structures moins compactes avec une augmentation de la section efficace de diffusion alors que la structure globale du peptide est la même. Aucune conformation optimisée en AM1 ne permet d'approcher la valeur de mobilité ionique expérimentale. Il est important d'observer ici que l'augmentation moyenne de la valeur de section efficace en passant d'une structure optimisée en AMBER à AM1 est différente pour les conformères en zipper (6%) et replié (10%). Nous allons uniquement discuter des valeurs calculées au niveau AMBER.

Nous ne pouvons pas exclure le fait de ne pas avoir exploré une partie importante de la surface d'énergie potentielle lors des dynamiques REMD. Dans une étude récente, F. Calvo et F. Chirot (ILM, Lyon) ont montré l'intérêt d'effectuer des dynamiques moléculaires biaisées en rajoutant un potentiel fictif afin de concentrer l'exploration de la surface PES dans les régions où les structures ont un rayon de giration compatible avec la mesure de section

efficace de diffusion.^{28,29} De nouvelles conformations sont trouvées, et servent de point de départ pour des dynamiques moléculaires non-biaisées qui permettent de mieux reproduire les profils de temps de diffusion des ions dans l'expérience de mobilité ionique.

Pour TZ4, les sections efficaces des structures repliées générées par les différentes dynamiques moléculaires sont comparables. Les groupes de F1-F3 et F10-F12 donnent des valeurs de sections efficaces comprises entre 355 Å² et 361 Å², ce qui est compatibles avec la valeur expérimentale (354 Å²). Les groupes F6-F9 et F13-F14 peuvent être a priori exclus de l'analyse car leur section efficace moyenne est de 374 Å². Pour TZ4mod, seuls les conformères F1-F3 et F11-F12 ont une section efficace de diffusion proche de la valeur expérimentale (322 Å²), comprise entre 326 Å² et 334 Å².

5.2 Interprétation du spectre ECD

Pour interpréter le spectre de fragmentation ECD, on cherche une corrélation entre la distribution de fragmentation *c/z* avec l'inverse des distances entre chaque site de protonation et les oxygènes des carbonyles des liaisons peptidiques. Dans tous les cas, il existe des interactions fortes entre les groupements protonés et les carbonyles avec des distances proton-oxygène NH+...O comprises entre 1.8 et 3 Å, ce qui correspond à des distances inverses N+...O de 0.25 à 0.4 Å⁻¹. Les histogrammes des inverses des distances N⁺-O pour les structures des tableaux 4-7 sont illustrés sur la Figure 43 et la Figure 44 pour TZ4 et la Figure 46 et la Figure 47 pour TZ4mod.

Les distributions des fragments *c/z* présentées sur la Figure 34 pour TZ4 et TZ4mod présentent des maxima aux positions 3 et 6, avec la détection de fragments *z*, et aux positions 12 et 15, avec la détection de fragments *c*. On peut donc en conclure que les sites d'interactions privilégiés des groupements ammonium sont sur les carbonyles des résidus W³, D⁶, A¹² et T¹⁵. Pour TZ4, aucun fragment n'a été détecté aux positions 7-9, et seuls les fragments *z*₆ et *z*₉ sont observés par post excitation ECD. Pour TZ4mod, la fragmentation au niveau des résidus 7-9 est très faible et ce sont les seuls ions détectés par post-excitation, ce qui indique que des complexes métastables entre les fragments ioniques *z*₇₋₉ et les fragments neutres associés se forment lors de la rupture de la liaison N-C_α. Ce type de processus peut être imaginé pour des structures repliées ou en zipper dans lesquelles les acides aminés en N

et C terminal interagissent entre eux en formant un réseau de liaison hydrogène capable de maintenir un complexe métastable après rupture d'une liaison N-C $_{\alpha}$ au milieu de la séquence peptidique.

Les fragments c₁₀₋₁₅ correspondent à des ions dont la charge est du côté N terminal. Comme les deux sites de protonation sont en position 1 et 10, une capture électronique sur l'un ou l'autre des groupements ammonium, engagés par liaison hydrogène avec les carbonyles des résidus entre les positions 10 et 15, engendrera des fragments de type c. Par contre, pour les fragments z₁₋₆ détectés, la charge est localisée sur la partie C terminal, la capture électronique devrait donc avoir lieu sur le N terminal. Néanmoins, après capture électronique sur la lysine en K¹⁰ et transfert d'hydrogène sur un carbonyle, il peut y avoir un transfert de proton entre le site de plus faible affinité protonique (NH₂ terminal) vers le groupement amine NH₂ de la lysine lors de la dissociation du peptide pour donner finalement les fragments z₁₋₆.

TZ4

Les structures en zipper présentent sensiblement les mêmes interactions des groupements protonés sur les carbonyles le long de la chaîne peptidique. Pour le N terminal, on constate une interaction privilégiée aux deux bouts du peptide en position 1, 2 et 15. La lysine K¹⁰ interagit principalement avec les carbonyles des résidus D⁶ et D⁷. Il n'y a donc pas de corrélation avec la distribution des fragments ECD qui permettent de retrouver les fragments intenses z₃, z₆ et c₁₂. Dans ce type de structure, il existe plusieurs liaisons hydrogènes entre les carbonyles CO et les amides NH des deux brins du feuillet β . Par exemple, pour Z1, on dénombre 5 liaisons hydrogènes inter brin NH²...CO¹⁵, CO²...NH¹⁵, NH⁴...CO¹³, CO⁴...NH¹³, NH⁶...CO¹¹, CO⁶...NH¹¹, NH³⁺...CO¹⁵, capables d'empêcher la dissociation du peptide au niveau des résidus D⁶ et D⁷. Expérimentalement, l'excitation IR post-ECD a en effet mis en évidence la détection de fragments z₆ et z₉, le premier pourrait être corrélé à une structure en zipper. Les structures en zipper Z1 et Z2 ne peuvent donc pas être exclues de l'analyse, mais comme ces structures ont une section efficace de diffusion nettement plus grande que la valeur expérimentale, elles ne peuvent pas être peuplées majoritairement.

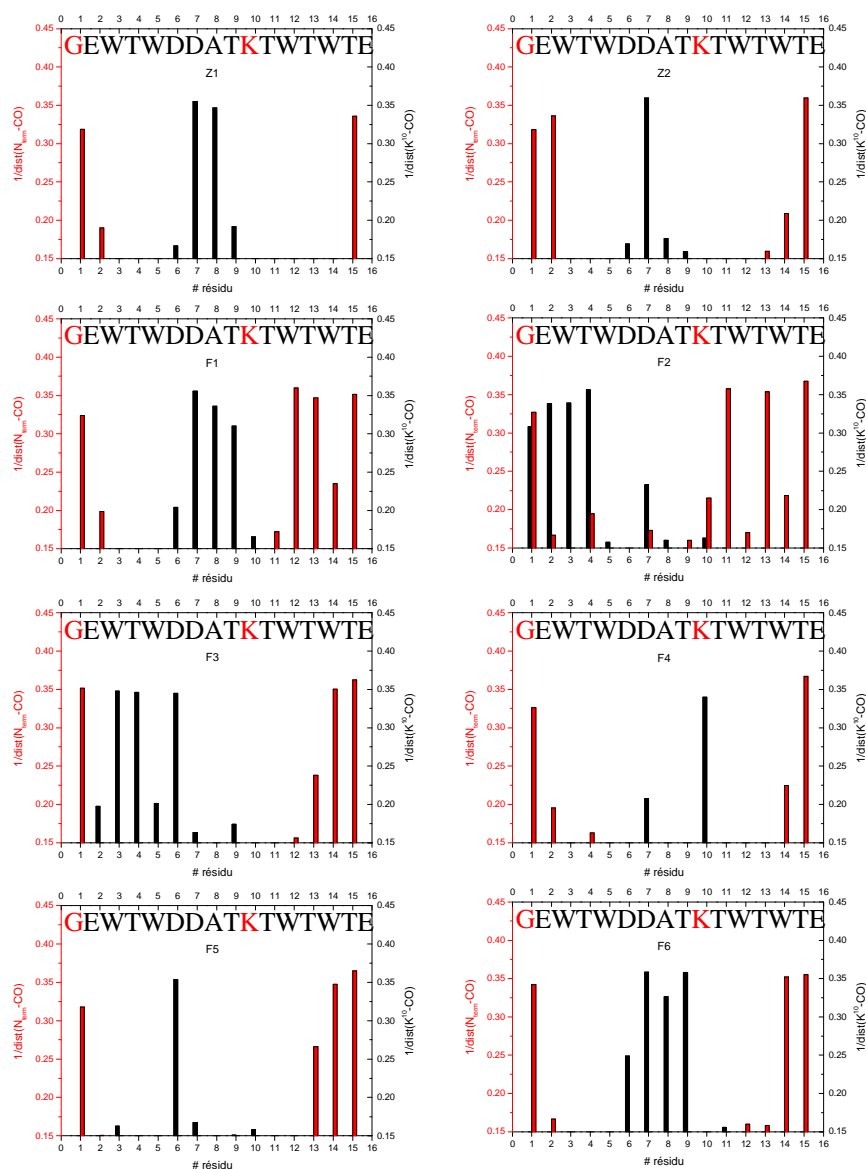


Figure 43 : Inverse des distances entre NH_3^+ (N-terminal, K¹⁰) et les CO carbonyles pour les groupes en zipper Z1-Z2 et repliés F1-F6 de TZA²⁺.

Pour les structures repliées, on constate aussi que le groupement protoné en N terminal n'interagit pas avec les carbonyles en milieu de la séquence peptidique, mais principalement en position 1 et à l'autre extrémité du peptide autour des résidus 11-15. La lysine K¹⁰ n'a pas d'interaction avec les carbonyles des résidus en C terminal. Seules les structures F1 et F6 présentent des interactions sur les carbonyles des résidus 6-8, toutes les autres structures ont des interactions majoritairement avec le carbonyle du résidu D⁶, puis ceux des résidus G¹-T⁴, ce qui est compatible avec la distribution d'intensité (PIA) des ions c/z observée.

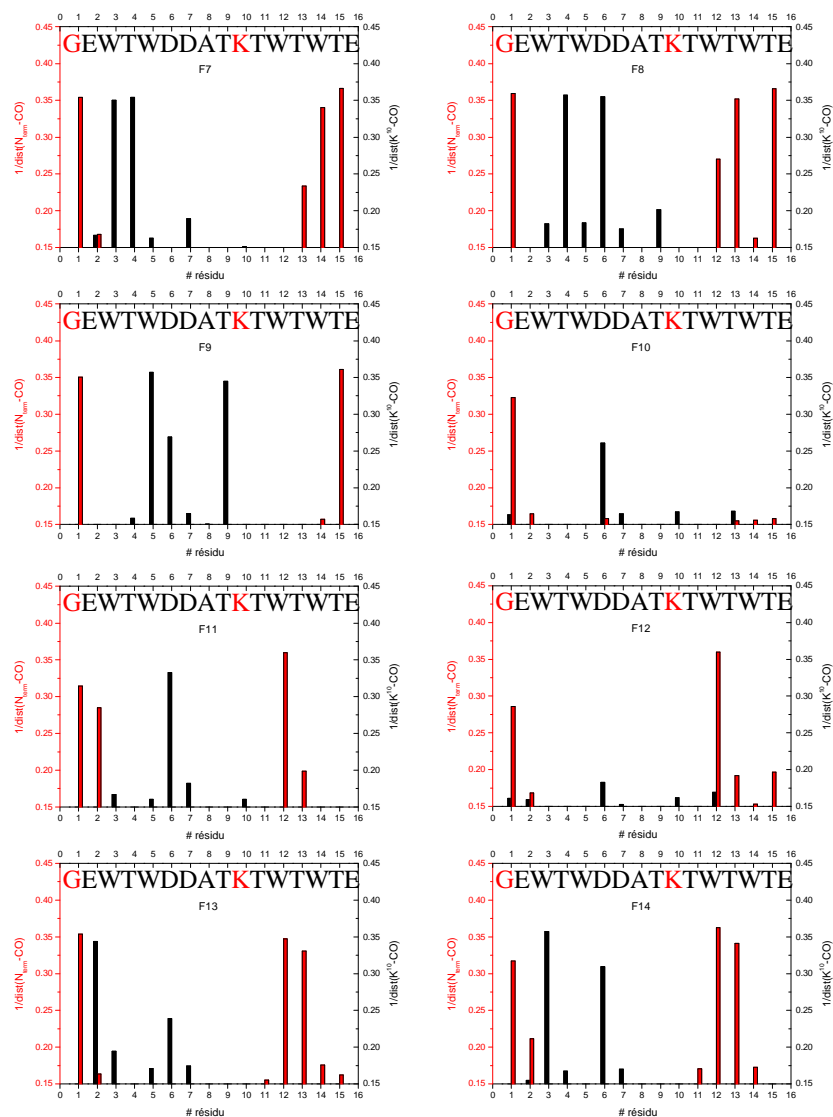


Figure 44 : Inverse des distances entre NH_3^+ ($\text{N}_{\text{terminal}}$, K^{10}) et les CO carbonyles pour les groupes repliés F7-F14 de TZ4^{2+} .

La structure F5 présente une seule interaction du groupement ammonium de la lysine K^{10} avec CO^6 . En regardant précisément la structure de F5, le proton de la lysine K^{10} interagit non seulement avec CO^6 (2.98 Å) mais aussi avec le groupement acide $\text{O}=\text{C}-\text{OH}$ (2.81 Å) du résidu D^6 (Figure 45). Ce type d'interaction peut expliquer le fragment intense détecté à la masse $m/z \text{MH}_2^+ - 44$. Les groupes F1-F3 permettent de retrouver une bonne corrélation avec la distribution d'intensité (PIA) des fragments ECD et ont également une section efficace de diffusion proche de la valeur expérimentale. On constate néanmoins qu'aucune des structures trouvées ne permet de prédire le fragment intense c_{12} .

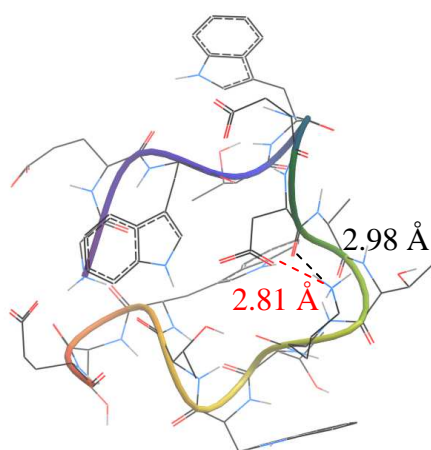


Figure 45: La structure F5 du TZ4^{2+} avec l'interaction du groupement ammonium K10 avec le carbonyle CO^6 (en trait rouge, 2.81 Å) et le groupement acide carboxylique COOH du D^6 (en trait noir, 2.98 Å).

Les histogrammes des structures de $[\text{TZ4}]^{2+}$ en forme zwitterion sont donnés sur la Figure 44. Toutes les structures donnent une interaction plus ou moins forte entre le groupement ammonium de la lysine K^{10} et CO^6 . Pour les conformères F11-F14, il existe une interaction du groupement protoné en N terminal avec le carbonyle CO de W^{12} , ce qui permet de prédire le fragment intense c_{12} . Toutes ces conformations sont donc compatibles avec la distribution des ions c/z observée, mais seules les structures F10, F11 et F12 ont une section efficace de diffusion proche de la valeur expérimentale.

En conclusion, 6 structures repliées F1-F3, F10-F12 sont à la fois compatibles avec la mesure de mobilité ionique et le spectre de fragmentation ECD. Nous verrons que l'analyse de leurs spectres vibrationnels permet d'affiner l'attribution.

TZ4mod

Le spectre ECD expérimental de $[\text{TZ4mod}]^{2+}$ (figure 34) présente des maxima à z_3 , z_6 et c_{12} , c_{15} et peu de fragmentation aux positions 7-10. Les histogrammes de l'inverse des distances entre les sites de protonation (N terminal et K^{10}) avec les CO carbonyles le long de la séquence peptidique sont présentés sur les Figure 46 et 47.

Pour les deux structures en zipper, l'histogramme des distances est similaire, avec des interactions fortes entre le groupement protoné en N terminal et les CO¹, CO² et CO¹⁵. Il existe une interaction forte entre le groupement ammonium de la lysine K¹⁰ avec le carbonyle CO⁷. Par contre, expérimentalement, on détecte une faible fragmentation à cette position, z₇. Comme pour TZ4, on ne retrouve pas pour ces structures les fragments principaux observés en ECD. De plus, ces conformères ont une section efficace de diffusion plus grande que la valeur expérimentale, ils ne sont donc pas présents expérimentalement.

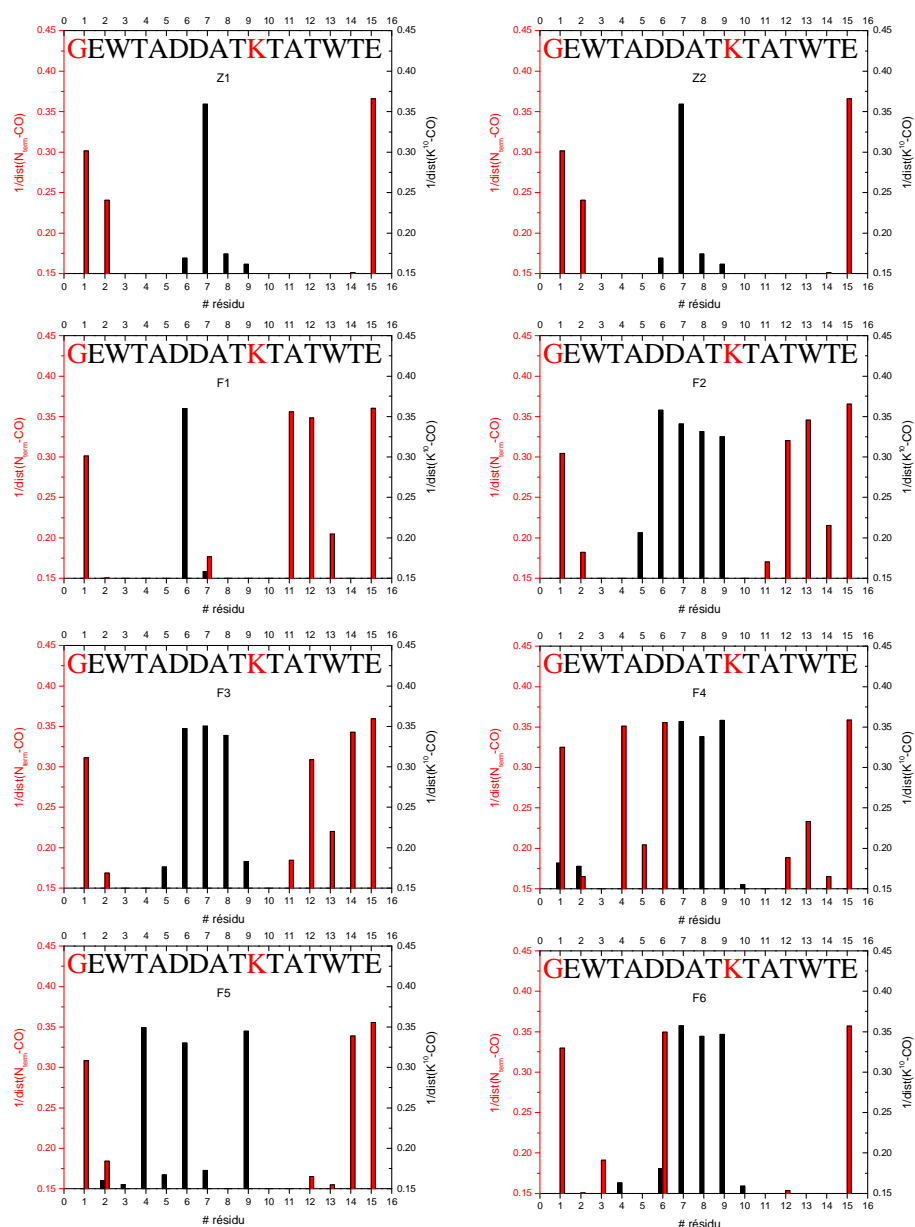


Figure 46 : Inverse des distances entre NH₃⁺ (N_{terminal}, K¹⁰) et les CO carbonyles pour les groupes en zipper Z1-Z2 et repliés F1-F6 de TZ4mod²⁺.

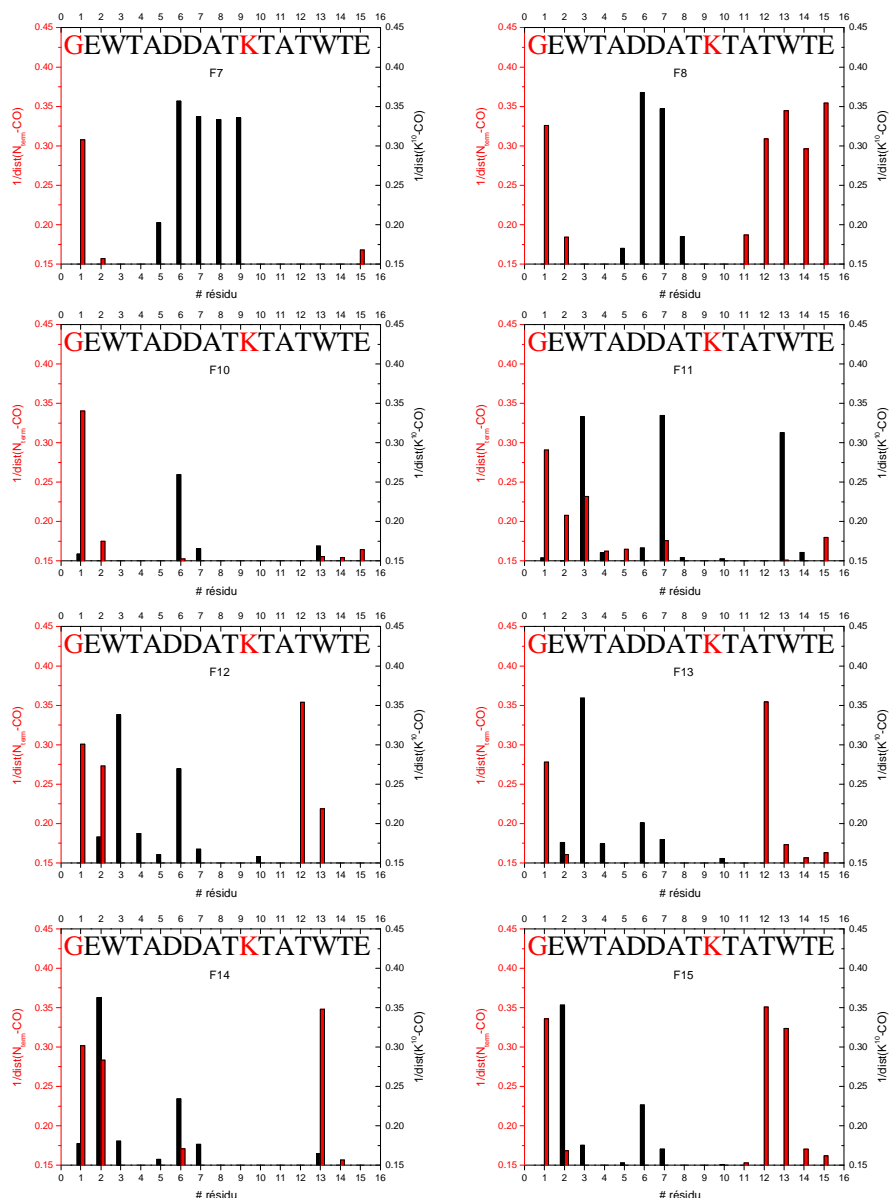


Figure 47 : Inverse des distances entre NH_3^+ ($\text{N}_{\text{terminal}}$, K^{10}) et les CO carbonyles pour les groupes repliés F7-F15 de TZ4mod^{2+} .

Pour les conformères repliés F1-F9, le groupement protoné en N terminal interagit principalement avec les carbonyles des deux premiers acides aminés G^1 et E^2 et ceux de l'autre extrémité en C terminal, principalement sur l'acide aminé T^{15} . Pour les deux structures F4 et F6, le groupement protoné en N terminal interagit en plus avec des carbonyles en milieu de chaîne, en position 4 et 6 (F4) et 6 (F6). A l'inverse, pour toutes les formes repliées, le groupement ammonium de la lysine K^{10} interagit exclusivement avec les carbonyles en milieu de chaîne peptidique. Pour les structures F2-F4 et F6-F8, on note des interactions sur les CO^{7-}

⁹, alors que l'intensité des fragments z_{7-9} est très faible. On peut rappeler que ce sont néanmoins ces trois fragments qui sont détectés par post-excitation ECD. Le groupe F5 donne des interactions fortes entre le groupement ammonium de la lysine K^{10} avec les carbonyles $CO^{4,6}$ et le carbonyle CO^9 . La structure de F5 possède une liaison hydrogène forte entre NH^2 et CO^{14} , en plus de l'interaction électrostatique du NH_3^+ avec les deux dernières liaisons peptidiques du C terminal, qui pourraient empêcher la dissociation des fragments suite à la capture électronique sur l'ammonium de la lysine.

Les structures F1-F3 sont les seules à avoir une section efficace de diffusion proche de la valeur expérimentale et présentent des interactions sur les liaisons peptidiques des acides aminés $A^{11}-W^{14}$, qui sont compatibles avec les fragments c_{11-15} observés. Le résidu de la lysine K^{10} interagit avec le carbonyle CO^6 pour F1, en accord avec le fragment intense z_6 . La structure F2 présente trois interactions fortes entre K^{10} et les carbonyles CO^{7-9} . Dans ce cas, les liaisons hydrogènes fortes entre $CO^5...NH^9$ (2.0 Å) et $NH^2...CO^{12}$ (1.9Å) pourraient maintenir un complexe métastable non dissocié, en accord avec les résultats de l'expérience de post-excitation ECD. On remarque cependant qu'aucun conformère replié ne permet de prédire le fragment intense z_3 .

Les histogrammes des structures de TZ4mod (F10-F15) trouvées après la dynamique REMD de la forme zwitterionique du peptide sont donnés sur la Figure 47. Aucune ne présente d'interaction du NH_3^+ terminal avec le carbonyle CO^{15} mais on note maintenant que, pour les structures F11-F13, il existe une interaction de K^{10} sur le carbonyle CO^3 . Pour toutes ces structures, les groupements protonés solvatent principalement les carbonyles des liaisons peptidiques aux deux bouts de la chaîne. Les groupes F12 et F13 donnent les meilleures corrélations qui permettent de prédire les fragments intenses $z_{3,6}$ et c_{12} et aucune interaction du groupement protoné avec les CO^{7-9} , en accord avec le faible taux de fragmentation en milieu de chaîne peptidique.

En conclusion, la plupart des conformères repliés peuvent être compatibles avec la distribution de fragments c/z observés soit par ECD, soit par post-excitation ECD, mais seuls les structures F1-F3 et F10-F12 ont une section efficace de diffusion calculée compatible avec l'expérience de mobilité.

5.3 Interprétation du spectre IRMPD

Les simulations des spectres vibrationnels de TZ4 et TZ4mod doublement protonés sont effectués par la méthode hybride ONIOM DFT/B3LYP/6-31G* : AM1 implémentée dans Gaussian 09. Nous avons adopté la même répartition des atomes en couches haute et basse que pour TZ1. Les résidus des alanines (CH₃) et des tryptophanes (indole) sont inclus dans la couche basse traitée en AM1, tous les autres atomes étant inclus dans la couche haute (DFT/B3LYP). Les fréquences harmoniques sont corrigées par un facteur d'échelle global (0.962). Les spectres simulés sont présentés après convolution par une fonction gaussienne de largeur 25 cm⁻¹.

5.3.1 TZ4

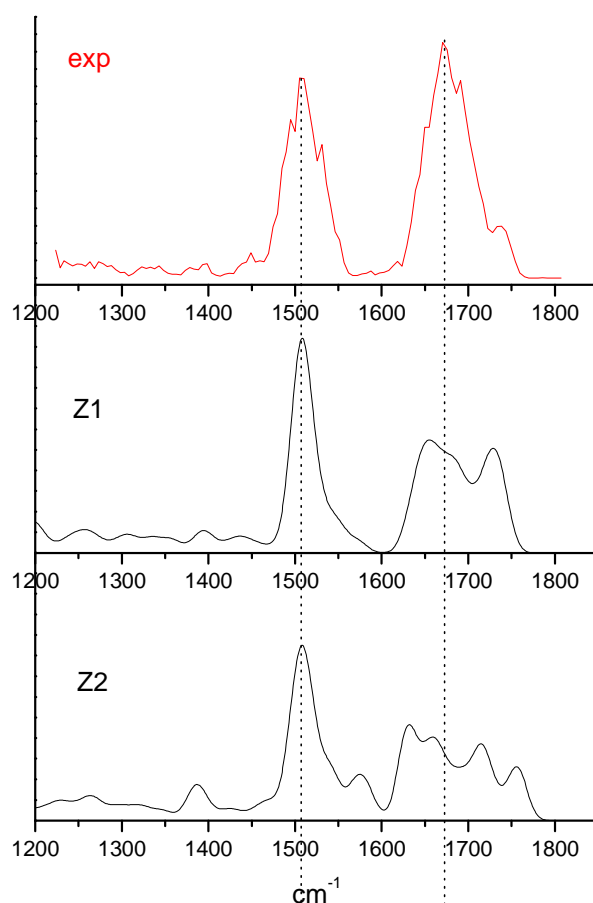


Figure 48: Simulations des spectres IR des conformations en zipper Z1, Z2 et comparaison avec le spectre expérimental de TZ4²⁺

Les spectres des deux structures en zipper sont reportés sur la Figure 48. La bande amide I est très large avec des épaulements dans le rouge et le bleu de la transition expérimentale. Ceci est relié respectivement à la présence de groupements carbonyle CO fortement engagés par liaison hydrogène avec les amides NH et libre, typique des structures en feuillet β . Le mauvais accord entre ces simulations et le spectre expérimental confirme que ce type de structure n'est pas présent expérimentalement.

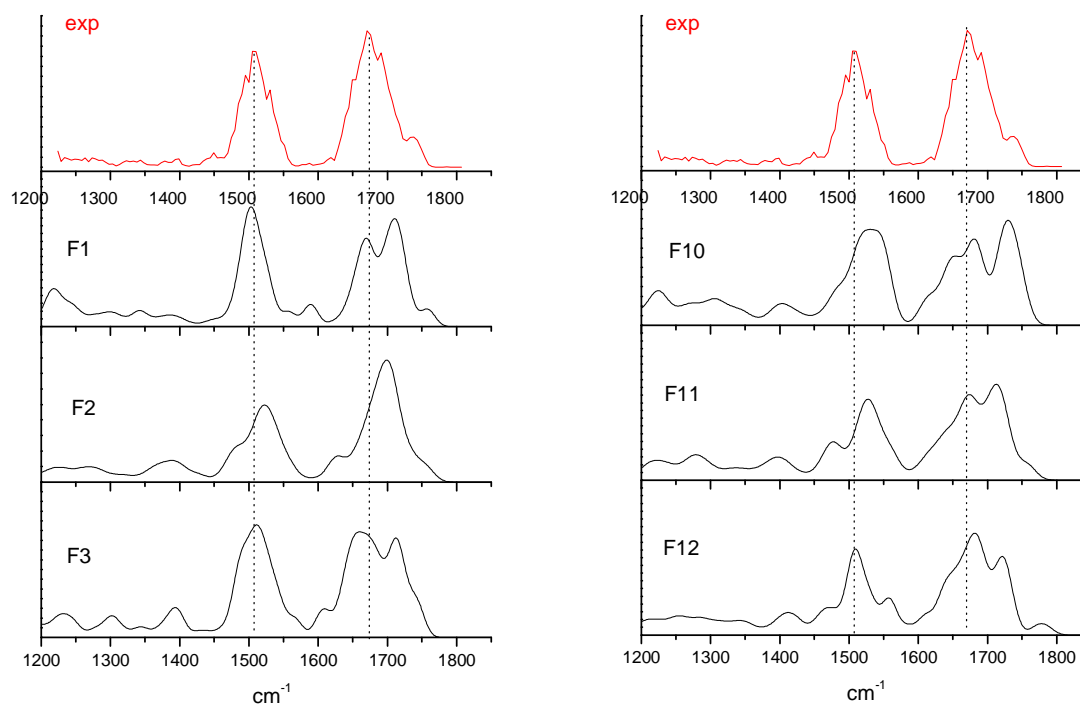


Figure 49: Simulations des spectres IR des conformations repliées F1-F3 et F10-F12 et comparaison avec le spectre IRMPD expérimental de $TZ4^{2+}$

Les simulations IR des structures repliées F1-F3 et F10-F12, sélectionnés après l'analyse des sections efficaces de diffusion et des spectres de fragmentation ECD, sont reportées sur la Figure 49. Aucune conformation ne permet à elle seule de reproduire parfaitement le spectre IRMPD. En moyenne, la bande amide I est moins bien simulée que la bande amide II. Expérimentalement, la bande I est composée d'une transition intense centrée à 1670 cm^{-1} avec une bande secondaire, d'intensité plus faible, centrée à 1740 cm^{-1} . On retrouve dans les simulations cette structure de bande mais, généralement, l'intensité calculée associée à la transition dans le bleu est plus intense que celle observée expérimentalement. Cette transition correspond aux modes carbonyles des acides carboxyliques $E^{2,16}$ et $D^{6,7}$. Nous avons déjà constaté sur l'étude de la vancomycine protonée que l'intensité IRMPD associée à

ces modes très peu couplés est généralement beaucoup plus faible que celle observée sur les modes carbonyles des liaisons peptidiques.³⁰ Comme nous l'avons expliqué pour TZ1, nous sommes obligés de diminuer l'intensité du laser CLIO dans cette région spectrale afin d'éviter la saturation de la bande amide I.

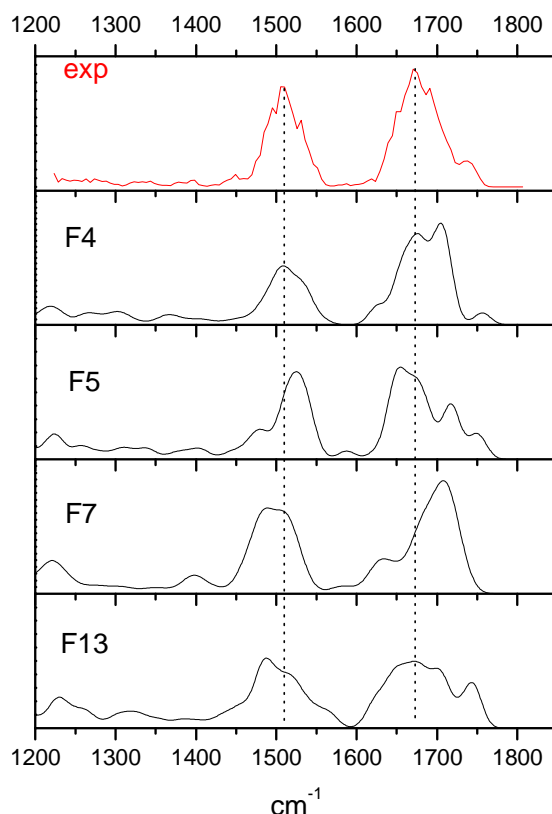


Figure 50: Simulations des spectres IR des conformations repliées F4, F5, F7, F13 et comparaison avec le spectre IRMPD expérimental de TZ4²⁺.

Les spectres IR simulés des autres structures repliées F4, F5, F7 et F13, qui ne donnent pas un bon accord avec les résultats de mobilité et d'ECD, sont reportés sur la Figure 50. Là aussi, aucun des conformères ne reproduit de manière satisfaisante le spectre IRMPD. Le conformère F13 présente un décalage vers le rouge de la bande amide II. Pour la structure F7, on constate que la bande amide II est trop décalée dans le rouge et la bande amide I est décalée vers le bleu. Ceci est relié respectivement aux modes amides NH et carbonyles CO des liaisons peptidiques non engagés par liaison hydrogène et qui sont présents en grand nombre dans cette structure. La bande de faible intensité simulée autour de 1650 cm⁻¹ n'est pas vue expérimentalement et correspond au mode de pliage asymétrique des groupements NH₃⁺ en interaction avec les CO carbonyles. Pour le conformère F5, on constate un décalage

opposé pour les bandes amide I et amide II, ce qui indique que, dans cette structure, des liaisons hydrogènes fortes existent qui ne doivent pas être présentes sur les molécules sondées. La structure du groupe F5 est effectivement caractérisée par les liaisons hydrogène entre $\text{CO}^4 \dots \text{NH}^7$, $\text{CO}^7 \dots \text{NH}^{10}$, $\text{CO}^{10} \dots \text{NH}^{13}$, $\text{CO}^{12} \dots \text{NH}^{15, 16}$.

5.3.2 TZ4mod

Les spectres IR simulés des conformations F1-F3 et F10-F12, sélectionnées après l'analyse des sections efficaces de diffusion et de fragmentation ECD, sont reportés sur la Figure 51. En moyenne, les maxima des bandes amide I et amide II sont dans la largeur expérimental du spectre IRPMD, mais aucun conformère simule correctement le spectre expérimental. Pour ces structures, la bande de faible intensité à 1740 cm^{-1} est partiellement reproduite, même si l'intensité calculée est trop grande, comme déjà observé pour TZ4^{2+} .

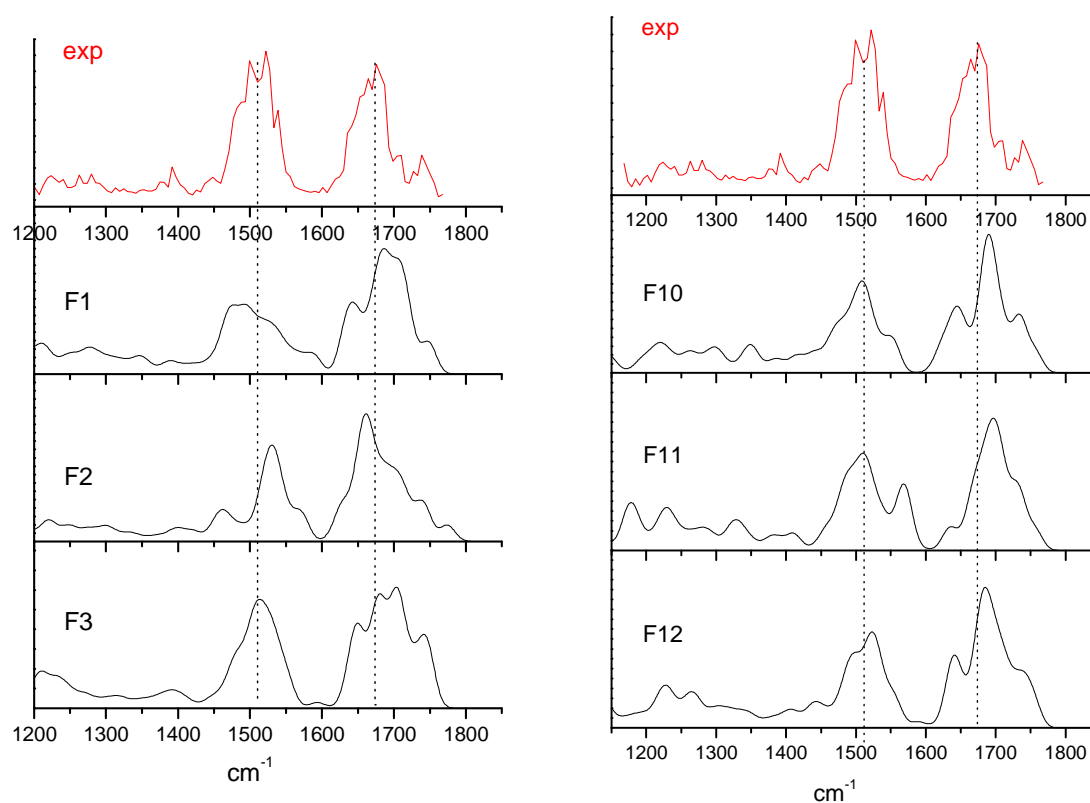


Figure 51: Simulations des spectres IR des conformations repliées F1-F3 et F10-F12 et comparaison avec le spectre IRPMD expérimental de TZ4mod^{2+}

Les spectres IR simulés des conformations Z1, Z2 et F6, F13 ayant une section efficace de diffusion trop grande par rapport à la valeur expérimentale (322 \AA^2) sont reportés sur la Figure 52. Effectivement, ils simulent mal le spectre expérimental. La bande amide I des conformations en zipper (Z1, Z2) et la conformation repliée F13 est mal simulée avec des épaulements trop décalés vers rouge et bleu. La bande amide II du groupe F6 présente un épaulement à 1550 cm^{-1} n'est pas observé expérimentalement.

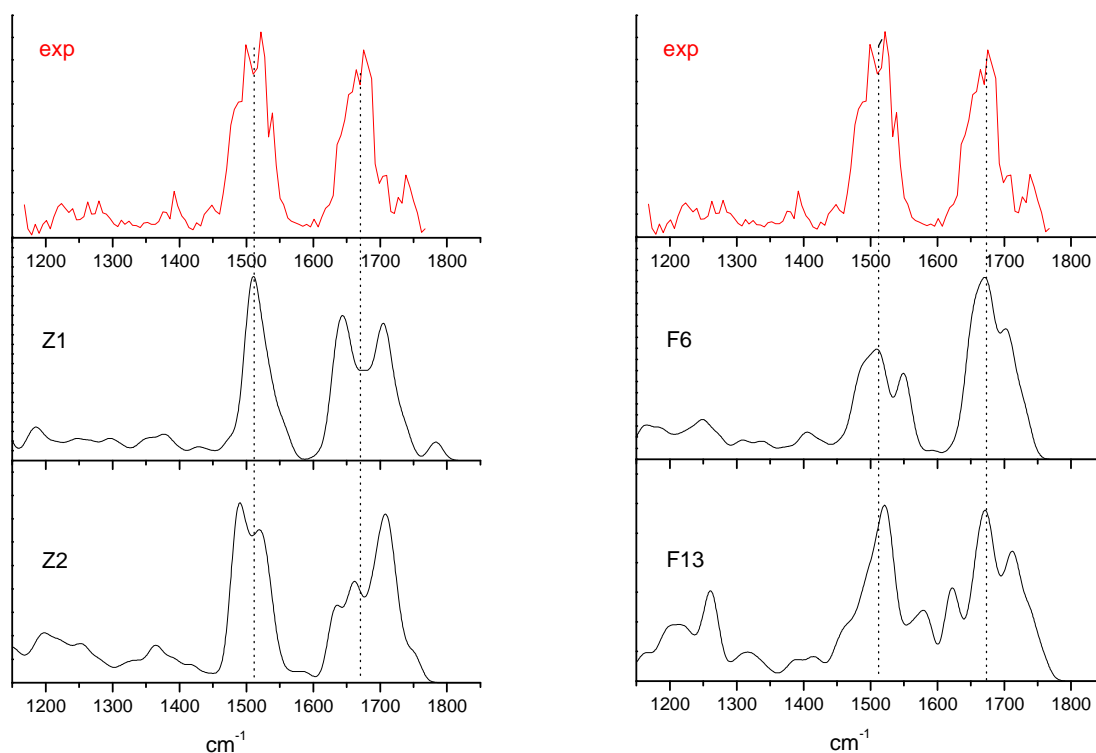


Figure 52: Simulations des spectres IR des conformations repliées Z1, Z2 et F6, F13 et comparaison avec le spectre IRMPD expérimental de $[\text{TZ4mod}]^{2+}$

6. Conclusion

La combinaison des études de mobilité ionique, de spectroscopie IRMPD et de fragmentation ECD nous permet de déduire les structures les plus probables adoptées par TZ4 et TZ4mod doublement protoné. Pour la séquence TZ4^{2+} , ce sont les structures F2, F3 et F12, et pour TZ4mod, ce sont les conformères F1, F3 et F12. Les spectres IR simulés moyennés sur les trois conformères pour TZ4 et TZ4mod et la corrélation entre les inverses des distances entre les sites de protonation et les CO carbonyles avec la distribution d'intensité des fragments c/z sont présentés sur la figure 53 et la figure 54. Les spectres IRMPD sont bien reproduits et l'on retrouve bien la distribution globale des fragments c/z, avec notamment les

maxima aux positions 3, 6, 12 et 15, avec la faible probabilité de fragmentation au milieu de la séquence peptidique. La corrélation est sensiblement meilleure pour TZ4mod que pour TZ4, pour lequel le fragment intense c_{12} n'est pas spécifiquement reproduit. On peut noter aussi que l'on retrouve la seule différence notable sur la distribution des fragments c/z entre les deux séquences, avec une probabilité plus grande de détecter un fragment z_6 dans TZ4mod que dans TZ4. Pour TZ4, la section efficace moyenne des structures F2, F3 et F12 est de 359 \AA^2 , très proche de la valeur expérimentale (356 \AA^2). Pour TZ4mod, les trois conformères sélectionnés F1, F3 F12 ont une section efficace moyenne de 329 \AA^2 , en accord avec la mesure de mobilité ionique (322 \AA^2). On doit cependant noter que les optimisations en AM1 engendrent une augmentation de la section efficace de diffusion, sans changer de manière significative la structure secondaire adoptée par chaque conformère. La substitution de deux tryptophanes par des alanines n'induit pas de grand changement de structure. Les structures trouvées en phase gazeuse ne conservent pas la forme en zipper de la phase condensée, la structure est plutôt de type globulaire mais le coude de la partie centrale a été conservé dans certaines structures.

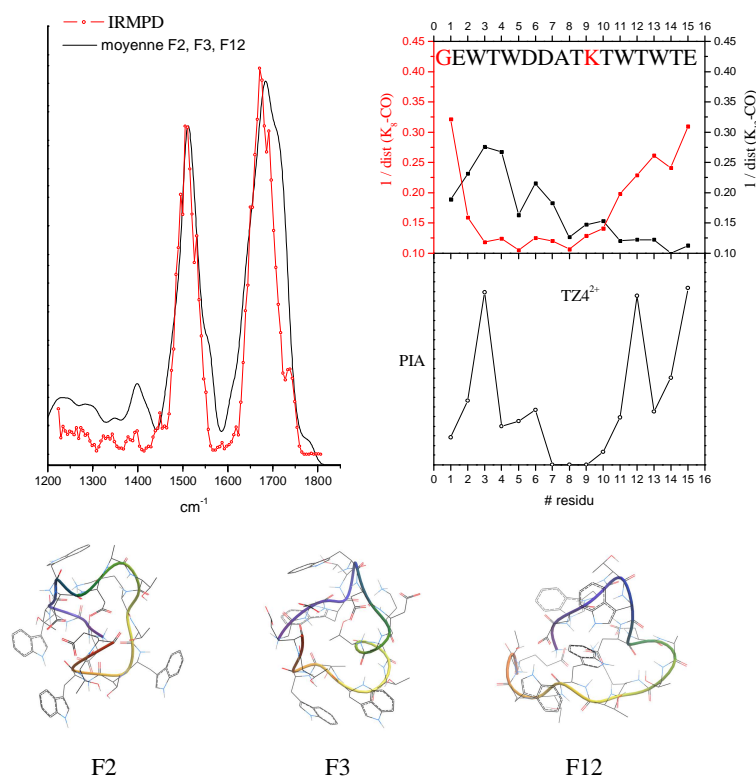


Figure 53: Comparaison entre la distribution des fragments c/z et les interactions des groupements protonés en N terminal et K^{10} avec les carbonyles des résidus le long de la chaîne peptidique et simulation du spectre IR des conformations F2, F3, F12 de $TZ4^{2+}$.

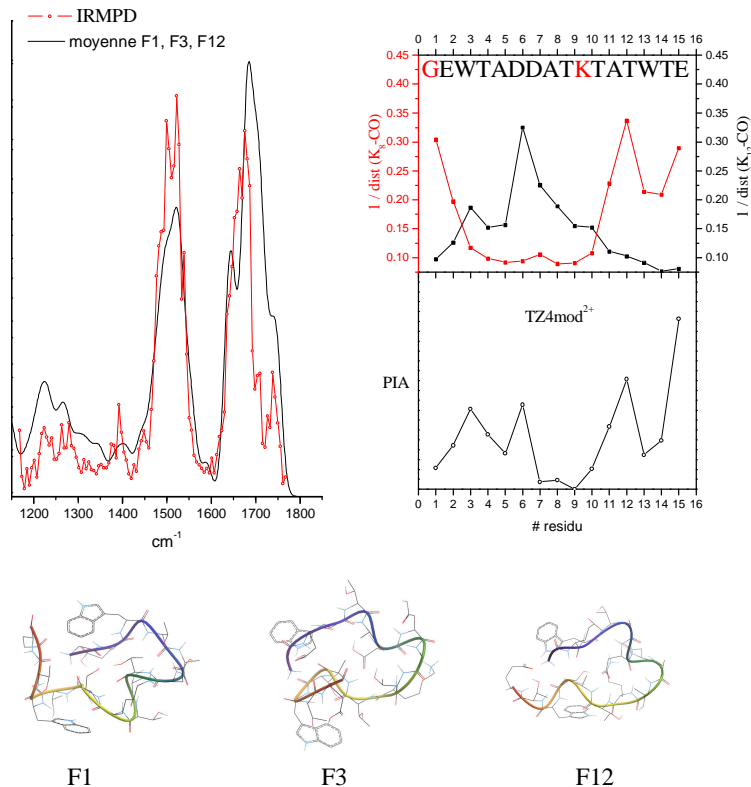


Figure 54: Comparaison entre la distribution des fragments c/z et les interactions des groupements protonés en N terminal et K^{10} avec les carbonyles des résidus le long de la chaîne peptidique et simulation du spectre IR des conformations F1, F3, F12 de $TZ4mod^{2+}$.

Nous avons reporté sur la Figure 55 et la Figure 56 les simulations des spectres IR et de la distribution des fragments c/z pour les conformères de TZ4 et TZ4mod qui avaient des sections efficaces de diffusion compatibles avec la valeur expérimentale. Pour TZ4, ce sont les conformères F1, F10 et F11 et, pour TZ4mod, les structures F2, F4, F10 et F11. Dans les deux cas, les spectres IR et ECD simulés donnent un mauvais accord avec les données expérimentales. On prédit pour ces structures une fragmentation ECD intense au milieu de la séquence peptidique, induite par des interactions du résidu protoné de la lysine K^{10} sur les carbonyles CO^{7-9} . Pour TZ4mod, les fragments z_{7-9} sont les seuls à être observés par post-excitation par le laser CO_2 . Comme le spectre IR simulé pour ces trois structures reste en accord avec le spectre IRMPD, on ne peut pas exclure que ces conformères soient présents expérimentalement, mais ne doivent pas correspondre aux espèces majoritaires. Pour TZ4, seuls les fragments z_6 et z_9 sont induits par la post excitation, ce qui peut être corrélé à la distribution des fragments simulés pour les conformères F1, F10 et F11. Par contre, le spectre IR simulé ne reproduit pas correctement le spectre expérimental, et l'on ne peut pas attribuer ces structures pour TZ4.

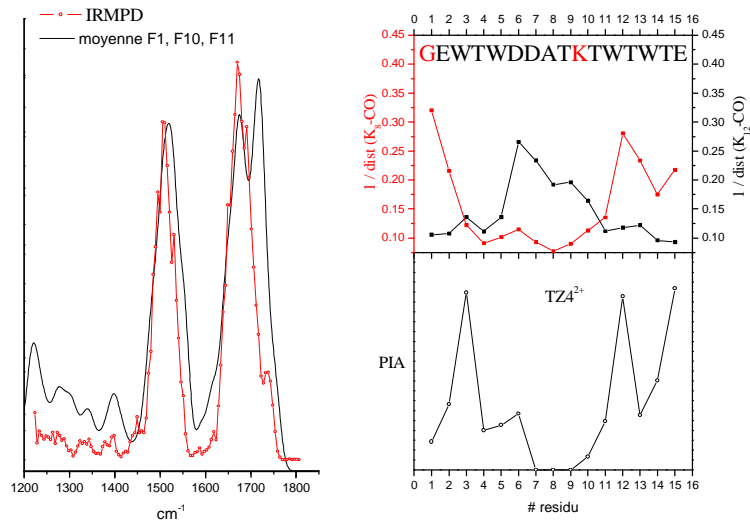


Figure 55: Comparaison entre la distribution des fragments c/z et les interactions des groupements protonés en N terminal et K^{10} avec les carbonyles des résidus le long de la chaîne peptidique et simulation du spectre IR des conformations F1, F10, F11 de $TZ4^{2+}$.

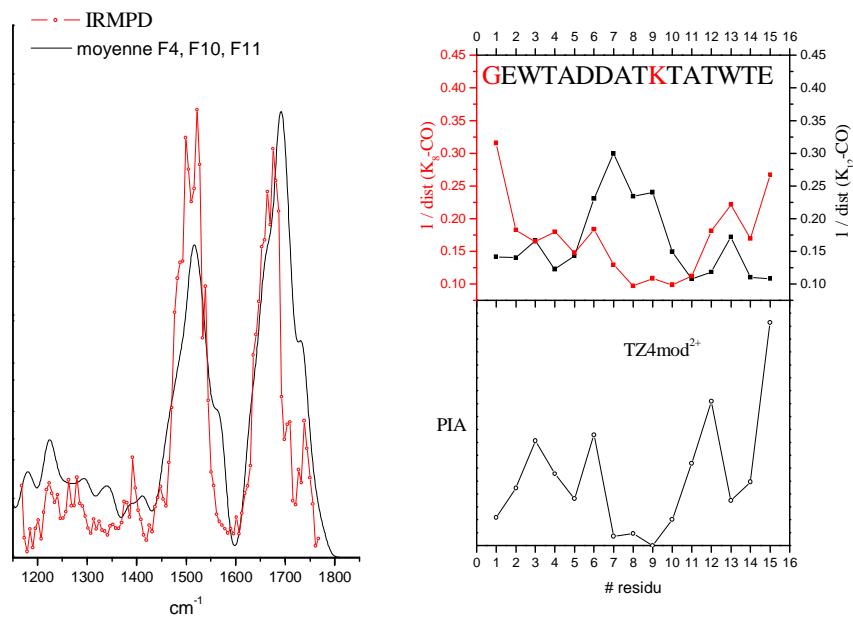


Figure 56: Comparaison entre la distribution des fragments c/z et les interactions des groupements protonés en N terminal et K^{10} avec les carbonyles des résidus le long de la chaîne peptidique et simulation du spectre IR des conformations F4, F10, F11 de $TZ4mod^{2+}$.

Références

1. Marqusee, S., Robbins, V. H. & Baldwin, R. L. Unusually Stable Helix Formation in Short Alanine-Based Peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 5286-5290 (1989).
2. Rossi, M. et al. Secondary Structure of Ac-Ala(n)-LysH(+) Polyalanine Peptides (n=5, 10, 15) in Vacuo: Helical or Not? *Journal of Physical Chemistry Letters* **1**, 3465-3470 (2010).
3. Stearns, J. A., Seaiby, C., Boyarkin, O. V. & Rizzo, T. R. Spectroscopy and conformational preferences of gas-phase helices. *Physical Chemistry Chemical Physics* **11**, 125-132 (2009).
4. Gronenborn, A. M. et al. A Novel, Highly Stable Fold of the Immunoglobulin Binding Domain of Streptococcal Protein-G. *Science* **253**, 657-661 (1991).
5. Blanco, F. J., Rivas, G. & Serrano, L. A Short Linear Peptide That Folds into a Native Stable Beta-Hairpin in Aqueous-Solution. *Nature Structural Biology* **1**, 584-590 (1994).
6. Munoz, V., Thompson, P. A., Hofrichter, J. & Eaton, W. A. Folding dynamics and mechanism of beta-hairpin formation. *Nature* **390**, 196-199 (1997).
7. Dyer, R. B. et al. The mechanism of beta-hairpin formation. *Biochemistry* **43**, 11560-11566 (2004).
8. Evans, D. A. & Wales, D. J. Folding of the GB1 hairpin peptide from discrete path sampling. *Journal of Chemical Physics* **121**, 1080-1090 (2004).
9. Munoz, V., Henry, E. R., Hofrichter, J. & Eaton, W. A. A statistical mechanical model for beta-hairpin kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 5872-5879 (1998).
10. Klimov, D. K. & Thirumalai, D. Mechanisms and kinetics of beta-hairpin formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 2544-2549 (2000).
11. Zhou, R. H., Berne, B. J. & Germain, R. The free energy landscape for beta hairpin folding in explicit water. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 14931-14936 (2001).
12. Pande, V. S. & Rokhsar, D. S. Molecular dynamics simulations of unfolding and refolding of a beta-hairpin fragment of protein G. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 9062-9067 (1999).
13. Cochran, A. G. et al. A minimal peptide scaffold for beta-turn display: Optimizing a strand position in disulfide-cyclized beta-hairpins. *Journal of the American Chemical Society* **123**, 625-632 (2001).
14. Cochran, A. G., Skelton, N. J. & Starovasnik, M. A. Tryptophan zippers: Stable, monomeric beta-hairpins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 5578-5583 (2001).
15. Vass, E., Hollosi, M., Besson, F. & Buchet, R. Vibrational spectroscopic detection of beta- and gamma-turns in synthetic and natural peptides and proteins. *Chemical Reviews* **103**, 1917-1954 (2003).
16. Du, D. G., Zhu, Y. J., Huang, C. Y. & Gai, F. Understanding the key factors that control the rate of beta-hairpin folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 15915-15920 (2004).
17. Hauser, K., Krejtschi, C., Huang, R., Wu, L. & Keiderling, T. A. Site-specific relaxation kinetics of a tryptophan zipper hairpin peptide using temperature-jump IR spectroscopy and isotopic labeling. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 2984-2992 (2008).

18. Takekiyo, T., Wu, L., Yoshimura, Y., Shimizu, A. & Keiderling, T. A. Relationship between Hydrophobic Interactions and Secondary Structure Stability for Trpzip beta-Hairpin Peptides. *Biochemistry* **48**, 1543-1552 (2009).
19. Wu, L., McElheny, D., Setnicka, V., Hilario, J. & Keiderling, T. A. Role of different beta-turns in beta-hairpin conformation and stability studied by optical spectroscopy. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **80**, 44-60 (2012).
20. Zagrovic, B., Snow, C. D., Khaliq, S., Shirts, M. R. & Pande, V. S. Native-like mean structure in the unfolded ensemble of small proteins. *Journal of Molecular Biology* **323**, 153-164 (2002).
21. Singhal, N., Snow, C. D. & Pande, V. S. Using path sampling to build better Markovian state models: Predicting the folding rate and mechanism of a tryptophan zipper beta hairpin. *Journal of Chemical Physics* **121**, 415-425 (2004).
22. Xiao, Y., Chen, C. J. & He, Y. Folding Mechanism of Beta-Hairpin Trpzip2: Heterogeneity, Transition State and Folding Pathways. *International Journal of Molecular Sciences* **10**, 2838-2848 (2009).
23. Roy, A., Bour, P. & Keiderling, T. A. TD-DFT Modeling of the Circular Dichroism for a Tryptophan Zipper Peptide with Coupled Aromatic Residues. *Chirality* **21**, E163-E171 (2009).
24. Hayre, N. R., Singh, R. R. P. & Cox, D. L. Evaluating force field accuracy with long-time simulations of a beta-hairpin tryptophan zipper peptide. *Journal of Chemical Physics* **134** (2011).
25. Chen, L. X., Shao, Q., Gao, Y. Q. & Russell, D. H. Molecular Dynamics and Ion Mobility Spectrometry Study of Model beta-Hairpin Peptide, Trpzip1. *Journal of Physical Chemistry A* **115**, 4427-4435 (2011).
26. Compagnon, I., Oomens, J., Meijer, G. & von Helden, G. Mid-infrared spectroscopy of protected peptides in the gas phase: A probe of the backbone conformation. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 3592-3597 (2006).
27. Vaden, T. D. et al. Conformational Preferences of an Amyloidogenic Peptide: IR Spectroscopy of Ac-VQIVYK-NHMe. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 14640-14650 (2008).
28. Calvo, F. et al. Statistical Analysis of Ion Mobility Spectrometry. II. Adaptively Biased Methods and Shape Correlations. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **23**, 1279-1288 (2012).
29. Chirot, F. et al. Statistical Analysis of Ion Mobility Spectrometry. I. Unbiased and Guided Replica-Exchange Molecular Dynamics. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **23**, 386-396 (2012).
30. Pouilly, J. C. et al. Combining ion mobility mass spectrometry and infrared multiphoton dissociation spectroscopy to probe the structure of gas-phase vancomycin-Ac(2)(L)K(D)A(D)A non-covalent complex. *International Journal of Mass Spectrometry* **297**, 28-35 (2010).

CHAPITRE V

Désorption laser sur micro-gouttelettes sous vide

CHAPITRE V

Désorption laser sur micro-gouttelettes sous vide

1. Principe général de l'expérience

La mise en phase gazeuse de biomolécules chargées est généralement réalisée par l'électro-nébulisation (ESI) ou par désorption laser assistée par matrice (MALDI). Ces méthodes de production sont dites « douces » car elles permettent de ne pas trop dénaturer ou fragmenter les espèces qui peuvent être analysées par spectrométrie de masse. Par contre, les études par spectrométrie de masse (à l'exception des expériences de mobilité ionique) ne permettent pas a priori de savoir si la structure secondaire/tertiaire des biomolécules ainsi que celles de complexes non-covalents sont conservées lors du passage de la phase condensée à la phase gazeuse.

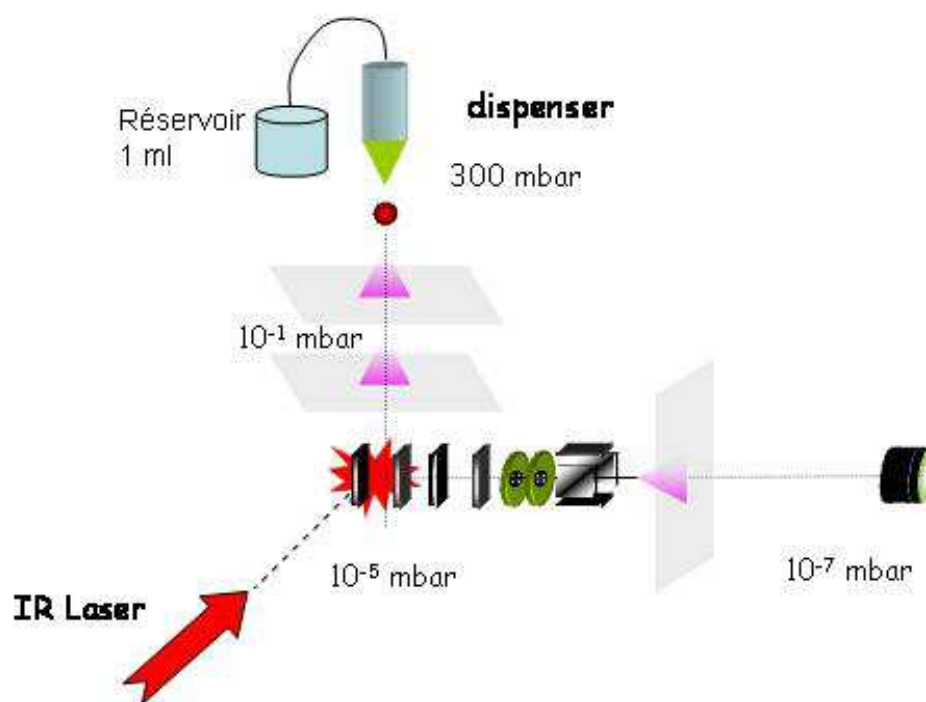


Figure 1: Expérience de désorption laser sur micro-gouttelettes en phase gazeuse

Dans le but d'étudier des complexes non-covalents de molécules biologiques, l'équipe a développé une nouvelle technique originale de mise en phase gazeuse de biomolécules, initialement proposée par l'équipe de B. Brutschy.¹ A notre connaissance, seule une autre

équipe japonaise utilise cette technique.² L'effort principal porte sur la mise en œuvre d'une désorption laser sur micro-gouttelettes (LILBID pour Laser-Induced Liquid Bead Ionization / Desorption) directement sous vide avec une détection des ions désorbés par spectrométrie de masse à temps de vol (Figure 1). L'un des avantages de cette nouvelle source par rapport aux sources à électrospray est d'étudier en phase gazeuse des molécules biologiques dans des conditions au plus proche de celles de la phase liquide. Je vais présenter la technique MALDI et les études sur les jets liquides qui sont à l'origine du développement de la technique LILBID.

1.1 MALDI

En MALDI, les molécules d'intérêt sont piégées dans une matrice constituée de molécules organiques ou de fines poudres de matériaux légers^{3,4} et soumis à l'irradiation d'un laser, généralement dans l'UV ou parfois dans l'IR. La matrice va absorber l'énergie incidente apportée par le laser et produire une plume de désorption, éjectant sous vide les molécules d'intérêt ainsi que les résidus de la matrice. La matrice sert à plusieurs titres. Dans le cas de matrices solides (poudre de graphite par exemple) ou cristallines après évaporation du solvant utilisé pour sa préparation, elle doit assurer un bon mélange des molécules d'intérêt sans formation d'agrégat. En matrice, les molécules d'intérêt sont incorporées dans l'état de charge présent en phase condensée, en présence ou non de contre-ions qui assure la neutralité. L'énergie déposée par le laser de désorption doit être absorbée efficacement par la matrice (et non par les molécules d'intérêt) en un temps court (typiquement quelques ns) afin d'éviter la redistribution de l'énergie vers la molécule hôte par diffusion thermique. Deux régimes ont été mis en évidence suivant la fluence du laser. A faible fluence, les espèces isolées neutres et ioniques sont désorbées sous vide alors qu'à haute fluence, on passe à un régime d'ablation dans lequel la matrice explose et libère des agrégats de matrices et de molécules piégées.^{5,6} Plusieurs processus physiques ont lieu en MALDI. L'absorption initiale du rayonnement UV ionise les molécules de la matrice et éjecte des électrons sous vide. Une conversion interne rapide chauffe localement et rapidement la surface de la matrice pour former la plume qui se développe perpendiculairement à la surface. Des réactions chimiques ion-molécule interviennent dans la plume (notamment des transferts de protons) dans les premières μ s et jusqu'à ce que les collisions le permettent. La production d'espèces ioniques est relativement

faible par rapport à l'éjection de neutres, entre 10^{-3} et 10^{-8} ⁷ et la température de la plume est estimée à 1000 K. ⁸

Bien que la technique MALDI soit considérée, avec l'électrospray, comme une méthode d'ionisation « douce », elle produit une proportion importante de fragments, ^{9,10} mais elle est plus tolérante à la présence de sels ioniques que l'ESI. Une autre caractéristique du MALDI par rapport à l'ESI est de produire de faibles états de charge, le plus souvent des molécules simplement protonées ou déprotonées. Ceci pose des problèmes de détection des molécules de grandes tailles par spectrométrie de masse, mais diminue les effets indésirables de répulsion coulombienne sur la structure adoptée par les molécules en phase gazeuse. ¹¹

Il existe deux grandes familles de molécules qui servent de matrice solide pour produire des espèces ioniques. Pour l'étude d'espèces protonées, il faut utiliser des molécules acides donneuses de proton, alors que pour l'étude des espèces déprotonées, il faut utiliser des molécules accepteuses de proton (bases). On peut rappeler que les études sur les molécules neutres, entraînées dans une détente supersonique et ionisées par laser, utilisent des matrices le plus souvent à base de poudre de carbone compressée. ^{12,13} L'un des problèmes intrinsèques au MALDI est la faible reproductibilité du signal d'ions, due principalement à la faible homogénéité du mélange initial. L'utilisation de matrices liquides comme le glycérol s'est révélée intéressante pour augmenter la reproductibilité. Mais cette molécule n'absorbe pas dans l'UV et il faut alors ajouter à la solution une molécule avec chromophore ou bien utiliser un laser de désorption dans l'IR. Hillenkamp *et al.* ont, par exemple, détecté des doubles brins d'ADN avec cette méthode en partant de concentrations très faibles, inférieures à la picomole. ¹⁴

1.2 Désorption laser sur jet liquide

Plusieurs groupes ont travaillé sur la désorption sur jets liquides afin de pallier aux problèmes de reproductibilité connus de la technique MALDI sur matrice solide. Un jet liquide peut être généré sous vide par injection du solvant à travers un petit orifice de 10 à 20 μm de diamètre à des pressions de 10 à 100 bars et se propageant à des vitesses de plusieurs dizaines de mètres par seconde. ^{15,16} Bien qu'une grande quantité de liquide soit introduite dans la chambre sous vide, la pression résiduelle peut être maintenue relativement basse (10^{-5}

mbar) en utilisant un piège refroidi à l'azote liquide en bout de jet. Les jets liquides d'alcool sont plus faciles à mettre en œuvre que les jets liquides d'eau à cause de leurs températures de fusion plus basses.¹⁷

Les ions biomoléculaires sont éjectés sous vide après absorption d'une impulsion laser. Cette technique LILBID (laser induced liquid beam ionisation desorption) a été introduite par plusieurs groupes dont ceux de T. Kondow¹⁸ au Japon et B. Brutschy¹⁹ en Allemagne. La désorption peut être réalisée avec une impulsion UV ou IR et les mécanismes d'ionisation sont alors différents.

Dans l'expérience de Kondow, le laser de désorption émet dans l'UV qui est directement absorbé par les molécules d'intérêt. Les électrons éjectés de la surface du jet par irradiation laser laissent la surface chargée positivement et, lorsqu'un ion en surface subit une énergie de répulsion électrostatique supérieure à son énergie de solvation, il est désorbé et peut être détecté par le spectromètre de masse.²⁰ Ils ont montré que les ions possèdent une vitesse d'éjection de l'ordre de 700 m/s et peuvent être produits avec ou sans molécules de solvant. Les agrégats générés peuvent ensuite évaporer des molécules de solvant, ce qui réduit leur énergie interne.

La désorption peut être effectuée par absorption d'un rayonnement IR, dont la longueur d'onde est centrée sur une bande d'absorption intense du solvant, autour de 10 μm pour les alcools (vibration COH) ou 3 μm pour l'eau. Dans ce cas, c'est le solvant qui fait office de matrice et qui absorbe l'énergie incidente. Plusieurs modèles ont été introduits pour expliquer les mécanismes impliqués dans la désorption laser IR sur jet liquide. Brutschy a d'abord suggéré que l'absorption du rayonnement laser induit une transition de phase rapide au delà du point supercritique du solvant entraînant sa vaporisation soudaine.²¹ Au cours de la vaporisation et au fur et à mesure que la densité du liquide décroît, la constante diélectrique diminue jusqu'à atteindre 1 (vide) et les ions de polarités opposées vont alors se recombiner. Seules les particules ayant été éjectées avec une grande énergie cinétique et qui se trouvent assez éloignées d'un contre ion peuvent alors être détectées par spectrométrie de masse. Ce modèle « lucky survivor » correspond donc à un processus de recombinaison ionique avorté. Comme suggéré pour la technique MALDI, la proportion des ions éjectés initialement présents en solution est estimée à 10^{-5} . La profondeur de pénétration du laser dans le jet peut être variée en ajustant la longueur d'onde et la puissance du laser de désorption, mais il est

admis que seuls les ions initialement proches de la surface du liquide sont détectés alors que des agrégats neutres de molécules issues de l'intérieur du jet peuvent être émis.²² Un autre modèle proposé par Abel *et al.* suggère que l'absorption subite de l'énergie déposée par le laser crée une onde de choc puis une explosion thermique du liquide.²³ Le liquide est dispersé sous forme de très petites gouttelettes chargées qui transfèrent leurs charges aux biomolécules. La tension de surface de la micro-gouttelette est trop petite pour supporter plusieurs charges et libère les molécules d'intérêt sous vide. Les auteurs ont montré que ce modèle de dispersion du liquide est cohérent avec les observations expérimentales, telle que l'évolution du courant d'ion détecté en fonction de la concentration initiale des molécules dans la solution et ceci sur plusieurs ordres de grandeur jusqu'à la saturation observée à hautes concentrations.²⁴

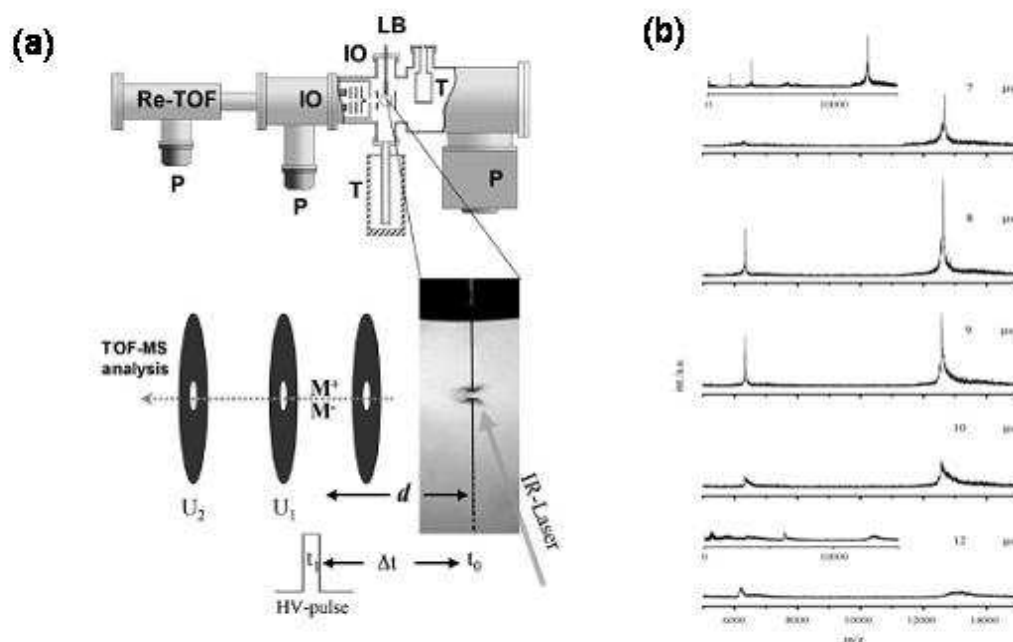


Figure 2: (a) Désorption laser sur jet liquide et détection des ions par un spectromètre de masse à temps de vol en régime pulsé (Montage du groupe d'Abel). (b) Signal d'ions du cytochrome C en fonction du délai d'extraction.

Le montage expérimental de l'expérience de désorption sur jet liquide avec détection des ions par spectrométrie de masse à temps de vol est présenté sur la figure 2a. Le temps de vol fonctionne en régime pulsé, à la même fréquence que le laser de désorption, ce qui permet de varier le délai d'extraction des ions et d'analyser la dynamique de la désorption en fonction du temps. La distribution de la vitesse des ions désorbés peut ainsi être déduite. Les spectres de masse du cytochrome C, en fonction du délai d'extraction, sont reportés sur la figure 2b.

Les ions simplement et doublement protonés sont détectés entre 7 et 10 μs après le tir laser. Les vitesses d'éjection des ions sont comprises entre 3500 et 5000 m/s. En augmentant l'énergie incidente du laser de 0.5 à 0.7 mJ, la vitesse d'éjection des ions augmente et quelques fragments du cytochrome C apparaissent pour les grands temps d'extraction.

Cette technique LILBID est considérée comme une méthode de vaporisation douce car le taux de fragmentation des biomolécules est très faible en optimisant les conditions de focalisation et d'intensité du laser. De plus, des complexes non-covalents spécifiques de peptides et d'ADN ont été détectés,^{19,25,26} ce qui laisse supposer que les biomolécules désorbées conservent, au moins en partie, leurs structures natives.

2. Génération de micro-gouttelettes liquides sous vide

L'inconvénient principal de la désorption sur jet continu est le très faible rendement d'ions rapporté à la consommation de produit. Afin de palier ce problème, l'équipe de Brutschy a proposé de réaliser la désorption laser sur des micro-gouttelettes générées à la demande, à la même fréquence que le laser de désorption.¹ La taille des gouttes est de l'ordre de 50 μm de diamètre, ce qui correspond à un très petit volume de 60 pL. La limite ultime atteinte pour détecter des ions avec un rapport signal/bruit suffisant est inférieure à la femtomole.^{27,28} Il faut quand même noter que cette valeur est déduite du nombre de gouttes irradiées (entre 5 et 100) pour obtenir un spectre de masse moyenné. Mais pratiquement, le dispenseur est relié à un réservoir qui contient plus ou moins 1 ml de solution à des concentrations de l'ordre de 1-100 μM ce qui se rapproche des concentrations utilisées dans des nano- et électro-sprays. Des systèmes de très grandes masses ont été détectés par LILBID, par exemple des oligonucléotides de masse supérieure au Méga Dalton.^{27,28} De plus, cette technique semble être plus tolérante à la présence de sels ioniques dans la solution, qui pose souvent un problème en ESI. Ceci est particulièrement intéressant pour étudier des protéines trans-membranaires insolubles sans détergents et qui sont inutilisables en ESI.²⁹ Enfin, cette technique de désorption est particulièrement douce car elle semble préserver les complexes spécifiques de protéines^{30,31} ou de systèmes RNA-ligand³² initialement présents en solution.

La génération de micro-gouttelettes liquides sous vide impose des défis techniques car il faut éviter au maximum l'évaporation et la congélation du liquide qui se produit aux basses

pressions. Ceci peut être obtenu en produisant les gouttelettes dans une région à haute pression résiduelle et en transférant les gouttelettes dans une chambre maintenue à basse pression par pompage différentiel. Je vais maintenant présenter le montage expérimental que nous avons construit au laboratoire pour produire les gouttelettes et détecter les ions par désorption laser sous vide.

2.1 Générateur de gouttelettes

Nous avons acheté un dispenseur piézo-électrique (Microdrop) qui génère, à la demande, des gouttelettes de 50 μm de diamètre. Le générateur se compose d'un capillaire en verre qui est entouré par un actionneur piézoélectrique tubulaire (Figure 3). L'extrémité du capillaire a un diamètre de 50 μm . Lorsqu'une impulsion électrique est envoyée au piézo, celui-ci se contracte et envoie une onde de choc au capillaire en verre, qui transmet à son tour la vibration au liquide. Comme l'extrémité du capillaire est ouverte, il s'en échappe une goutte dont le diamètre est environ égal à celui de l'extrémité, ici 50 μm , ce qui correspond à un volume de 60 pL. Les caractéristiques de l'impulsion à envoyer dépendent du liquide et surtout de sa viscosité. Pour une solution aqueuse, un bon fonctionnement requiert des valeurs typiques de 100 V avec une durée d'impulsion de 30 μs .

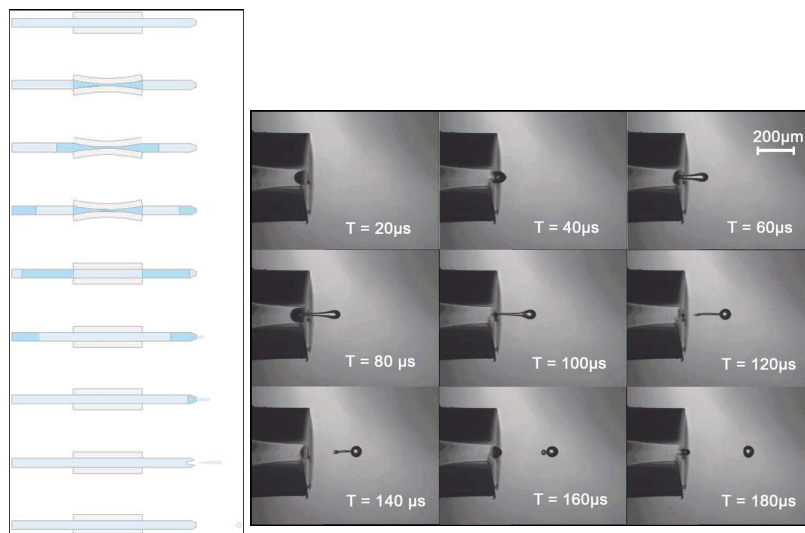


Figure 3: Schéma du générateur de gouttelettes Microdrop. La contraction du piézoélectrique crée une onde de choc qui libère une goutte à la sortie du capillaire. Séquence temporelle de l'éjection de la goutte.

Le dispenseur est disposé dans une première enceinte sous vide primaire (pression supérieure à la pression de vapeur saturante du liquide) et rempli d'une solution (ml) de

biomolécules à une faible concentration (μM), ce qui permet de mener des études sur de très faibles quantités (μg - mg). Les gouttelettes sont éjectées à une vitesse de quelques mètres par seconde et sont imagées par deux caméras CCD afin de suivre leur progression et de déterminer leur temps d'arrivée dans la zone d'interaction située dans une deuxième enceinte sous vide secondaire ($10^{-5}/10^{-6}$ mbar). Le vide dans la première enceinte est maintenu constant en ajustant l'ouverture d'une vanne micro fuite.

L'un des points critiques est de transférer la gouttelette ($50 \mu\text{m}$) d'une première chambre haute pression (300 mbar) à travers une série d'écorceur de $300 \mu\text{m}$ et $500 \mu\text{m}$ d'ouverture vers la chambre à basse pression (10^{-5} mbar) où a lieu la désorption (Figure 4). Ceci a nécessité la construction de plusieurs montages mécaniques afin de réduire les turbulences engendrées par le pompage différentiel entre les chambres. Le pointé de la goutte doit être stable à plus ou moins $100 \mu\text{m}$ (après un parcours de 10 cm) et $2 \mu\text{s}$ (après 5 ms de vol libre) pour optimiser la désorption laser à tous les coups (10 Hz). Le dispenseur est monté sur une potence dont la position horizontale peut être ajustée suivant les deux axes x/y. On règle manuellement la hauteur du dispenseur par rapport au premier écorceur. La tête du dispenseur est incorporée dans une monture piézoélectrique afin de régler son orientation par rapport au premier écorceur et de compenser les variations de trajectoires de la goutte au jour le jour. Toutes les montures (translation et inclinaison) sont commandées électriquement sous vide de l'extérieur.

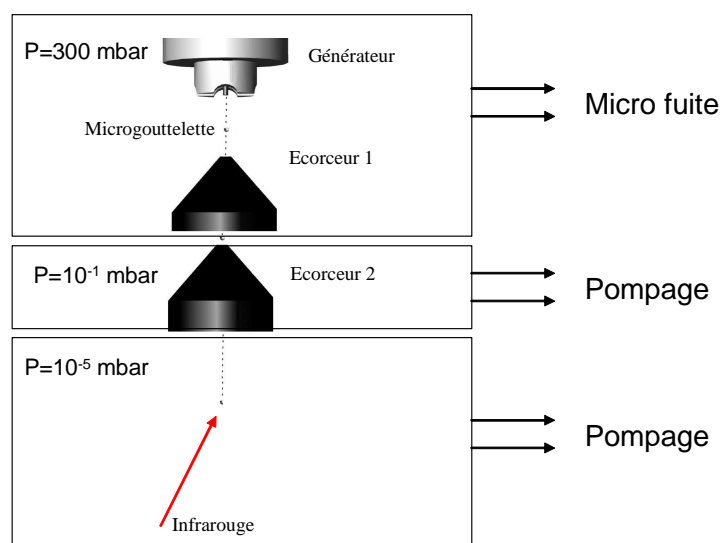


Figure 4: Schéma du transfert de la goutte vers la zone de basse pression où est effectuée la désorption.

Lorsqu'une gouttelette liquide dans les conditions normales de température et de pression ($T = 300 \text{ K}$, $P = 1 \text{ atm}$) est mise sous vide de façon soudaine et donc isolée du milieu environnant, elle se retrouve hors équilibre thermodynamique et un refroidissement évaporatif a lieu. On peut alors se demander si la gouttelette va changer de phase, c'est-à-dire se solidifier, car même si sa température descend en dessous de sa température de fusion la gouttelette peut rester liquide dans un état métastable super-refroidi. Dans une récente publication, L. Zilch *et al.*³³ décrivent l'évaporation de gouttelettes d'eau sous vide secondaire. Selon leurs calculs, des gouttelettes d'environ $5 \mu\text{m}$ de diamètre, soit 10 fois plus petites que dans notre cas, passent par un état super-refroidi et sont solidifiées au bout de 3 ms environ. Ils montrent également que l'évolution du temps au bout duquel les gouttelettes sont solides augmente à peu près linéairement avec le diamètre de la goutte, on peut donc s'attendre à une solidification au bout de 30 ms pour une gouttelette de $50 \mu\text{m}$ de diamètre. Dans notre expérience, les gouttes arrivent dans la zone d'interaction avec le laser en 5 ms. Elles sont donc restées liquides. Nous pouvons aussi le confirmer en visualisant la vaporisation de la gouttelette après absorption du laser IR. Nous obtenons les mêmes images sous vide qu'à l'air libre (Figure 5). De plus, le spectre d'absorption de l'eau est différent suivant sa phase³⁴ et nous n'avons pas dû changer la longueur d'onde du laser pour observer la vaporisation.



Figure 5: Images de la goutte à l'air libre avant, $2 \mu\text{s}$ et $20 \mu\text{s}$ après l'absorption du faisceau IR.

2.2 Laser OPO IR large bande de désorption

Etant donné la densité d'énergie surfacique requise pour la désorption (de l'ordre de 100 MW/cm^2), nous avons choisi d'utiliser un laser OPO accordable dans l'IR autour d'une longueur d'onde de $3 \mu\text{m}$. La Figure 6 montre le schéma du laser OPO IR large bande. Un cristal non-linéaire de niobate de Lithium, LiNbO_3 est pompé par un faisceau d'une longueur d'onde de $1,064 \mu\text{m}$ issu d'un laser Nd:YAG impulsif nanoseconde. Deux miroirs de chaque côté du cristal forment une cavité qui permet d'amplifier la lumière produite par le

processus non linéaire d'amplification paramétrique au sein du cristal. C'est une conversion de fréquence qui permet d'obtenir le faisceau IR. On a au total trois faisceaux : la pompe, le signal et le complémentaire (*idler*). Par convention, le faisceau de plus petite longueur d'onde est le signal. Du fait de la conservation de l'énergie, le processus non-linéaire obéit à l'équation suivante :

$$\omega_p = \omega_s + \omega_c$$

avec ω_p , ω_s , et ω_c les pulsations des faisceaux de pompe, du signal et du complémentaire.

C'est ce dernier qui constitue le rayonnement IR que l'on veut optimiser. On doit également satisfaire la condition similaire pour les vecteurs d'onde en vertu de la conservation de la quantité de mouvement des photons. D'autre part, lors de la propagation dans le cristal, ces trois faisceaux de longueurs d'onde différentes sont générés avec des vitesses de groupes différentes. Par conséquent, même si elles sont en phase au début du cristal, les ondes perdent leur cohérence lors du trajet et ne sont plus superposées temporellement. Après une certaine distance parcourue, elles sont même en opposition de phase et le processus inverse se produit alors : un photon de pulsation ω_s et un autre ω_c donnent un photon ω_p . Cette distance est appelée « longueur de cohérence » et est quantifiée par le désaccord de phase $\Delta\vec{k} = \vec{k}_p - \vec{k}_s - \vec{k}_c$ dont la norme est $\Delta k = \frac{1}{c}(n_s\omega_s + n_c\omega_c - n_p\omega_p)$. Cette grandeur physique intervient dans la formule du gain :

$$G^2 = \frac{\omega_s \omega_c c^4}{n_s^2 n_c^2} K^2 \varepsilon_p^2 \frac{\left(\sin\left(\Delta k \frac{l}{2}\right) \right)^2}{\left(\Delta k \frac{l}{2} \right)^2}$$

où l est la longueur du cristal, c la vitesse de la lumière dans le vide, ε_p l'amplitude du champ électrique du faisceau de pompe et K un facteur dépendant de la susceptibilité non-linéaire du second ordre du cristal.

Pour maximiser le gain, il faut donc compenser la différence de vitesse de groupe en annulant le désaccord de phase Δk . On peut le faire grâce à l'utilisation de cristaux biréfringents dans lesquels il est possible d'ajuster la valeur de l'indice optique d'un faisceau

par son angle d'incidence dans le cristal et sa polarisation. Il existe dans le cristal une direction de polarisation linéaire de la lumière suivant laquelle l'indice optique ne varie pas en fonction de l'angle d'incidence. Cette direction est dite « axe ordinaire ». Par contre, la même lumière polarisée perpendiculairement à cette dernière voit son indice optique dépendre de l'angle et on parle alors d'« axe extraordinaire ». Il s'agit ensuite de choisir convenablement les polarisations des faisceaux et l'angle de coupe du cristal de manière à ce que l'accord de phase soit possible pour la gamme de longueur d'onde désirée. Concrètement, il est nécessaire de fixer le cristal sur une monture de rotation afin de pouvoir l'orienter par rapport à l'axe du faisceau de pompe. D'autre part, il faut bien sûr veiller à ce que les trains d'ondes puissent interagir en les superposant spatialement et temporellement dans le cristal. Pour cette raison il est préférable que les trois vecteurs d'onde soient colinéaires (θ nul sur la Figure 7), on parle alors d'accord de phase colinéaire.

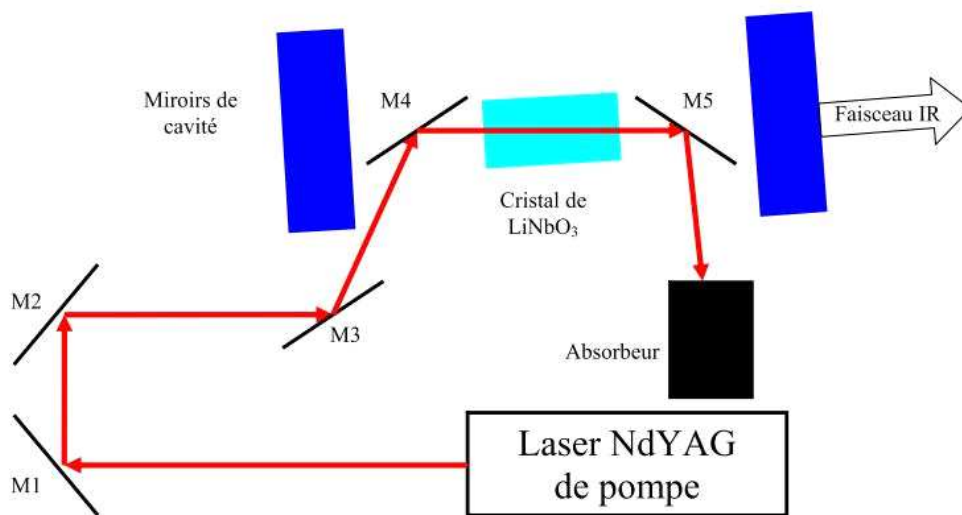


Figure 6: Laser OPO

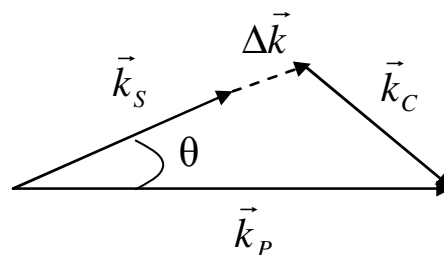


Figure 7: schéma des trois vecteurs d'onde des photons de pompe, du signal et du complémentaire illustrant le désaccord de phase.

Il existe toute une gamme de couples de fréquences ω_S et ω_C qui satisfont la conservation de l'énergie mais l'accordabilité finale de notre OPO sera déterminée par la condition d'accord de phase. La position angulaire du cristal détermine la longueur d'onde d'émission, typiquement comprise pour notre système (cristal de LiNbO_3) entre 2.5 et 4 μm . Comme nous l'avons précisé auparavant, le gain maximal est obtenu pour $\Delta k = 0$, c'est à dire que pour une pulsation désirée ω_C nous devons choisir une valeur de l'indice optique en ajustant la position du cristal. Cependant, des photons avec des valeurs de ω_S et ω_C légèrement différentes sont produits par le même processus non linéaire et ce avec suffisamment de gain pour que ce mode subsiste dans la cavité. On observe donc un élargissement spectral du faisceau de sortie (le complémentaire en l'occurrence). En d'autres termes, pour une position du cristal fixée, il existe une distribution en pulsation pour laquelle le désaccord de phase n'est pas trop grand et conduit à un gain suffisant. Par analogie et toujours pour une position du cristal donnée, il existe une distribution en angle des photons générés en ω_C pour laquelle le gain est également suffisant. On obtient donc un cône d'émission faisant un angle d'environ 5 mrad avec la direction du faisceau de pompe. La largeur spectrale (estimée à plus de 50 cm^{-1}) est déterminée par les propriétés du faisceau de pompe, les propriétés du cristal et l'angle d'incidence du faisceau de pompe par rapport à la direction du cristal.

Le faisceau laser IR est focalisé par une lentille courte focale (10 cm) placée à l'intérieur de la chambre à vide. Il existe un seuil (0.7 mJ) à partir duquel la vaporisation de la goutte est observée à la caméra. Il faut généralement augmenter l'énergie laser à 1.5 mJ pour détecter un signal d'ions. Le fait que la lentille soit à l'intérieur de la chambre sous vide nous empêche de contrôler parfaitement le pointé du laser par rapport à la goutte. Suivant la longueur d'onde du laser IR et l'alignement du faisceau par rapport à la lentille, l'image de la vaporisation de la goutte change, ce qui semble indiquer que différents mécanismes de vaporisation ont lieu. De plus, en augmentant l'intensité laser à 4-5 mJ, on observe un plasma très lumineux. Le signal d'ions détecté dépend des conditions laser (intensité et pointé). Je vais décrire ci-dessous notre montage du temps de vol qui permet de détecter les ions désorbés.

3. Spectromètre de masse à temps de vol et détection des ions

La désorption laser est réalisée dans la zone d'extraction d'un spectromètre de masse à temps de vol équipé d'un détecteur d'ions à galettes de micro-canaux. L'optimisation du signal d'ions dépend des conditions laser (longueur d'onde, intensité), de l'endroit et du délai entre la désorption et l'extraction pulsée du spectromètre de masse. Les ions issus de la désorption sont produits avec une distribution de vitesse autour de 800 m/s quasiment indépendante de la masse des ions.^{35,36} De plus, l'énergie cinétique des ions n'est pas constante à cause des collisions dans la plume de désorption. Enfin, les ions peuvent être formés à différents moments au cours de la désorption. Ces caractéristiques limitent la résolution en masse autour de 50 dans la gamme du kilo Dalton.

Une manière de compenser partiellement ces effets est de découpler en temps la formation des ions de leur extraction. Ceci est réalisé par la méthode d'extraction retardée. Il faut noter que cette technique ne permet pas de compenser la distribution initiale de vitesse des ions issus de la désorption. La désorption s'effectue dans une première zone du spectromètre de masse sous champ continu (zone d1, Figure 8) avant que les ions ne soient dirigés vers la zone d'extraction/accélération du spectromètre où l'on applique des champs intenses pulsés. En ajustant la valeur du champ continu et le délai d'extraction de la deuxième zone, on peut ainsi réduire l'effet des collisions sur la distribution d'énergie cinétique des ions et sélectionner les ions suivant leurs temps de formation.³⁷⁻³⁹. Stephen A. Martin *et al.* ont ainsi montré que la résolution en masse sur des oligonucléotides (m/z 9470) produits par MALDI était grandement améliorée entre le mode normal et le mode d'extraction retardée, passant de 1300 à 4000.⁴⁰ L'utilisation d'un réflectron qui compense les différences d'énergie cinétique initiale des ions augmente encore la résolution qui atteint alors 10 000.

La figure 8 présente schématiquement les différentes zones de notre spectromètre de masse à temps de vol. Il est composé de trois zones. Entre les plaques P1 et P2, c'est la zone d'extraction retardée. Une tension continue de l'ordre de 100 V est appliquée sur la plaque P1, la plaque P2 étant à cet instant à la masse. Les deuxième et troisième zones correspondent à l'extraction et l'accélération pulsée. Les plaques P2 et P3 reçoivent deux tensions pulsées variables en intensité et durée et la dernière plaque P4 est à la masse. Les tensions appliquées sont de l'ordre de 3 et 2.5 kV et la durée du pulse est de l'ordre de 3 μ s. Le délai entre le tir laser et les tensions pulsées est ajusté par un générateur de délais avec une résolution de 10 ns.

Pratiquement, on obtient la meilleure résolution et le meilleur rapport signal à bruit pour des délais courts, de l'ordre de 5-7 μ s. Les ions sont refocalisés à l'aide d'une lentille électrostatique (Figure 9) vers un détecteur bipolaire à galettes de micro-canaux. La lentille d'Einzel se compose de quatre plaques dont le diamètre des deux plaques du milieu est plus grand ($R > r$). On applique une tension continue sur les deux plaques centrales (800-1000 V) en mode positif ou négatif respectivement pour les ions protonés et déprotonés, les deux plaques externes étant à la masse.

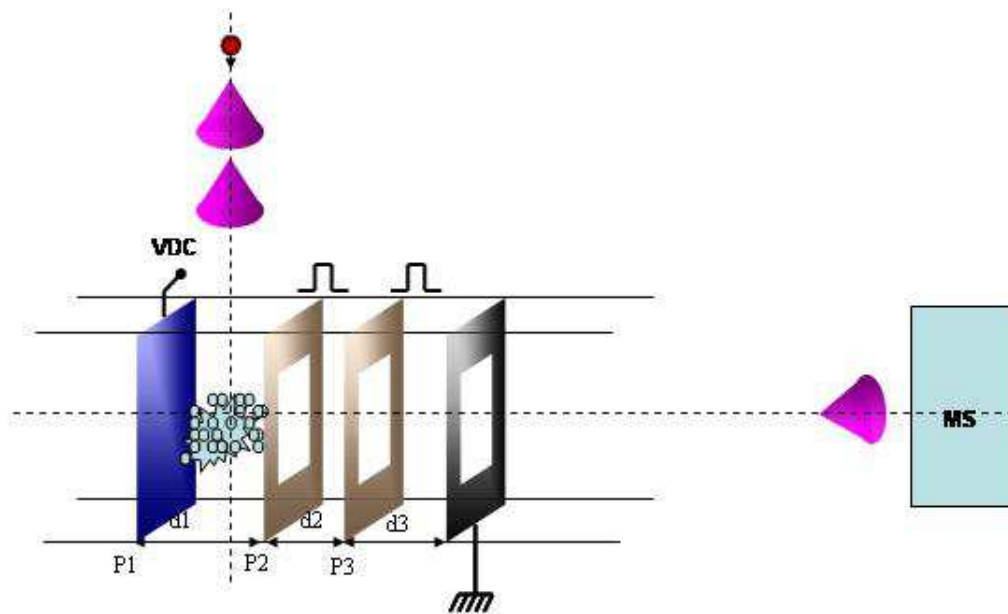


Figure 8: La zone d'extraction des ions

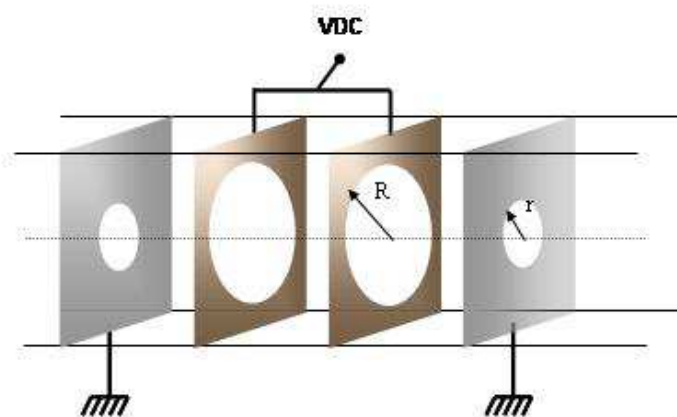


Figure 9: La lentille type einzel

4. Simulations SIMION

J'ai effectué des simulations de trajectoires des ions avec le programme SIMION.⁴¹ Il faut tout d'abord définir la géométrie du spectromètre de masse et les tensions sur les différentes plaques afin de calculer les champs électrostatiques. Les simulations sont calculées en fonction des tensions et des conditions initiales (position, vitesse) des ions. Le programme SIMION nous permet d'ajuster les tensions appliquées aux plaques pour que les ions soient effectivement focalisés au niveau du détecteur.

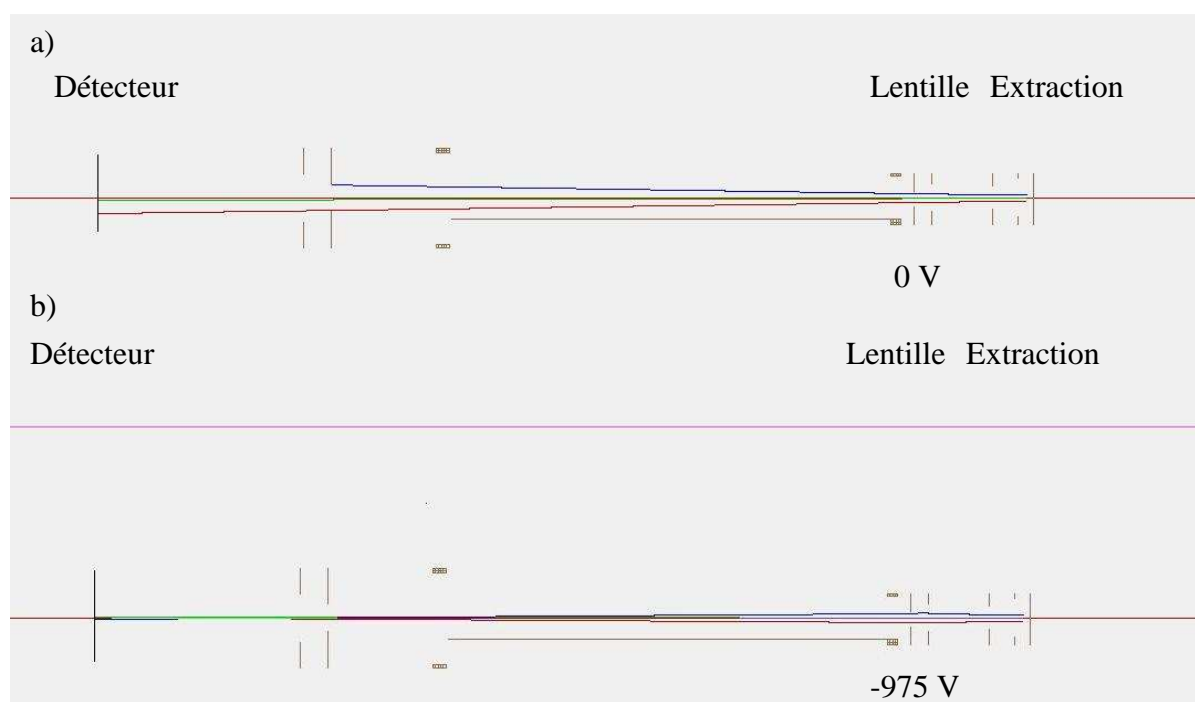


Figure 10 : Simulation des trajectoires de trois ions de vancomycine déprotonée (m/z 1449) en fonction de leurs positions initiales. Les tensions appliquées sur les plaques sont $P1= -150$ V, $P2= -2660$ V, $P3= -2200$ V dans les deux cas et la tension appliquée sur les plaques de la lentille est (figure 10a) $VDC= 0$ V et (figure 10b) $VDC= -975$ V.

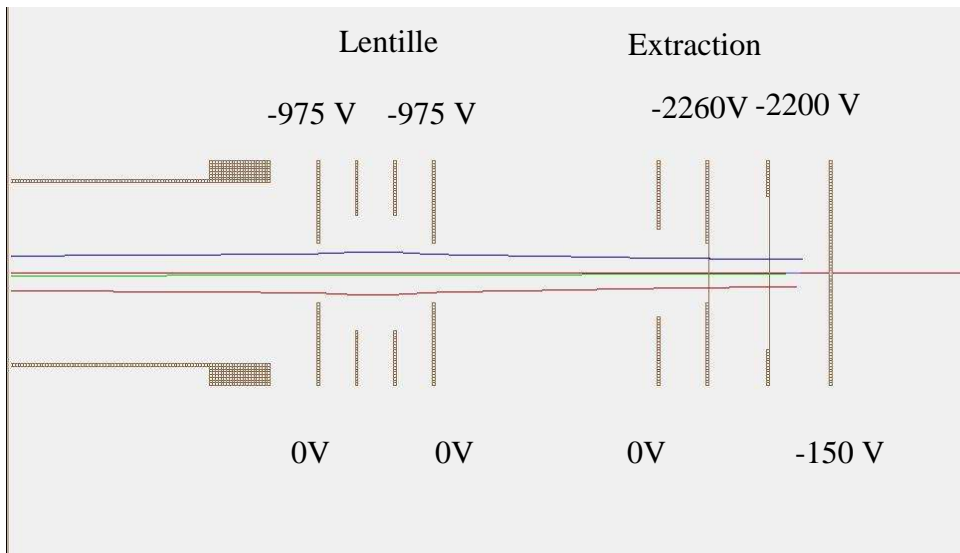


Figure 11: Agrandissement de la région d'extraction et lentille d'Einzel. Les conditions sont les même que celle sur la figure 10b.

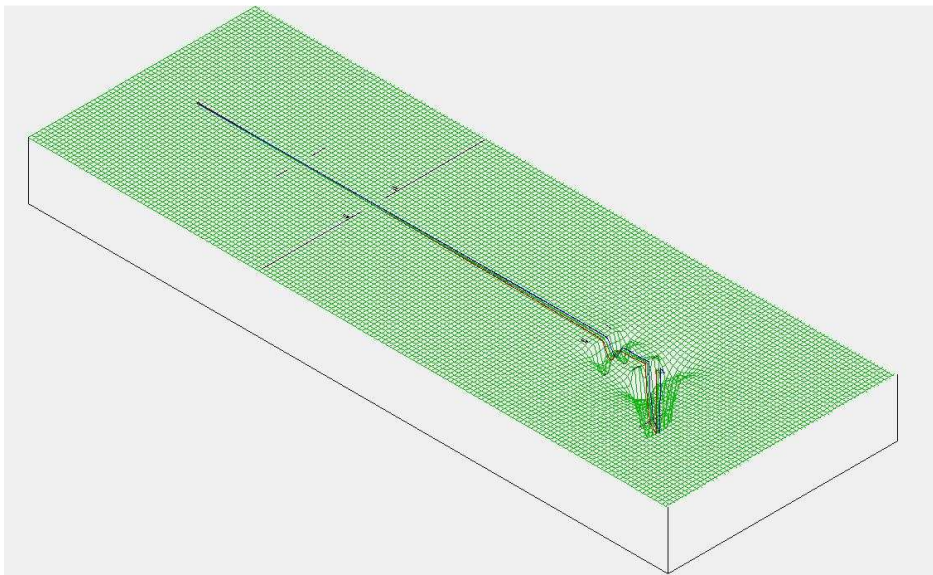


Figure 12: Visualisation du potentiel électrostatique ressenti par les ions.

La simulation de trajectoire des ions de vancomycine déprotoné de masse 1449 Da est reportée sur les figures 10 et 11, en fonction de leurs positions initiales. Chaque ligne de différente couleur représente la trajectoire d'un ion. Les tensions appliquées sur les plaques sont $P1 = -150 \text{ V}$, $P2 = -2660 \text{ V}$, $P3 = -2200 \text{ V}$. Les ions ont une énergie cinétique initiale de 0.01 eV avec un cône de distribution angulaire de vitesse de 90° . La figure 10 montre bien l'effet de la lentille. Sur la figure 10a, on ne met pas de tension sur la lentille et les ions divergent. Sur la figure 10b, on applique une tension de -975 V aux plaques de la lentille et

les ions sont focalisés sous l'effet du potentiel créé par la lentille et se trouvent au point focal au détecteur. La figure 11 fait un zoom sur la zone d'extraction et la zone de la lentille. La carte d'énergie potentielle en 3D est également donnée sur la figure 12 qui nous donne une visualisation du champ électrique dans notre expérience.

5. Résultats

La nouvelle expérience de désorption laser sur micro-gouttelettes et détection des ions par spectrométrie de masse à temps de vol est maintenant opérationnelle. Nous avons effectué plusieurs tests pour optimiser les différents paramètres de l'expérience, principalement sur les caractéristiques du temps de vol. Au niveau du laser, nous ne connaissons pas la longueur d'onde d'émission de l'OPO IR, mais nous savons pour quelles orientations du cristal nous pouvons détecter des ions et ceci est parfaitement reproductible.

Nous avons reporté sur la figure 13 les spectres de masse des ions vancomycine (m/z 1449) en mode négatif suivant le délai d'extraction. Pour un délai court, de l'ordre de 1-2 μs , on observe uniquement des ions du solvant, dans ce cas des agrégats d'eau négativement chargés. Nous n'avons pas la résolution en masse pour déterminer exactement la stoechiométrie des agrégats, entre $[(\text{H}_2\text{O})_n\text{-OH}]^-$ et $[(\text{H}_2\text{O})_n]^-$. En augmentant le délai d'extraction à 7 μs , on détecte les ions de la vancomycine simplement déprotonée, puis à 10 μs son dimère, et enfin un signal du trimère 3 μs plus tard. Au bout de 15-20 μs , on ne détecte plus aucun signal d'ions. La production des complexes de la vancomycine intervient donc plus tard dans la désorption, sur une échelle de 10 μs . Comme on peut le constater sur ces spectres de masse, la désorption ne produit pas trop de fragments et les ions sont simplement déprotonés, alors qu'il existe deux groupements acides carboxyliques susceptibles de perdre un proton.

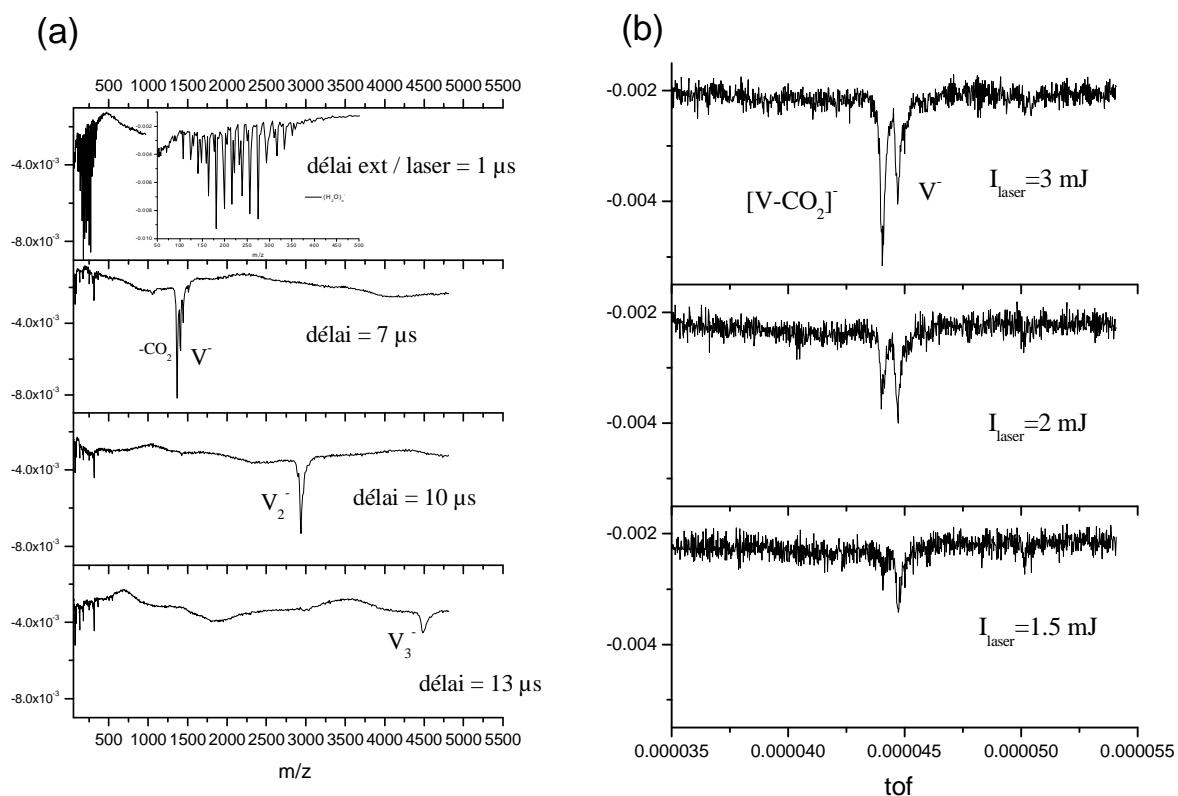


Figure 13 : Spectre de masse de la vancomycine (a) : en fonction du délai d'extraction retardée. (b) : en fonction de l'intensité laser.

Nous avons analysé l'effet de l'intensité laser sur l'apparition du fragment -44 (COO) de la vancomycine (Figure 13 b). Nous observons un seuil d'apparition du signal d'ion à 1.5 mJ sur la vancomycine sans observer de fragment. A 2 mJ, le signal augmente mais le fragment apparaît. A 3 mJ, le signal du fragment est le plus intense, alors que le signal sur l'ion vancomycine n'augmente plus.

L'apparition d'ions fragments dépend aussi de la molécule désorbée. Le spectre de masse de la bradykinine (m/z 1060) en mode positif est reporté à la figure 15. L'ion est détecté simplement chargé, alors que la bradykinine possède deux sites basiques Arg, sans aucune fragmentation. Les pics de masse dans la région des petits m/z correspondent aux agrégats de solvant DMSO qui est rajouté à la solution aqueuse pour augmenter la viscosité de la solution. A droite, on constate le gain en résolution en utilisant une extraction retardée (en bas) par rapport à une désorption réalisée directement dans la zone d'extraction du spectromètre de masse. De plus, un petit signal d'ion fragment est observé qui doit certainement provenir de collision dans la plume de désorption.

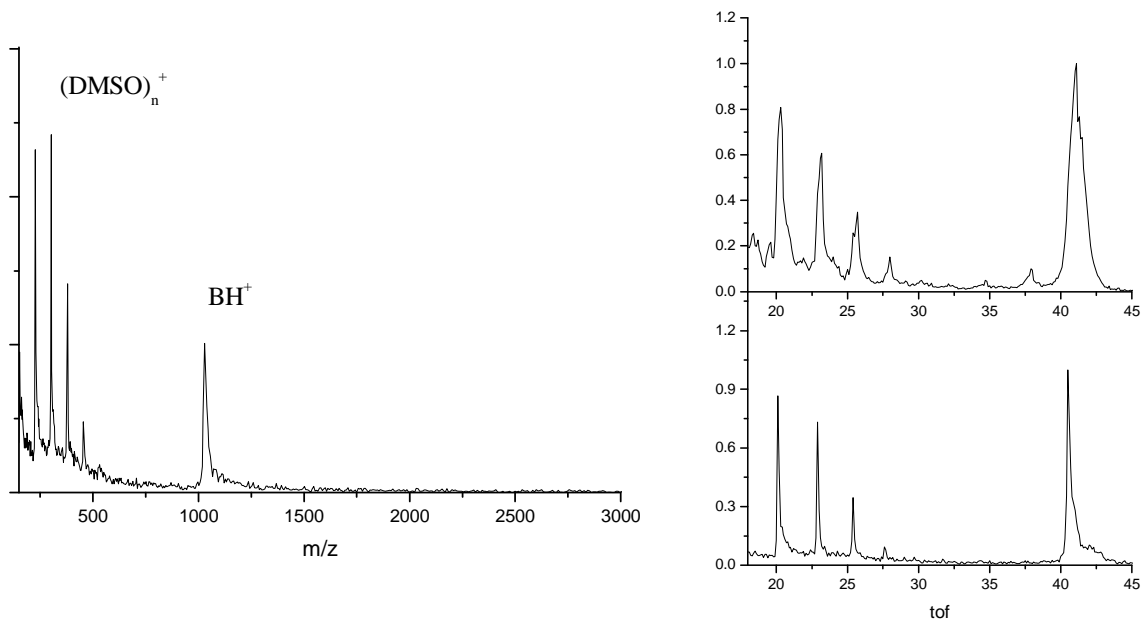


Figure 14 : Spectre de masse de la bradykinine en mode positif. A droite, effet de l'extraction retardée sur la résolution en masse.

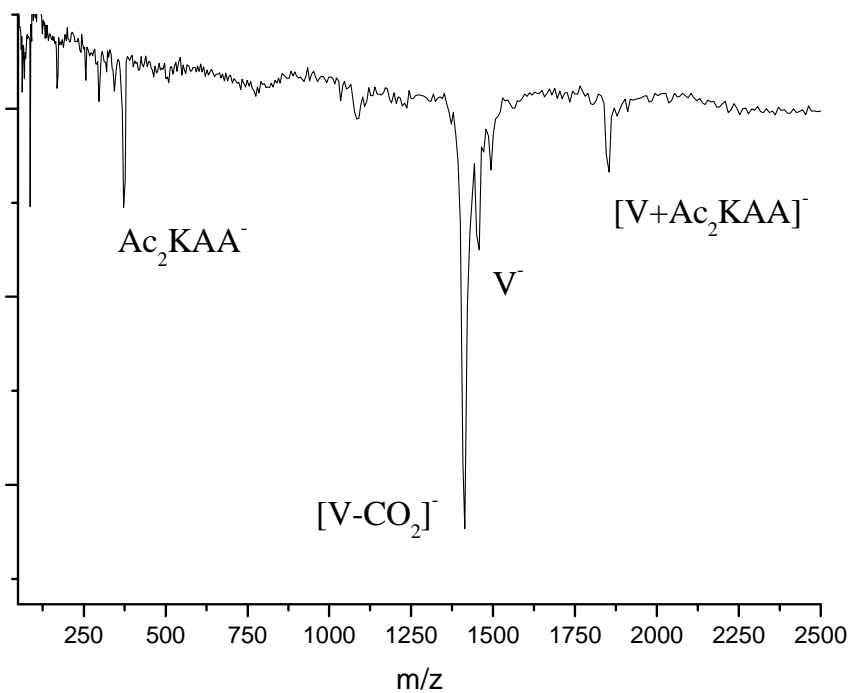


Figure 15 : spectre de masse de la vancomycine et du complexe avec son récepteur membranaire (Lys-Ala-Ala).

Finalement, nous avons pu observer des complexes non-covalents de la vancomycine avec son récepteur membranaire Lys-Ala-Ala (Figure 15) que nous avons déjà étudiés par spectroscopie laser et mobilité ionique en les produisant avec une source ESI.^{42,43} Nous n'avons pu observer le complexe qu'en mode négatif. Cela correspond bien, d'après nos

études structurales, aux bonnes conditions pour préserver l'interaction spécifique du récepteur avec la vancomycine et préserver la structure native du complexe. L'intensité du signal sur le complexe n'est pas aussi importante qu'avec l'ESI où l'on avait autant de complexe que de monomère. Les conditions d'intensité laser sont un peu élevées afin d'augmenter l'intensité du signal d'ion, ce qui se traduit par un signal de fragment sur la vancomycine important, mais pas sur le complexe.

6. Développements expérimentaux en cours

6.1 Couplage de la désorption laser avec une détente supersonique

Nous proposons de coupler la désorption laser à un jet pulsé supersonique de gaz rare. La désorption laser peut en effet être effectuée juste à la sortie d'une vanne pulsée, qui produit un jet supersonique capable d'entraîner et de refroidir les espèces désorbées. Nous pouvons utiliser une vanne pulsée développée dans le groupe du Pr. Even (Université de Tel-Aviv) qui génère des courtes impulsions (10-20 μ s) avec des pressions en amont très élevées (jusqu'à 100 bar).⁴⁴

L'utilisation d'un jet supersonique présente plusieurs avantages. Tout d'abord, il devrait permettre d'entraîner efficacement les molécules désorbées en les confinant suivant l'axe de propagation du jet. Au cours de l'expansion et par thermalisation avec les atomes du gaz porteur, on espère obtenir un faisceau de molécules bien collimaté ayant une énergie cinétique faible autour de l'eV (définie par la vitesse des atomes du jet) et ainsi améliorer la résolution en masse. Cela devrait aussi permettre de refroidir rovibrationnellement les molécules pour des applications de spectroscopie laser. Finalement, l'utilisation de la vanne «Even» devrait nous permettre de créer des agrégats d'Ar de grandes tailles pour optimiser la production de complexes biomolécule-Ar et ainsi réaliser une spectroscopie IR par la méthode du « messenger ».

Le jet supersonique entraîne les espèces jusqu'à la zone d'extraction d'un spectromètre de masse à temps de vol perpendiculaire à l'axe de propagation du jet. Ce spectromètre est muni d'un réflecteur électrostatique qui améliore la résolution en masse. Une autre possibilité offerte par l'utilisation d'un jet supersonique est de pouvoir étudier les espèces neutres,

libérées lors de la désorption laser. Comme nous l'avons vu lors de nos études sur les molécules chargées, le passage de la phase condensée à la phase gazeuse peut se traduire par un changement de structure important dû à la perte de l'écrantage électrostatique du solvant. Les sources actuelles de mise en phase gazeuse de molécules neutres (chauffage, désorption laser sur matrice) nécessitent de grandes quantités de produits (plusieurs centaines de mg), interdisant l'étude de systèmes pertinents pour la biologie. On peut donc espérer que le développement de cette nouvelle source à désorption laser permette d'étendre les études en phase gazeuse de molécules et de complexes non-covalents d'intérêt biologique et pharmaceutique dans des conditions moins perturbantes et au plus proche de celles rencontrées en phase condensée.

Dans le cas des espèces neutres, un laser UV sera ajouté au montage afin de les ioniser avant qu'elles n'arrivent dans le spectromètre, comme dans les expériences de spectroscopie R2PI. Un système de sélection en masse électrostatique est placé juste avant le réflectron. Ensuite, un laser OPO sera envoyé sur les ions au point de rebroussement du réflectron pour réaliser la spectroscopie IR et les ions parents et fragments seront détectés dans la deuxième partie du temps de vol.

Je vais décrire ci-dessous le principe de l'entraînement des molécules désorbées et du refroidissement dans un jet supersonique.

6.1.1 Le jet supersonique

Une détente consiste en une expansion d'un gaz, initialement à la pression P_0 et à la température T_0 , à travers un orifice de faible diamètre D et dans une enceinte maintenue à une pression P_B inférieure à P_0 . Lors de l'expansion, l'énergie thermique des atomes est transformée par collisions successives en énergie cinétique translationnelle. Les distributions angulaires et en vitesse sont très étroites, de l'ordre de 0.3 mrad et 1%. Le refroidissement translationnel obtenu est ~ 1 K. Une détente est dite supersonique lorsque la vitesse de l'écoulement v dépasse la vitesse locale du son a . Elle est alors caractérisée par un nombre de Mach M supérieur à l'unité : $M=v/a$.

Le gaz sort avec une vitesse supérieure à celle du son à la pression qui règne dans l'enceinte, donnant ainsi naissance à un front d'onde appelé « bouteille de Mach » et qui

confine le gaz à l'intérieur de celle-ci (Figure 16). La localisation du disque de Mach ne dépend que du rapport entre les pressions de la source P_0 et en sortie P_B . Pour une tuyère de diamètre d'ouverture donnée, plus le différentiel de pression sera important, plus la zone de silence sera longue. La distance de Mach x_M peut être estimée par l'expression suivante :

$$x_M = 0.67D \sqrt{\frac{P_0}{P_B}} \quad \text{où } D : \text{ le diamètre de la tuyère}$$

Pratiquement, le diamètre de la tuyère est de l'ordre de 100-500 μm , et le rapport des pressions est supérieur à 10^9 . La distance x_M est alors largement supérieure à la distance au spectromètre de masse, et les molécules sont donc étudiées isolées, sans collision avec le gaz résiduel. Afin d'augmenter le différentiel de pression et donc la longueur de la zone de silence, on place la tuyère en face d'un écorceur qui se situe à quelque centimètre en aval, la pression résiduelle dans la deuxième chambre étant plus basse. La forme de l'écorceur est conique, d'une ouverture de 200-500 μm avec un profil des parois ajusté pour réfléchir l'onde de choc de la détente sans perturber le jet.

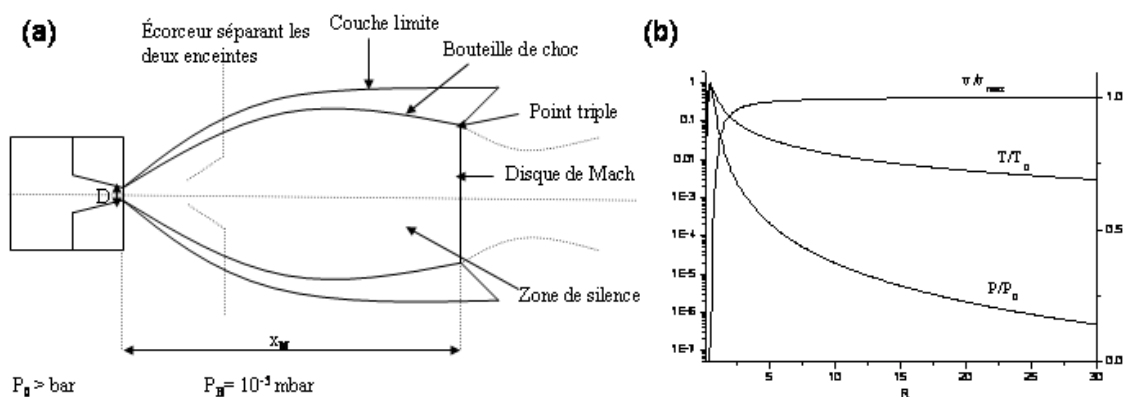


Figure 16: (a) Schéma de l'expansion supersonique. (b) Evolution de la température, pression et vitesse hydrodynamique du jet en fonction de $R=x_m/D$.

Pour limiter la vitesse de pompage, on utilise la vanne Even pulsée, qui a un temps d'ouverture court de l'ordre de 20-50 μs . Le diamètre de la tuyère est de 100 μm , ce qui permet d'augmenter la pression en amont jusqu'à 100 bars tout en conservant un bon vide dans la chambre d'expansion. La vanne est pulsée à la même fréquence que celle des lasers soit 10 ou 20 Hz. La synchronisation de la vanne et du laser est réalisée par un générateur de retard.

6.1.2 Refroidissement rovibrationnel

La température T , la pression P et la densité du gaz n dépendent du rapport $R=x_M/D$ et décroissent très vite avec la distance à la tuyère. La vitesse hydrodynamique du jet atteint sa valeur limite très tôt au cours de l'expansion (Figure 16b). La vitesse translationnelle des atomes dans le jet supersonique est de 1740 ms^{-1} pour l'hélium et de 550 ms^{-1} pour l'Argon.

$$\frac{T(R)}{T_0} = \left(\frac{P(R)}{P_0} \right)^{\frac{\gamma-1}{\gamma}} = \left(\frac{n(R)}{n_0} \right)^{\gamma-1} = \frac{1}{1 + \frac{\gamma-1}{2} M(R)^2} \quad \text{avec } M(R) \approx 3.3R^{\gamma-1} - R^{1-\gamma}$$

L'efficacité du refroidissement du jet supersonique est déterminée par le nombre de collisions inélastiques entre les atomes du gaz porteur (He, Ar...) et les molécules à étudier. Le taux de collision N_{coll} , dépend de la densité du gaz n_0 , du diamètre de la tuyère D , de la section efficace de collision du gaz porteur, du nombre de Mach $M(R)$ et du rapport γ des capacités calorifiques C_p et C_v :⁴⁵

$$N_{coll} = \sqrt{2} n_0 \sigma \bar{v} \frac{1}{\left(1 + \frac{\gamma-1}{2} M(R)^2 \right)^{\frac{\gamma+1}{2(\gamma-1)}}$$

Le nombre de collisions est pratiquement indépendant du gaz porteur. Mais la vitesse du refroidissement est supérieure pour les atomes de gaz lourds (Ar, Kr, Xe) par rapport à l'hélium ou au néon. Généralement, on utilise l'hélium pour obtenir un refroidissement efficace des molécules alors que l'Ar (ou le Xe si on a les moyens) est préféré pour former des complexes faiblement liés (par exemple les hydrates). L'un des inconvénients majeurs des jets supersoniques est leur incapacité à refroidir efficacement les grosses molécules ($m > 1000$), car le taux de collision décroît très vite et l'énergie interne initiale des molécules augmente avec leurs tailles.

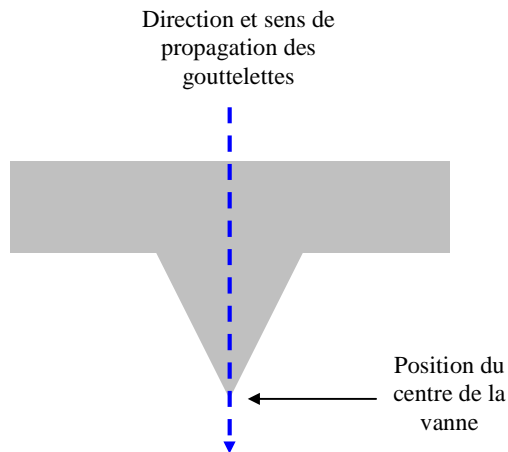


Figure 17: pièce métallique collée sur la vanne pour écorcer l'expansion isotrope du gaz pour ne pas dévier la trajectoire de la goutte avant la désorption laser.

Des premiers tests de faisabilité pour coupler la désorption laser avec le jet supersonique ont été faits à la fin de la thèse de J. C. Pouilly. Le problème principal vient du fait que la trajectoire de la goutte ne doit pas être perturbée par l'expansion du gaz afin de s'assurer que le pointé de la goutte ne bouge pas pour avoir une interaction avec le laser de désorption efficace. Si l'ouverture de la vanne s'effectue au moment où la goutte est dans l'axe du jet, la trajectoire de la goutte n'est pas perturbée au moment de la désorption. Mais les molécules désorbées seront entraînées par le front d'onde de la détente sans pouvoir « rentrer » dans le jet, là où les collisions sont les plus nombreuses. Si la vanne s'ouvre avant que la goutte soit sur l'axe du jet, les gouttes seront déviées par l'onde de choc.

Dans ces conditions, l'entraînement des molécules désorbées ne sera pas efficace et le refroidissement encore moins. Afin de palier à ce problème, il faut écranter l'expansion isotrope du gaz suivant la direction de propagation de la goutte, c'est-à-dire perpendiculairement à l'axe du jet. Des premiers tests ont été faits en collant une pièce triangulaire à la sortie de la tuyère (Figure 17) qui permet d'écorcer le jet et en regardant à la caméra la trajectoire de la goutte. Dans ces conditions, la goutte n'est quasiment pas déviée et la désorption laser peut avoir lieu juste devant la tuyère, là où l'entraînement et le nombre de collisions seront optimum. Le fait d'écorcer le jet risque de perturber la détente adiabatique et diminuer l'efficacité de refroidissement. Dans les expériences de désorption laser sur barreau métallique, faites par exemple dans le groupe de M. Duncan, le problème est le même puisque le barreau est adjacent à la tuyère et coupe le jet sur 180°. Néanmoins, des complexes ion-solvant avec ou sans atomes de gaz rare attachés à l'agrégat sont détectés,⁴⁶ ce qui prouve que

l'expansion est encore assez efficace dans ces conditions, même si, dans ce cas, les molécules étudiées sont de petites tailles.

6.2 Trappe à ions quadripolaire (Trappe de Paul)

Un autre développement envisagé pour cette nouvelle expérience est de guider par des lentilles électrostatiques pulsées les ions dans un piège de Paul (Jordan Inc). Le piège sera localisé juste avant la zone d'extraction du spectromètre de masse à temps de vol, ce qui permettra d'extraire des paquets d'ions bien définis spatialement et temporellement et d'obtenir ainsi une meilleure résolution en masse dans le spectromètre de masse à temps de vol.

L'autre avantage de l'utilisation d'un piège est la possibilité de contrôler et définir la température des ions piégés en le couplant avec un cryostat dont on peut varier la température de 10 à 300 K. Cette technique permettra de stabiliser des complexes très faiblement liés, voire de solvater les biomolécules par des atomes de gaz rare (Ar, Xe) ou des molécules (H_2O , H_2), comme il a été montré dans les groupes de Wang (PNNL)⁴⁷ et M.A. Johnson (Yale University) sur des peptides protonés.⁴⁸⁻⁵⁰

De plus, un tel refroidissement des ions biomoléculaires est particulièrement intéressant pour les applications de spectroscopie laser. La faible énergie de liaison de ces complexes permet de réaliser une spectroscopie de photodissociation IR à un photon (méthode dite du « messenger ») avec des lasers affinés OPO et ne nécessite donc plus l'utilisation de laser à électron libre (CLIO à Orsay). De plus, l'hétérogénéité conformationnelle des biomolécules est réduite, la résolution spectrale est de l'ordre du cm^{-1} , ce qui permet d'enregistrer les spectres d'excitation électronique et vibrationnelle de chaque conformère. Le groupe de T. Rizzo (EPFL, Lausanne) a, le premier, démontré les grandes potentialités de ce type d'étude sur des systèmes simples^{51,52} ou des peptides contenant une dizaine d'acides aminés^{53,54} et a clairement ouvert la voie aux développements de ce type d'étude sur le plan international.

7. Conclusion

Cette nouvelle technique combine les avantages des méthodes ESI et MALDI sans avoir leurs inconvénients pour les méthodes expérimentales envisagées ici. En ESI, les ions sont formés, avec une bonne efficacité, directement à partir d'une solution diluée et sortent désolvatés, multichargés et généralement non fragmentés. Tous ces avantages sont conservés dans la présente technique qui, de plus, permet de faire fonctionner l'expérience en régime pulsé, comme en MALDI, ce qui est bien adapté aux techniques très sensibles de spectrométrie de masse par temps de vol et de spectroscopie avec des lasers impulsionnels. Un autre avantage, par rapport au MALDI, est que la cible de désorption (la gouttelette) est constamment renouvelée et sa petite taille (50 μm) est bien adaptée à celle du laser de désorption focalisé. Cela permet d'envisager des méthodes spectroscopiques nécessitant l'acquisition de milliers de spectres de masse, sans avoir de problème de stabilité de signal tout en ne consommant que de très faibles quantités de produit (10 000 gouttelettes représentent moins d'1 μl de solution). De plus, la désorption laser est réalisée directement sous vide, à l'inverse de l'électrospray qui nécessite des optiques électrostatiques et des vides différentiels pour acheminer les ions de la pression atmosphérique vers le spectromètre de masse. On peut donc espérer que les molécules et surtout les complexes non-covalents initialement formés en solution ne seront pas trop activés lors de la mise en phase gazeuse.

Une autre possibilité de cette source est de pouvoir entraîner les molécules désorbées dans un jet supersonique. Dans ce cas, il sera alors possible d'étudier les espèces neutres ce qui n'est pas possible avec un ESI. Les sources actuelles de mise en phase gazeuse de molécules neutres (chauffage, désorption laser sur matrice) nécessitent de grandes quantités de produits (plusieurs centaines de mg), interdisant l'étude de systèmes pertinents pour la biologie. Il faut néanmoins démontrer la faisabilité de l'expérience, avoir une densité de molécules neutresensemencées dans le jet suffisante pour qu'elles soient ionisées par laser et détectées par spectrométrie de masse. Finalement, il est prévu de transférer les molécules désorbées dans un piège à ions quadripolaire. Ceci permettra un confinement spatial et temporel optimum nécessaire pour améliorer la résolution en masse et permettre des études par spectroscopie laser.

Références

1. Morgner, N., Barth, H. D. & Brutschy, B. A new way to detect noncovalently bonded complexes of biomolecules from liquid micro-droplets by laser mass spectrometry. *Australian Journal of Chemistry* **59**, 109-114 (2006).
2. Kohno, J., Toyama, N. & Kondow, T. Ion formation to the gas phase by laser ablation on a droplet beam. *Chem. Phys. Lett* **420**, 146-150 (2006).
3. Tanaka, K. The origin of macromolecule ionization by laser irradiation (Nobel lecture). *Angewandte Chemie-International Edition* **42**, 3860-3870 (2003).
4. Karas, M. & Hillenkamp, F. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 Daltons. *Analytical Chemistry* **60**, 2299-2301 (1988).
5. Knochenmuss, R. & Zenobi, R. MALDI ionization: The role of in-plume processes. *Chemical Reviews* **103**, 441-452 (2003).
6. Georgiou, S. & Koubenakis, A. Laser-induced material ejection from model molecular solids and liquids: Mechanisms, implications, and applications. *Chemical Reviews* **103**, 349-393 (2003).
7. Quist, A. P., Huthfahre, T. & Sundqvist, B. U. R. Total Yield Measurements in Matrix-Assisted Laser-Desorption Using a Quartz-Crystal Microbalance. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **8**, 149-154 (1994).
8. Stevenson, E., Breuker, K. & Zenobi, R. Internal energies of analyte ions generated from different matrix-assisted laser desorption/ionization matrices. *Journal of Mass Spectrometry* **35**, 1035-1041 (2000).
9. Madler, S., Erba, E. B. & Zenobi, R. in *Applications of Maldi-Tof Spectroscopy* 1-36 (SPRINGER-VERLAG BERLIN, Berlin, 2013).
10. Bolbach, G. Matrix-assisted laser desorption/ionization analysis of non-covalent complexes: Fundamentals and applications. *Current Pharmaceutical Design* **11**, 2535-2557 (2005).
11. Terrier, P., Tortajada, J., Zin, G. & Buchmann, W. Noncovalent complexes between DNA and basic polypeptides or polyamines by MALDI-TOF. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **18**, 1977-1989 (2007).
12. Nir, E., Grace, L., Brauer, B. & de Vries, M. S. REMPI spectroscopy of jet-cooled guanine. *Journal of the American Chemical Society* **121**, 4896-4897 (1999).
13. Piuze, F., Dimicoli, I., Mons, M., Tardivel, B. & Zhao, Q. C. A simple laser vaporization source for thermally fragile molecules coupled to a supersonic expansion: application to the spectroscopy of tryptophan. *Chemical Physics Letters* **320**, 282-288 (2000).
14. Kirpekar, F., Berkenkamp, S. & Hillenkamp, F. Detection of double-stranded DNA by IR- and UV-MALDI mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **71**, 2334-2339 (1999).
15. Kleinekofort, W., Avdiev, J. & Brutschy, B. A new method of laser desorption mass spectrometry for the study of biological macromolecules. *International journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **152**, 135-142 (1996).
16. Wattenberg, A., Sobott, F., Barth, H.-D. & Brutschy, B. Laser desorption mass spectrometry on liquid beams. *Eur. Mass Spectrom* **85**, 71-76 (1999).
17. Kondow, T. & Mafune, F. Structures and dynamics of molecules on liquid beam surfaces. *Annual Review of Physical Chemistry* **51**, 731-761 (2000).
18. Mafune, F., Takeda, Y., Nagata, T. & Kondow, T. Formation and Ejection of Cluster Ions from a Liquid Beam of Aniline Ethanol Solution by Laser Photoionization. *Chemical Physics Letters* **199**, 615-620 (1992).
19. Kleinekofort, W., Pfenninger, A., Plomer, T., Griesinger, C. & Brutschy, B. Observation of noncovalent complexes using laser-induced liquid beam

- ionization/desorption. *International journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **156**, 195-202 (1996).
20. Mafune, F., Kohno, J., Nagata, T. & Kondow, T. Mechanism of Ion Ejection from a Liquid Beam Following Laser Photoionization. *Chemical Physics Letters* **218**, 7-12 (1994).
 21. Sobott, F., Kleinekofort, W. & Brutschy, B. Cation selectivity of natural and synthetic ionophores probed with laser-induced liquid beam mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **69**, 3587-3594 (1997).
 22. Horimoto, N., Kohno, J., Mafune, F. & Kondow, T. Ejection mechanism of molecules and neutral clusters from liquid beam under irradiation of IR laser. *Chemical Physics Letters* **318**, 536-542 (2000).
 23. Abel, B. et al. Applications, Features, and Mechanistic aspects of liquid water beam desorption mass spectrometry. *International journal of Mass Spectrometry* **243**, 177-188 (2005).
 24. Charvat, A. & Abel, B. How to make big molecules fly out of liquid water: applications, features and physics of laser assisted liquid phase dispersion mass spectrometry. *Physical Chemistry Chemical Physics* **9**, 3335-3360 (2007).
 25. Kleinekofort, W., Schweitzer, M., Engels, J. W. & Brutschy, B. Analysis of double-stranded oligonucleotides by laser-induced liquid beam mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **163**, L1-L4 (1997).
 26. Wattenberg, A., Sobott, F., Barth, H. D. & Brutschy, B. Studying noncovalent protein complexes in aqueous solution with laser desorption mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* **203**, 49-57 (2000).
 27. Hoffmann, J., Schmidt, T. L., Heckel, A. & Brutschy, B. Probing the limits of liquid droplet laser desorption mass spectrometry in the analysis of oligonucleotides and nucleic acids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **23**, 2176-2180 (2009).
 28. Rapp, E. et al. Atmospheric Pressure Free Liquid Infrared MALDI Mass Spectrometry: Toward a combined ESI/MALDI-Liquid Chromatography Interface. *Analytical Chemistry* **81**, 443-452 (2009).
 29. Hoffman, J. et al. Studying the stoichiometries of membrane proteins by mass spectrometry: microbial rhodopsins and a potassium ion channel. *Physical Chemistry Chemical Physics* **12**, 3480-3485 (2010).
 30. Morgner, N., Klainschroth, T., Barth, H.-D., Ludwig, B. & Brutschy, B. A Novel approach to analyse membrane Proteins by Laser Mass Spectrometry: From Protein Subunits to the Integral Complex. *J. Am. Soc. Mass Spectrom* **18**, 1429-1438 (2007).
 31. Mager, F., Sokolova, L., Lintzel, J., Brutschy, B. & Nussberger, S. LILBID-mass spectrometry of the mitochondrial preprotein translocase TOM. *Journal of Physics-Condensed Matter* **22** (2010).
 32. Morgner, N. et al. Bindings Sites of the Viral RNA Element TAR and of TAR Mutants for Various Peptide Ligands, Probed with LILBID: A New Laser Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom* **19**, 1600-1611 (2008).
 33. Zilch, L. W., Maze, J. T., Smith, J. W. & Jarrold, M. F. Freezing, fragmentation, and charge separation in sonic sprayed water droplets. *International Journal of Mass Spectrometry* **283**, 191-199 (2009).
 34. Focsa, C. et al. Wavelength-selective vibrationally excited photodesorption with tunable IR sources. *Journal of Physics-Condensed Matter* **18**, S1357-S1387 (2006).
 35. Zhou, J., Ens, W., Standing, K. G. & Verentchikov, A. Kinetic-Energy Measurements of Molecular-Ions Ejected into an Electric-Field by Matrix-Assisted Laser Desorption. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **6**, 671-678 (1992).

36. Gluckmann, M. & Karas, M. The Initial Ion Velocity and Its Dependence on Matrix, Analyte and Preparation Method in Ultraviolet Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization. *Journal of Mass Spectrometry* **34**, 467-477 (1999).
37. Brown, R. S. & Lennon, J. J. Mass Resolution Improvement by Incorporation of Pulsed Ion Extraction in a Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization Linear Time-of-Flight Mass-Spectrometer. *Analytical Chemistry* **67**, 1998-2003 (1995).
38. Vestal, M. & Juhazz, P. Resolution and Mass Accuracy in Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight. *J. Am. Soc. Mass Spectrom* **9**, 892-911 (1998).
39. Mineo, P., Vitalini, D., Scamporrino, E., Bazzano, S. & Alicata, R. Effect of delay time and grid voltage changes on the average molecular mass of polydisperse polymers and polymeric blends determined by delayed extraction matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **19**, 2773-2779 (2005).
40. Juhasz, P. et al. Applications of Delayed Extraction Matrix- Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry to Oligonucleotid Analysis. *Anal. Chem* **68**, 941-946 (1996).
41. Dahl, D. A. SIMION for the personal computer in reflection. *International journal of Mass Spectrometry* **200**, 3-25 (2000).
42. Pouilly, J. C. et al. Combining ion mobility mass spectrometry and infrared multiphoton dissociation spectroscopy to probe the structure of gas-phase vancomycin-Ac(2)(L)K(D)A(D)A non-covalent complex. *International Journal of Mass Spectrometry* **297**, 28-35 (2010).
43. Pouilly, J. C. et al. Probing the specific interactions and structures of gas-phase vancomycin antibiotics with cell-wall precursor through IRMPD spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics* **12**, 3606-3615 (2010).
44. Even, U., Jortner, J., Noy, D., Lavie, N. & Cossart-Magos, C. Cooling of large molecules below 1 K and He clusters formation. *Journal of Chemical Physics* **112**, 8068-8071 (2000).
45. Schermann, J. P. *Spectroscopy and Modelling of Biomolecular Building Blocks* (Elsevier, Amsterdam, 2008).
46. Gregoire, G., Brinkmann, N. R., van Heijnsbergen, D., Schaefer, H. F. & Duncan, M. A. Infrared photodissociation spectroscopy of Mg+(CO₂)(n) and Mg+(CO₂)(n)Ar clusters. *Journal of Physical Chemistry A* **107**, 218-227 (2003).
47. Wang, X. B. & Wang, L. S. *Rev. Sci. Instrum.* **79**, 073108 (2008).
48. Kamrath, M. Z. et al. Vibrational Characterization of Simple Peptides Using Cryogenic Infrared Photodissociation of H(2)-Tagged, Mass-Selected Ions. *Journal of the American Chemical Society* **133**, 6440-6448 (2011).
49. Garand, E. et al. Determination of Noncovalent Docking by Infrared Spectroscopy of Cold Gas-Phase Complexes. *Science* **335**, 694-698 (2012).
50. Leavitt, C. M. et al. Isomer-Specific IR-IR Double. Resonance Spectroscopy of D-2-Tagged Protonated Dipeptides Prepared in a Cryogenic Ion Trap. *Journal of Physical Chemistry Letters* **3**, 1099-1105 (2012).
51. Stearns, J. A., Boyarkin, O. V. & Rizzo, T. R. Spectroscopic signatures of gas-phase helices: Ac-Phe-(Ala)(5)-Lys-H⁺ and Ac-Phe-(Ala)(10)-Lys-H⁺. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 13820-+ (2007).
52. Boyarkin, O. V., Mercier, S. R., Kamariotis, A. & Rizzo, T. R. Electronic spectroscopy of cold, protonated tryptophan and tyrosine. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 2816-2817 (2006).

53. Stearns, J. A., Guidi, M., Boyarkin, O. V. & Rizzo, T. R. Conformation-specific infrared and ultraviolet spectroscopy of tyrosine-based protonated dipeptides. *Journal of Chemical Physics* **127** (2007).
54. Nagornova, N. S., Rizzo, T. R. & Boyarkin, O. V. Highly Resolved Spectra of Gas-Phase Gramicidin S: A Benchmark for Peptide Structure Calculations. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 4040-+ (2010).

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Mon travail de thèse a porté sur l'étude des propriétés structurales de peptides de grandes tailles, contenant plusieurs centaines d'atomes, en phase gazeuse. Les études des systèmes biomoléculaires complexes posent de nouveaux challenges tant expérimentaux que théoriques. Nous avons proposé de coupler trois techniques expérimentales complémentaires, la spectroscopie IR, la spectrométrie de mobilité ionique et la fragmentation induite par capture électronique, pour caractériser la structure des biomolécules. L'analyse et l'interprétation des résultats expérimentaux ont nécessité un travail de simulation très important qui a constitué une grande partie de mon travail.

L'originalité de ce travail tient dans la combinaison de techniques expérimentales qui sont le plus souvent utilisées indépendamment les unes des autres. Chaque méthode peut, *a priori*, permettre d'étudier la structure de biomolécules en phase gazeuse et des changements conformationnels en fonction, par exemple, de la séquence peptidique ou de son état de charge. L'expérience de mobilité ionique donne accès aux paramètres structuraux globaux du système par la mesure de la section efficace de diffusion. En complément, la spectroscopie IR permet de sonder plus précisément les interactions (de type liaisons hydrogène) intra et inter moléculaires. Cette approche avait été validée sur l'étude de complexes de la vancomycine avec son récepteur membranaire lors de la thèse de J.C. Pouilly en 2009. La vancomycine est une molécule relativement rigide car cyclique, ce qui réduit grandement le nombre de conformations. Les peptides amyloïdes et les tryptophane zippers que j'ai étudiés sont, par contre, beaucoup plus flexibles et présentent un nombre croissant de structures compatibles avec les données de mobilité et de spectroscopie IR. Nous avons donc proposé d'utiliser la fragmentation induite par capture électronique (ECD) comme sonde locale des interactions entre les groupements protonés et les carbonyles des liaisons peptidiques.

L'ECD a historiquement été utilisée comme une méthode de fragmentation pour révéler la structure primaire des peptides. Comme cette technique repose sur la formation d'espèces radicalaires instables, il a été initialement suggéré que la fragmentation avait lieu avant redistribution complète de l'énergie. Suivant cette hypothèse, il est alors envisageable de corréler la distribution des fragments c/z avec la structure du peptide en moment de la

capture électronique. Plusieurs équipes de recherche ont ainsi essayé d'obtenir des informations structurales en analysant les spectres ECD, soit en partant de la structure native adoptée en phase liquide, soit par comparaison avec des recherches conformationnelles d'ions isolés en phase gazeuse. Pour notre part, nous sommes partis des structures issues de dynamiques moléculaires et sélectionnées par la mobilité ionique et spectroscopie IR pour valider l'analyse structurale des spectres ECD des peptides amyloïdes et des tryptophane zippers.

Nous avons constaté que la spectroscopie IRMPD sur des ions flexibles de grandes tailles, étudiés à température ambiante, ne semble pas être très discriminante en termes de structure. Les spectres expérimentaux sont peu résolus et les décalages spectraux entre les différentes séquences sont faibles. Les peptides n'adoptent pas de structures secondaires parfaites avec un seul type de séquences de liaisons hydrogène. De plus, les différences entre les spectres vibrationnels simulés sont faibles entre une structure globulaire et une structure étendue dans lesquelles il existe une diversité de liaisons C_7 , C_{10} ou C_{13} . En principe, l'expérience de mobilité ionique devrait être plus adaptée pour discriminer des structures secondaires différentes. Pratiquement, nous observons un pic principal de mobilité dont la largeur peut être plus grande que celle attendue pour une seule conformation. Il faut alors supposer que plusieurs structures, dont les différences de sections efficaces de diffusion sont inférieures à la résolution de l'expérience, sont présentes dans les conditions expérimentales. Nous avons aussi constaté que pour ces tailles de peptides (contenant 12 à 17 acides aminés), les sections efficaces de diffusion calculées pour des structures différentes pouvaient être assez proches, ce qui ne permet pas d'attribuer sans ambiguïté la structure des peptides.

D'une manière générale, l'apport des résultats de l'ECD s'est révélé très utile pour l'analyse structurale car la distribution d'intensité des fragments c/z peut présenter de grandes variations d'un système à l'autre et, sur un même système, en fonction de l'état de charge. Nous avons proposé une analyse très simple basée sur les interactions des groupements protonés avec les carbonyles pour induire la fragmentation de la liaison $N-C_\alpha$ adjacente. Cette analyse est directement tirée du modèle de Cornell dans lequel la capture électronique a lieu sur un groupement protoné NH_3^+ en interaction avec un carbonyle et suivi d'un transfert électron-proton conduisant à la rupture de la liaison $N-C_\alpha$. Cette approche reste compatible avec le modèle d'Utah-Washington dans lequel l'attachement électronique a lieu directement

sur le carbonyle, avec une stabilisation de l'orbitale π_{CO}^* par interaction avec une charge positive proche. Nous avons montré qu'il était possible de corrélérer la distribution d'intensité des ions c/z avec les interactions spécifiques des groupements ammonium sur les carbonyles le long de la séquence peptidique. Ces informations ne permettent pas de déterminer d'une manière univoque la structure adoptée par les peptides, mais apportent des données supplémentaires et complémentaires qui affinent l'attribution structurale basée sur les expériences de mobilité et de spectroscopie IR. L'un des objectifs dans le futur sera de valider sur des systèmes plus grands l'apport des études par capture électronique pour déterminer les structures des peptides multichargés.

Les deux peptides étudiés ont des caractéristiques structurales différentes. Les peptides tryptophane zippers forment des structures en feuillet β très stables en phase condensée et l'un des objectifs a été de savoir si ce type de structure était conservé en phase gazeuse. Dans les trois séquences étudiées TZ1, TZ4 et TZ4_{mod}, nous avons constaté que la structure native des tryptophane zippers n'était que partiellement conservée. La structure « idéale » en feuillet β a une énergie très élevée et donc une très faible probabilité d'être peuplée en phase gazeuse, même si les peptides adoptent plutôt une forme repliée dans laquelle on peut retrouver la formation d'un coude dans la partie centrale. D'après les études en phase condensée, il a été suggéré que des interactions de type stacking entre les résidus des tryptophanes stabilisent la forme en feuillet β . En phase gazeuse, nous n'avons pas constaté de différences significatives entre les structures adoptées par les peptides TZ4 et TZ4_{mod} où deux tryptophanes sont substitués par des alanines. L'étude du peptide A β ₁₂₋₂₈ est encore plus compliquée car il adopte différentes structures suivant la nature du solvant et le pH de la solution. Ce peptide a une plus forte probabilité de former une structure repliée et partiellement en feuillet β à pH neutre, alors qu'une forme hélicoïdale est favorisée à bas pH. Nous avons effectivement observé un changement de structure en fonction de l'état de protonation, avec un passage d'une forme repliée pour [A β ₁₂₋₂₈]²⁺ vers une structure étendue avec des motifs en hélice 3₁₀ et hélice α pour [A β ₁₂₋₂₈]³⁺. Il faut aussi noter que dans le cas de TZ1, nous avons observé un dépliement du peptide avec l'augmentation de l'état de charge, qui est relié aux effets de répulsion coulombienne entre les groupements protonés.

Les spectres de mobilité ionique, de spectroscopie IR et de fragmentation ECD ont été obtenus sur des montages expérimentaux indépendants. Dans les trois cas, une source de type électrospray est utilisée, mais il est difficile de contrôler les conditions de mise en phase gazeuse afin de s'assurer que les peptides adoptent toujours la même structure. Ceci est particulièrement important quand on cherche à savoir si la structure native du peptide est conservée lors de la désolvatation. L'un des objectifs pour le futur serait d'obtenir sur un même montage des informations structurales complémentaires. L'une des possibilités est de sélectionner par mobilité ionique les conformations des ions afin de simplifier les interprétations des études par spectroscopie laser (groupes de de T. Rizzo à Lausanne, de Ph. Dugourd à Lyon et Ph. Maitre à Orsay) ou ECD (groupe d'E. Williams à Berkeley).

Dans tous les cas, l'analyse des données expérimentales repose sur un travail de simulation important. Si les calculs de sections efficaces de diffusion peuvent être effectués sur des systèmes de grandes tailles, les simulations de spectres vibrationnels nécessitent un traitement quantique qui impose une limite en taille. Nous avons ainsi utilisé une méthode hybride chimie quantique/semi-empirique (QM/SE) afin d'interpréter les spectres IRMPD des peptides protonés. L'exploration de la surface de potentielle des systèmes moléculaires flexibles de grandes tailles pose un vrai challenge. Nous avons employé la dynamique moléculaire par échange de répliques (REMD) qui génère des milliers de conformations différentes. Ces calculs sont réalisés en utilisant le champ de force AMBER, qui présente l'avantage de permettre de propager les dynamiques pendant des temps relativement longs (plusieurs nanosecondes) avec des moyens de calcul modestes (1 semaine de temps de calcul avec un cpu). Mais les champs de force classiques ont été développés pour l'étude des systèmes biologiques de très grandes tailles en phase condensée et leur validité n'est pas bien établie pour la détermination des structures de peptides de tailles intermédiaires en phase gazeuse. Nous avons constaté des variations importantes des sections efficaces de diffusion calculées suivant la méthode de calcul pour les optimisations des structures entre AMBER et des méthodes *a priori* plus précises, semi-empirique AM1 ou de chimie quantique DFT. De plus, ces changements dépendent manifestement de la structure adoptée par le peptide, les formes repliées étant celles qui voient leurs sections efficaces de diffusion augmenter le plus, par rapport aux formes en feuillet β ou étendues. Il serait sans doute intéressant de pouvoir utiliser des champs de force polarisables (AMOEBA, par exemple) pour la dynamique moléculaire afin d'avoir une meilleure représentation des interactions électrostatiques pour

ces systèmes chargés. Le développement des dynamiques moléculaires biaisées est aussi potentiellement très prometteur afin de restreindre l'exploration de la surface de potentielle dans les régions où les molécules ont des sections efficaces de diffusion compatibles avec la mesure expérimentale.

J'ai également présenté un nouveau montage expérimental en cours de développement au laboratoire qui porte sur une désorption laser sur micro-gouttelettes liquides sous vide et détection des espèces ioniques par spectrométrie de masse à temps de vol. C'est une méthode de vaporisation originale qui peut servir d'alternative aux techniques couramment employées telles que l'ESI ou le MALDI. Avec cette source, on peut espérer que les molécules et surtout les complexes non-covalents initialement formés en solution ne seront pas trop activés lors de la mise en phase gazeuse et conserveront leur structure native. La source est maintenant opérationnelle mais il reste encore des améliorations à apporter au dispositif expérimental. Les ions sont émis avec une grande dispersion d'énergie cinétique qui dégrade la résolution en masse du spectromètre de masse à temps de vol. Nous proposons de transférer les ions issus de la désorption laser dans une trappe ionique quadripolaire. L'utilisation d'un piège à ions présente plusieurs avantages. Il permet de localiser spatialement et temporellement les ions et peut être inclus facilement au spectromètre de masse à temps de vol sans dégrader sa résolution. Deuxièmement, la trappe peut être refroidie à basses températures (~10 K) ce qui permettra de développer des applications de spectroscopie laser sur des ions froids pour étudier leur structure. Un deuxième développement portera sur le couplage de la désorption laser à un jet supersonique de gaz rare. La désorption laser peut en effet être effectuée juste à la sortie d'une vanne pulsée qui produit un jet supersonique de gaz rare capable d'entraîner et de refroidir les espèces désorbées. Un autre avantage de cette nouvelle source de mise en phase gazeuse est la possibilité d'étudier des espèces neutres libérées lors de la désorption laser et entraînées dans le jet.

Annexe

Dimère TZ4

Annexe : Dimère TZ4

1. Résultats de l'expérience de mobilité ionique

Les profils temporels de diffusion (ATD) des peptides $TZ4^{2+}$ et $[TZ4mod]^{2+}$ sont donnés sur la figure 1. On voit que le spectre de chaque séquence se compose de deux pics principaux bien distincts. La distribution isotopique des ions de $TZ4^{2+}$ et de $[TZ4mod]^{2+}$ en fonction du temps de diffusion dans la cellule de mobilité est aussi reportée. Pour chaque séquence, les deux pics de diffusion sont attribués aux monomère et dimère de TZ4 et TZ4mod. Les monomères ont été interprétés dans le chapitre IV. La détection des dimères a également été confirmée sur le montage expérimental de Polytechnique en 2013, mais nous n'avons pas pu enregistrer les spectres de fragmentation ECD car le signal était trop faible. Il faut rappeler que, à même concentration, le pic du dimère de TZ4 est plus intense que celui du TZ4mod.

Les profils temporels des ions dimères sont reportés sur la figure 2. La section efficace de diffusion du dimère de TZ4 quatre fois protoné est de $592 \text{ \AA}^2 \pm 8 \text{ \AA}^2$, celle du dimère de TZ4mod est de $560 \text{ \AA}^2 \pm 8 \text{ \AA}^2$. La section efficace de diffusion du dimère de TZ4 est plus grande que celle du TZ4mod. La diminution de la section efficace de diffusion du dimère de TZ4mod par rapport à TZ4 est de 6%, alors qu'elle était de 9 % pour les monomères. Les parties grisées représentent les simulations du profil temporel de diffusion pour une seule conformation dont la section efficace est centrée sur le maximum du pic principal. La largeur à mi-hauteur expérimentale est similaire à celle calculée pour une conformation unique. Ceci suggère qu'une seule, ou un nombre limité de conformations dont les sections efficaces de diffusion sont similaires, est peuplée dans ces conditions expérimentales.

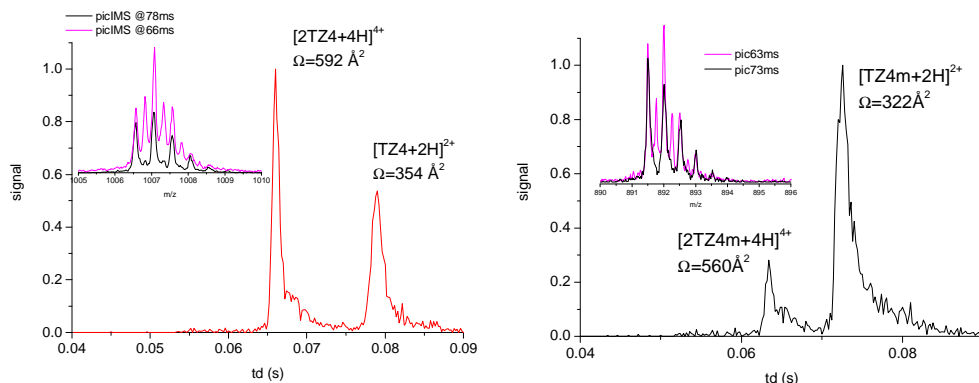


Figure 1: Profil temporel des pics de diffusion et distribution isotopique des ions correspondant à la masse m/z de $TZ4^{2+}$ (à gauche) et $[TZ4mod]^{2+}$ (à droite).

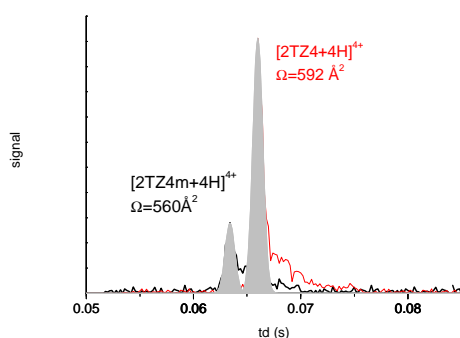


Figure 2: Profil temporel de diffusion (s) des ions dimère de $[2TZ4+4H]^{4+}$ (en trait rouge) et $[2TZ4mod+4H]^{4+}$ (en trait noir).

2. Calculs des sections efficaces de diffusion

Trois dynamiques moléculaires par échange de répliques (REMD) ont été lancées pour obtenir le plus grand nombre de conformations possibles du dimère de TZ4. Elles sont initiées en partant des trois conformations différentes présentées schématiquement sur la figure 4. Pour chaque conformère, TZ4 a une structure en zipper, mais les structures des dimères sont différentes. Dans la conformation 1, les deux monomères forment un feuillet β parallèle alors que dans la conformation 2, ils sont orientés de manière antiparallèle. Pour la conformation 3, les deux monomères sont en orientation antiparallèle mais partiellement dissociés. Chaque simulation donne environ 2000 conformères de dimère stable et moins de 10 % sont dissociés.

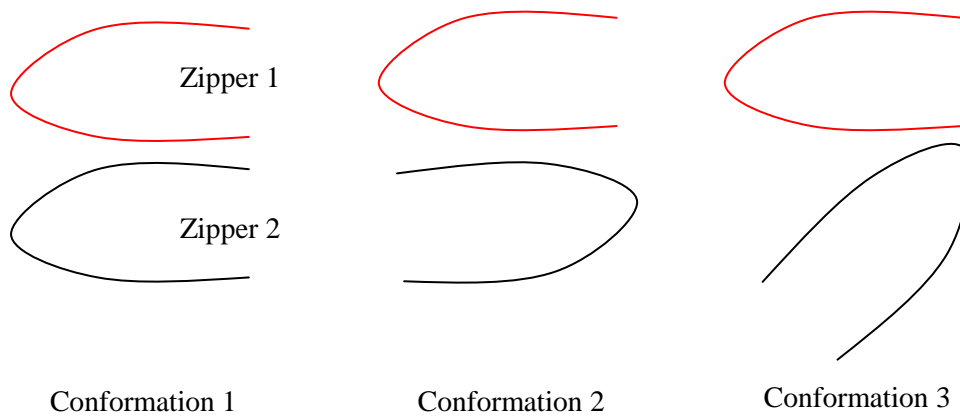


Figure 4: Les trois conformations initiales pour la dynamique moléculaire

Les familles de structures obtenues par les trois dynamiques sont données dans les tableaux 1, 2, 3. Les conformations sont regroupées en cinq grands groupes :

- Les structures « A » désignent un dimère en feuillet β antiparallèle,
- Les structures « O » dont les deux monomères sont en zipper et le dimère est ouvert,
- Les structures « F » pour lesquelles le dimère adopte une forme globulaire repliée,
- Les structures « ZF » où l'un des TZ4 est en zipper et l'autre est replié,
- Les structures « E » où les deux monomères sont en conformations étendues.

Tableau 1: Sections efficaces de diffusion (CCS) et énergies relatives (ΔE) des structures des dimères de TZ4 générées à partir de la conformation initiale 1.

Conformation	ΔE (kcal/mol)		CCS (\AA^2)
	min	max	
AntiParallèle			
A1	39	45	600
A2	19	28	606
A3	45	51	615
A4	29	33	617
Ouvert			
O1	18	22	602
O2	23	45	619
O3	18	23	624
O4	17	23	648
O5	27	49	652
Replié-Replié			
F1	0	5	613

Tableau 2: Sections efficaces de diffusion (CCS) et énergies relatives (ΔE) des structures des dimères de TZ4 générées à partir de la conformation initiale 2.

Conformation	ΔE (kcal/mol)		CCS (\AA^2)
	min	max	
AntiParallèle			
A5	43	49	592
A6	52	58	596
A7	49	63	605
A8	50	54	616
A9	50	63	645
Ouvert			
O6	45	65	614
O7	49	63	615
O8	38	64	656
Zipper- Repliée			
ZF1	25	33	617
ZF2	30	39	663
Etendue-Etendue			
E1	18	19	668

Tableau 3: Sections efficaces de diffusion (CCS) et énergies relatives (ΔE) des structures des dimères de TZ4 générées à partir de la conformation initiale 3.

Conformation	ΔE (kcal/mol)		CCS (\AA^2)
	min	max	
Ouvert			
O9	37	39	640
O10	32	35	641
O11	37	39	656
Zipper - Repliée			
ZF3	16	32	639
Etendue-Etendue			
E2	0	0	647

La première remarque importante est qu'il n'existe pas de conformation de basse énergie de type zipper-zipper parallèle même si la simulation est effectuée en partant de la conformation initiale 1. Les structures zipper-zipper « antiparallèles » ne sont générées que par les simulations en partant des conformations initiales 1 ou 2. La dynamique à partir de la conformation 3 ne donne pas ce type de structure. Les trois dynamiques permettent de générer les autres types de structures. En moyenne, les structures zipper-zipper (antiparallèle et ouvert) sont hautes en énergie, alors que les structures étendue-étendue et replié-repliée sont plus stables. Peu de conformations ont une section efficace de diffusion compatible avec l'expérience. Les sections efficaces calculées des structures sélectionnées sont comprises entre 592 \AA^2 et 668 \AA^2 , alors que la valeur expérimentale est de $592 \pm 8 \text{ \AA}^2$.

Les structures en feuillet β antiparallèle A1, A2, A5, A6 et A7 sont celles qui ont une section efficace de diffusion la plus petite (inférieure à 606 \AA^2) et la plus proche de la valeur expérimentale. Les structures ouvertes O1, O2, O6 et O7 ont en moyenne une section efficace de diffusion légèrement plus grande (inférieure à 619 \AA^2) de même qu'un seul conformère globulaire (F1), ce qui reste compatible avec l'expérience. Par contre, on peut exclure les structures étendues E et mixte zipper-repliées ZF qui ont en moyenne une section efficace trop grande.

En moyenne la section efficace de diffusion des structures dimère peut être arrangée en l'ordre suivant : $\Omega_A < \Omega_F < \Omega_O < \Omega_{ZF} < \Omega_E$. Les différentes structures sont présentées sur la figure 5, 6, 7 ci-dessous, pour les structures des tableaux 1, 2, 3, respectivement.

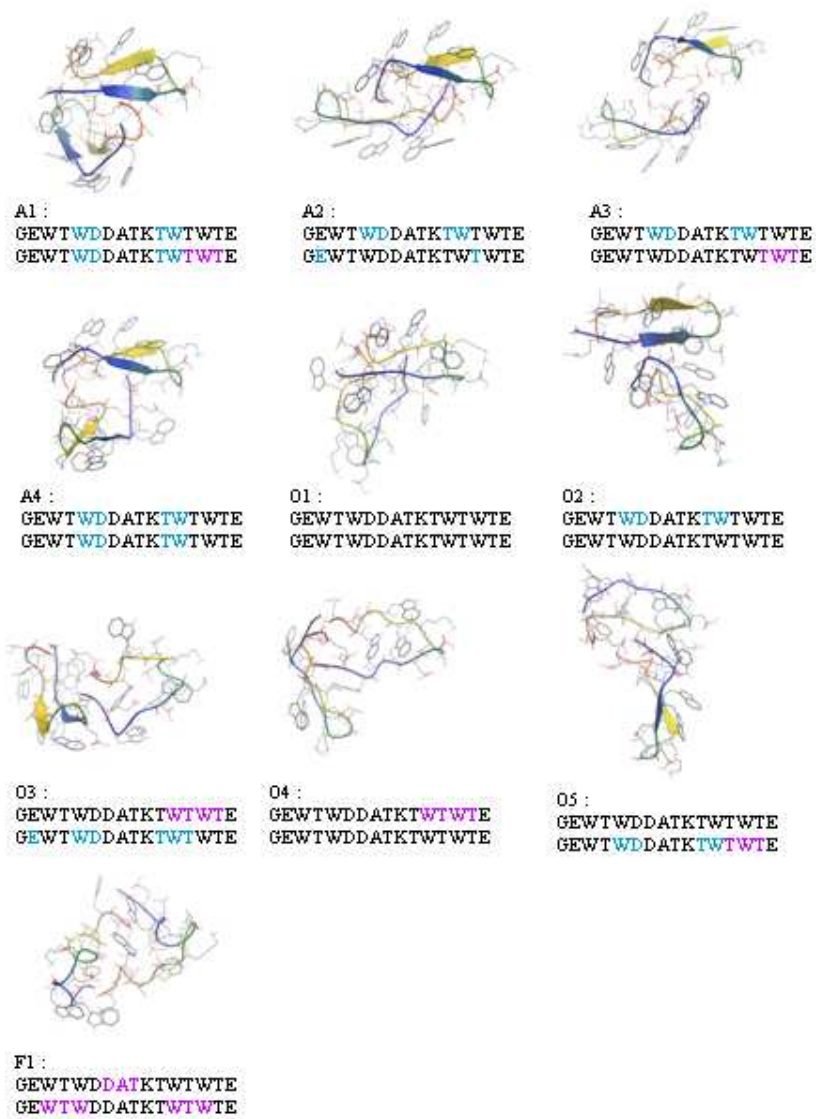


Figure 5 : Structures de dimères générées en partant de la conformation 1 (tableau 1). Les parties en feuillet β sont représentées en lettres vertes, les hélices 3_{10} en lettres violettes.

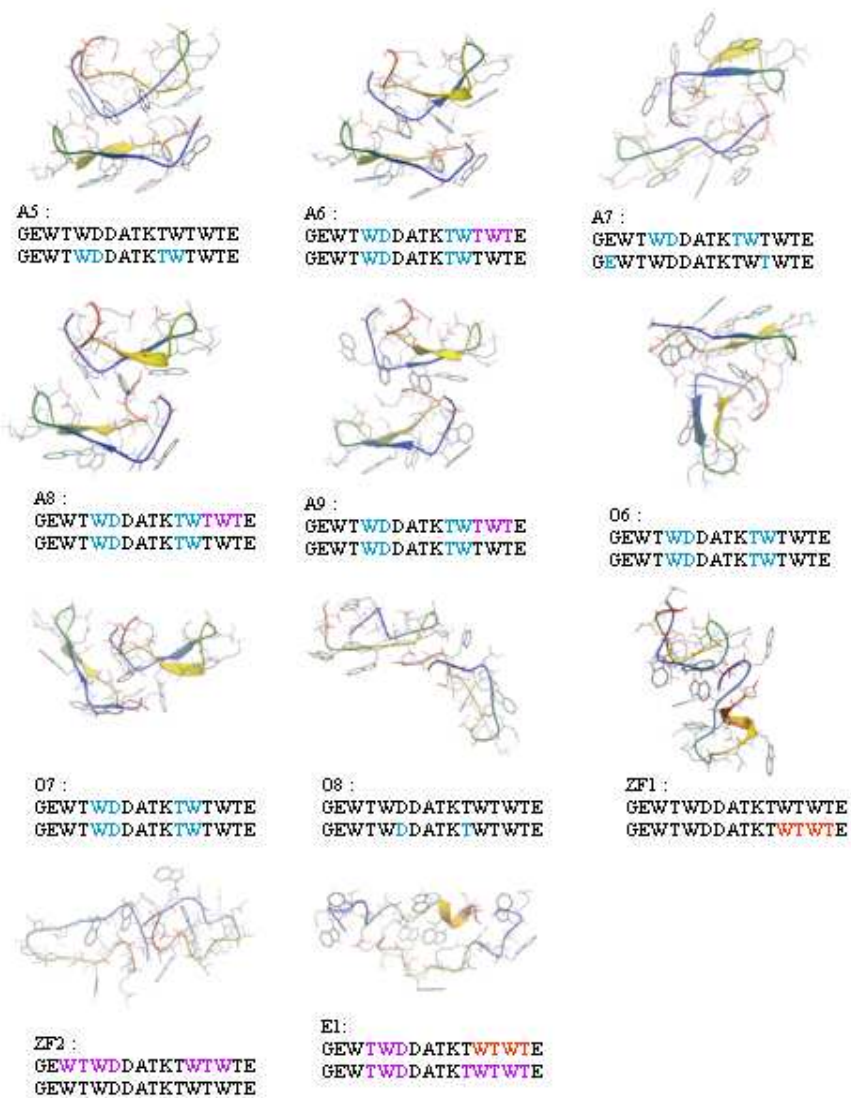


Figure 6: Structures de dimères générées en partant de la conformation 2 (tableau 2). Les parties en feuillet β sont représentées en lettres vertes, les hélices α en lettres rouges et les hélices 3_{10} en lettres violettes.

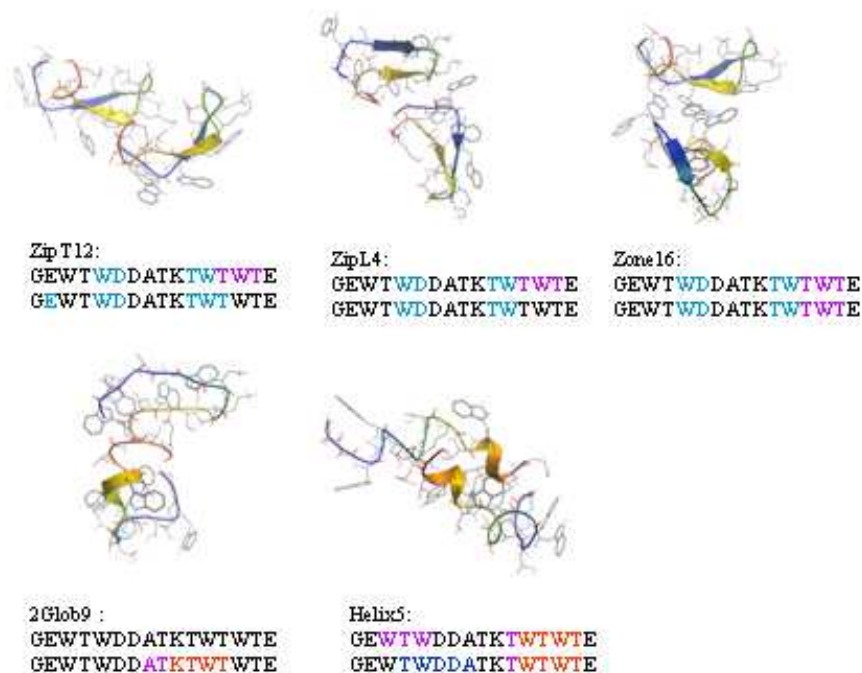


Figure 7: Structures de dimères générées en partant de la conformation 3 (tableau 3). Les parties en feuillet β sont représentées en lettres vertes, les hélices α en lettres rouges et les hélices 3_{10} en lettres violettes.

3. Conclusion

J'ai présenté une analyse préliminaire des structures possibles du dimère de TZ4. Plusieurs dynamiques moléculaires par échange de répliques ont été effectuées. Peu de structures ont une section efficace de diffusion compatible avec la mesure expérimentale. Les conformations formant un feuillet β antiparallèle, dans lesquelles la structure native en zipper du monomère est conservée, donnent le meilleur accord avec l'expérience. Il est important de rappeler que la structure native en zipper n'est pas totalement conservée dans le monomère qui adopte plutôt une structure repliée, avec préservation du coude au centre de la séquence peptidique. Par contre, la détection de dimères avec une grande intensité pour TZ4, plus faible pour TZ4mod et nulle pour TZ1 semble être corrélée avec la plus grande stabilité de la forme en zipper pour le premier. On peut noter que la préservation de la structure native du peptide dans le dimère en phase gazeuse engendre des conformations hautes en énergie.

Title:

Gas-phase structures of large biomolecules investigated through IRMPD spectroscopy, Ion Mobility Spectrometry and Electron Capture Dissociation

Abstract:

Gas-phase studies of large biological molecules have emerged with the advent of soft production methods of biomolecular ions under vacuum (like ESI or MALDI) combined to mass spectrometry. The first aim of this work was to use three complementary experimental techniques, namely IRMPD spectroscopy, ion mobility mass spectrometry and electron capture dissociation ECD to probe the gas-phase structures of amyloid A β_{12-28} and tryptophan zippers TZ1 and TZ4 peptides. The main originality of this study is to analyse the specific c/z product ion abundances in ECD experiments with the structural information gained through IR spectroscopy and ion mobility experiments. With this complementary approach, we were able to assign the most probable gas-phase structures of these flexible peptides. In particular, it is shown that the native structure of the peptides is not conserved in the gas phase. This study relies on the interplay between experiments and theoretical calculations. To that end, we used several theoretical methods, ranging for molecular dynamics using a classical force field (AMBER) to quantum mechanics calculations to simulate the vibrational spectra of the peptides.

The second aim of this work was to design, develop and optimize a unique device, coupling a novel source introducing biomolecules in the gas phase, based on laser desorption from liquid micro-droplets directly into vacuum, coupled with a time-of-flight mass spectrometer. This desorption source is an original alternative to the usual methods (ESI or MALDI). Through mass spectrometry techniques, it should allow investigating the complexation processes of non-covalently bound species in conditions as close as the ones encountered in solution. We have recently obtained the first mass spectra. Due to the high velocity spread of the desorbed ions, new developments are needed to improve the mass resolution. In particular, we plan to transfer the ions in a quadrupole ion trap and to perform the laser desorption in front a pulsed valve to stream the ions in the supersonic expansion.

Key words:

Amyloid peptide, Tryptophane zipper peptide, Gas phase structure, ECD, Ion Mobility, IRMPD, Droplet,

RÉSUMÉ en français

Cette thèse présente une étude expérimentale et théorique de peptides protonés contenant plusieurs dizaines d'atomes en phase gazeuse. Le premier objectif de ce travail consistait à coupler trois techniques expérimentales complémentaires, la spectroscopie IRMPD, la spectrométrie de mobilité ionique et la dissociation induite par attachement d'électron (ECD), afin de caractériser la structure des peptides amyloïdes A β ₁₂₋₂₈ et de tryptophane zippers TZ1 et TZ4. L'originalité de cette étude porte sur l'analyse de la distribution d'intensité des fragments c/z obtenus en ECD en relation avec les informations structurelles obtenues par mobilité et IRMPD. Grâce à cette approche combinée, nous avons pu proposer les structures les plus probables adoptées en phase gazeuse par ces peptides flexibles. Nous avons montré que la structure native des peptides n'était pas conservée au passage en phase gazeuse. L'interprétation des données expérimentales repose sur un travail théorique important alliant des dynamiques moléculaires utilisant un champ de force AMBER aux méthodes de chimie quantique au niveau DFT pour simuler les spectres vibrationnels des peptides.

Le second axe de ce travail a porté sur la conception, la réalisation et la caractérisation d'une nouvelle technique de mise en phase gazeuse de biomolécules et leurs complexes non-covalents par désorption laser IR sur une micro-gouttelette liquide directement sous vide. Cette technique originale pourrait être une alternative aux techniques ESI et MALDI. Nous avons obtenu les premiers spectres de masse et optimisé les paramètres importants de l'expérience : longueur d'onde, intensité laser, résolution en masse du spectromètre à temps de vol. D'autres développements sont en cours pour améliorer la détection et la résolution en masse de ce type de source qui produit des ions avec une grande dispersion en énergie cinétique : piéger les ions dans une trappe quadrupolaire et entraîner les ions dans une détente supersonique.

TITRE en français:

Étude structurale de biomolécules de grandes tailles en phase gazeuse par spectroscopie infrarouge, spectrométrie de mobilité ionique et dissociation induite par attachement d'électron

DISCIPLINE: Physique

MOTS-CLÉS:

Peptide, Amyloïde, Tryptophane zipper, Structure secondaire, Phase gazeuse, ECD, Mobilité ionique, IRMPD, Gouttelette.

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Laboratoire de physique des lasers
99 avenue Jean-Baptiste Clément
93420 Villetaneuse