



Université Paris 13

Institut Galilée

Laboratoire de Physique des Lasers

Thèse présentée par

Serge-Daniel Leite

pour obtenir le grade de

Docteur en Physique de l'Université Paris 13

Sujet de la thèse :

**Effets des rayonnements ionisants sur des
biomolécules en solution : vers une caractérisation
des dommages à l'échelle moléculaire**

M. Debora Scuderi	rapportrice
M. Serge Martin	rapporteur
M. Alicja Domoracka	Examinatrice
M. Luc Museur	Examineur

M. Bruno Manil	Directeur de thèse
M. Nicolas Nieuwjaer	Encadrant



Université Paris 13

Institut Galilée

Laboratoire de Physique des Lasers

Thèse présentée par

Serge-Daniel Leite

pour obtenir le grade de

Docteur en Physique de l'Université Paris 13

Sujet de la thèse :

**Effets des rayonnements ionisants sur des
biomolécules en solution : vers une caractérisation
des dommages à l'échelle moléculaire**

M. Debora Scuderi	rapportrice
M. Serge Martin	rapporteur
M. Alicja Domoracka	Examinatrice
M. Luc Museur	Examineur

M. Bruno Manil	Directeur de thèse
M. Nicolas Nieuwjaer	Encadrant

Remerciements

Ma thèse a été réalisée au Laboratoire de Physique des Laser dans l'équipe BioMolécules et Spectroscopie sous la direction de Bruno Manil que je tiens à remercier pour m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse. Merci d'avoir toujours été disponible pour répondre à mes questions malgré ton emploi du temps chargé et également toutes les discussions concernant les quelques moments de doutes traversés durant ces 4 années. Et bien sur, je n'oublierai jamais le duo magique : *2048* et *alcool*, que tu m'as transmis à Toulon ...

Je tiens à remercier Luc Museur d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Je remercie également mes rapporteurs, Debora Scuderi et Serge Martin pour avoir lu et corrigé mon travail de thèse et Alicja Domoracka en tant qu'examinatrice.

Je remercie chaleureusement Nicolas Nieuwjaer et Frédéric Lecomte qui ont été mes encadrants tout au long de cette thèse. Merci à vous deux pour votre disponibilité, votre patience et vos conseils pour le développement de cette source. Votre bonne humeur et vos blagues subtiles (surtout celles de Fred) ont rendu mon quotidien plus agréable faces aux nombreuses difficultés rencontrées sur la source : OPO qui ne marche plus (on soupçonne fortement les châtaignes mangées par des petites bêtes ... n'est-ce pas Fred) ou encore le détecteur. Merci Nico de m'avoir encadré pour les TPs de mécanique vibratoire. Et je remercie également les autres membres de mon équipe : Charles, Gilles, Rolando et Ibtissem.

Je souhaite remercier également tous les autres membres du laboratoire qui ont participé, de près ou de loin, à ce travail de thèse. Tout d'abord, je remercie les membres des différents ateliers (mécanique, optique et informatique) et également le personnel administratif. Merci pour votre bonne humeur et surtout votre réactivité face à mes diverses demandes. Je remercie également Olivier Gorceix et Irène Bernand de m'avoir encadré à l'IUT de Saint-denis durant mes 3 premières années de thèse. Je tiens à remercier tout particulièrement les doctorants que j'ai rencontré durant cette thèse : Benoît, Mohamadou, Amine, Kader, Pauline, Larsen, Dany, Karim, Lat, etc. J'ai omis deux doctorants délibérément dans cette précédente liste car je doit leur accorder une place toute particulière : Thomas et Madhi. Merci à vous deux pour toutes ces pauses café et ces repas partagés. Comment oublier ton rire Thomas qui sûrement est le rire le plus discret et intelligent que je n'ai jamais entendu ... sans blague Thomas, consulte quelqu'un, ton rire est très étrange. Madi toi c'est pire, je ne comprendrai jamais pourquoi tu préfères les plages de galets aux plages de sable de fin ou encore la pluie au soleil .. toi aussi fais toi consulté ! D'ailleurs consulté ensemble peut-être qu'on vous fera un prix, à moins qu'il ne soit déjà trop tard. Bon j'arrête de vous vannez, vraiment un grand merci à vous deux et encore merci pour avoir filé un coup de main à mon beau-père pour le pot.

Enfin, je termine ces remerciements pour mes amies et ma famille. Un grand merci à Mohamed (pour les intimes : Fag) pour m'avoir changé les idées lors de moments de doutes, de m'avoir soutenu et surtout de m'avoir reboosté. Merci à Jennifer (pour les intimes : Sandrine ou BAE) de ta présence durant cette dernière année de thèse, de m'avoir communiquer de bonnes ondes (comme tu le dis si bien) et des quelques corrections orthographiques. Merci à ma soeur, mon beau-frère et mes nièces pour votre soutien. Et je finis par les deux personnes les plus importantes : ma mère et mon beau-père. Un énorme MERCI pour votre soutien sans relâche, de vos conseils et de vos encouragements.

Table des matières

Introduction	7
CHAPITRE 1 : Effets des rayonnements ionisants sur le vivant	13
1.1 Contexte scientifique	13
1.1.1 Radiothérapie	15
1.1.2 Pic de Bragg	16
1.1.3 Notions de radiobiologie	22
1.1.3.1 Dose équivalente	22
1.1.3.2 Dose efficace	23
1.2 Systèmes étudiés	25
1.2.1 La molécule d'ADN, base ADN, base ARN	25
1.2.2 Acides aminés, peptides et protéines	27
1.3 Conséquences des rayonnements ionisants sur l'ADN	30
1.3.1 Effets directs	30
1.3.2 Effets indirects : production d'espèces radicalaires	31
1.3.3 Chronologie des événements d'irradiation	32
1.3.4 Types de dégâts sur l'ADN	33
1.4 Expériences " <i>top-down</i> "	35
1.5 Expériences " <i>bottom-up</i> "	38
1.6 Alternative aux expériences " <i>top-down</i> " et " <i>bottom-up</i> "	42
CHAPITRE 2 : Mise en phase gazeuse de biomolécules	45
2.1 Les sources de mise en phase gazeuse classiques	46
2.1.1 Sublimation	46
2.1.2 Electrospray	47
2.1.3 Maldi	50
2.1.4 Désorption laser ultra-douce sur jet liquide sous vide	53
2.1.5 Synthèse des techniques décrites	54
2.2 Désorption laser ultra-douce sur micro-gouttelettes sous vide	55
2.2.1 Principe général de l'expérience	55
2.2.2 Le pompage différentiel	58
2.2.3 Génération de micro-gouttelettes	60
2.2.4 Méthode de visualisation	62
2.2.5 Transfert des micro-gouttelettes dans la chambre principale	67
2.2.6 Laser OPO	73
2.2.7 Explosion des gouttelettes	76
2.2.8 Synthèse	79

CHAPITRE 3 : Caractérisation de la source de micro-gouttelettes	83
3.1 Technique d'analyse	83
3.1.1 Aspects historique de la spectrométrie de masse	83
3.1.2 Spectrométrie de masse : aspects généraux	84
3.1.3 Principe de la spectrométrie de masse par temps de vol	85
3.1.3.1 Rélectron	86
3.1.3.2 Extraction retardée	88
3.1.3.3 TOF de notre dispositif expérimental	91
3.1.4 Détection : galette à microcanaux	93
3.2 Résultats expérimentaux et simulations avec le logiciel SIMION	94
3.2.1 SIMION 8.0	95
3.2.2 Géométrie du spectromètre de masse sous SIMION	96
3.2.3 Programme : extraction retardée	97
3.2.4 Spectres expérimentaux : vancomycine, bradykinine, complexe non-covalent, tryptophane zipper, nanoparticules d'or fonctionnalisées	100
3.2.4.1 bradykinine et vancomycine	100
3.2.4.2 Complexe non-covalent	105
3.2.4.3 Tryptophane zipper	107
3.2.4.4 Nanoparticules d'or fonctionnalisées	109
3.2.5 Simulation	110
3.3 Piège de Paul	125
3.3.1 Généralités sur le fonctionnement du piège	125
3.3.2 Mesure de la nouvelle résolution en masse	132
3.3.3 Vérification du fonctionnement du piège par simulation SIMION	135
3.4 Conclusion	139
CHAPITRE 4 : Etude de l'endommagement à l'échelle moléculaire	143
4.1 Irradiation de micro-gouttelettes sous vide par un faisceau d'ions.	143
4.2 Couplage de notre source de désorption à une source d'ions	146
4.2.1 Détails techniques de la plateforme d'irradiation	146
4.2.2 Couplage mécanique de la source d'ions à l'expérience	148
4.3 Effets directs	152
4.4 Conclusion	154
ANNEXE : Photofragmentation des 2-,3- et 4-Hydroxypyridine protoné	157
A - 1 Motivation du choix des systèmes étudiés	157
A - 2 Résultats expérimentaux	159
A - 2.1 Dispositif expérimental	159
A - 2.2 2-hydroxypyridine protonée : 2-HPH ⁺	160
A - 2.3 3-hydroxypyridine protonée : 3-HPH ⁺	162
A - 2.4 4-hydroxypyridine protonée : 4-HPH ⁺	164
A - 3 Interprétation des résultats à l'aide de calculs <i>ab initio</i>	165
A - 3.1 Méthodes de calcul	165
A - 3.2 Caractérisation des états excités	166
A - 3.3 Analyse Franck-Condon	169
Conclusion générale et perspectives	175
BIBLIOGRAPHIES	179

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

CLUPS : Centre Laser Université Paris Sud

SOBP : Spread-Out Bragg Peak

TLE : Transfert d'Energie Linéique

ONU : Organisation des Nations Unies

UNSCEAR : United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation

IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry

DMSO : Diméthylsulfoxyde

CSB : Cassure Simple Brin

CDB : Cassure Double Brin

AMP : Adénosine MonoPhosphate

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ESI : Electrospray

MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation

LILIBID : Laser Induced Liquid Bead Ionization/Desorption

ISMO : Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay

CCD : charge coupled device

OPO : Optical Parametric Oscillator

Nd YAG : Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet

TOF : Time-Of-Flight

MCP : MicorChannel Plate

RAM : Random Access Memories

IRMPD : Infrared multiphoton dissociation

ECD : Electron-capture dissociation

TZ4 : Tryptophane Zipper

M/Z : Mass / Charge

LMCO : Low Mass Cut-Off

SPMB : Spectroscopie Biomolécules et Milieux Biologiques

CSPBAT : Chimie, Structures, Propriétés de Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques

LVTS : Labotoy for Vacsular Translational Sicence

CIMAP : Centre de Recherche sur les Ions, les Matériaux et la Photonique

ECR : Electron Cyclotron Resonance

MADIR : MATériaux, Défauts, Irradiation

QCM : Quartz-Crystal Microbalance

HPH : Hydroxypyridine

OPA : Optical parametric amplifier

CID : Collision-induced dissociation

HB : Hole-Burning

Introduction générale

Introduction générale

De nos jours, nous sommes de plus en plus exposés aux rayonnements ionisants. Ils proviennent de sources naturelles (la radioactivité, le rayonnement cosmique) ou des expositions à des sources artificielles (rayons X, radioactivité due à l'activité humaine). Ces rayonnements ionisants qui peuvent avoir des effets délétères sur notre santé, peuvent également être utilisés pour faire de l'imagerie médicale ou encore, pour traiter des patients atteints de cancers via la radiothérapie. Cette dernière repose sur l'interaction entre des rayonnements ionisants et des cellules cancéreuses. Notamment, les rayonnements ionisants vont attaquer les cellules cancéreuses pour induire leur mort tout en préservant au mieux les cellules saines environnantes puisqu'il est possible aujourd'hui de concentrer ces rayonnements dans une zone bien spécifique grâce à l'essor de l'hadronthérapie. Cette dernière utilise les propriétés balistiques des faisceaux d'ions, technique assurant un dépôt d'énergie essentiellement localisé dans une zone appelée : pic de Bragg. Mais cette technique est encore émergente et considérée comme l'avenir de la radiothérapie, qui traite des millions de personnes dans le monde (dont plus de 50% des patients en France, soit environ 180 000 par an).

Pour détruire une cellule, il faut attaquer son site sensible qui se trouve être la molécule d'Acide DésoxyriboNucléique (ADN). Ceci provoque des cassures double-brin ou des aberrations chromosomiques qui mènent à la mort cellulaire. On sait également, que les dommages radio-induits résultent de deux processus différents : les effets directs ou les effets indirects. Les premiers portent sur l'interaction directe entre le rayonnement ionisant et la molécule d'ADN, tandis que les seconds portent sur l'interaction entre le rayonnement ionisant et le milieu environnant de molécule d'ADN (essentiellement de l'eau), qui produit des espèces secondaires (des électrons solvatés, des ions lents simplement chargés ou des espèces radicalaires). Par la suite, ce sont ces espèces secondaires qui attaquent le matériel génétique, d'où l'appellation indirecte.

Cependant, la compréhension des mécanismes à l'échelle moléculaire des effets des rayonnements ionisants sur la molécule d'ADN n'est pas encore complète ; or il est indispensable d'étudier ces mécanismes d'endommagement sur les cellules afin d'optimiser le traitement de la radiothérapie ou même de pouvoir mieux s'en protéger notamment pour les personnes travaillant dans le domaine du nucléaire. C'est pour cela que depuis plusieurs dizaines d'années, des chercheurs ont entrepris de comprendre ces mécanismes initiateurs des dommages radio-induits sur l'ADN. Les premières études ont porté sur l'irradiation de grands fragments d'ADN en solution et l'analyse était réalisée par des méthodes biochimiques ou biologiques. Grâce à cette approche dite "*top-down*", ils ont pu mettre en exergue les conséquences des rayonnements ionisants qui se trouvent être l'altération du matériel génétique par cassures simple ou double brin. Cependant, ils n'ont pas pu établir

une hiérarchie entre les effets directs et indirects d'irradiation, car les résultats obtenus avec l'approche "*top-down*" résultaient d'une combinaison de l'ensemble des effets. Ces résultats n'ont donc pas permis de remonter à l'origine des dommages à l'échelle moléculaire. En parallèle, une seconde approche est née depuis une dizaine d'année. Cette fois-ci, les chercheurs ont irradié des constituants de la molécule d'ADN tels que des bases nucléiques et analysé les produits issus de l'irradiation par des méthodes d'analyse en phase gazeuse (spectrométrie de masse). Les systèmes dans cette approche dite "*bottom-up*" sont simplifiés par rapport aux grands fragments d'ADN étudiés en solution dans l'approche "*top-down*". Ces études se sont focalisées notamment sur des bases nucléiques irradiées en phase gazeuse. On s'affranchit ainsi des effets du solvant. Grâce à ces simplifications, on peut avoir accès directement aux origines physico-chimiques des dommages à l'échelle moléculaire : cette approche a permis d'extraire des informations telles que des dynamiques de dissociations et des processus d'ionisation. Cependant, les difficultés de mise en phase gazeuse de molécules plus complexes ont limité cette approche. De plus, l'absence d'un environnement biologique représente une trop grande simplification car de nombreux phénomènes cruciaux sont alors absents. Les données obtenues se sont donc révélées inutiles pour extrapoler leurs résultats à l'explication d'une conséquence biologique observable lors d'une irradiation.

C'est à partir de ce double constat d'échec que notre groupe a entrepris d'étudier les effets d'irradiation différemment. L'objectif de cette thèse est de proposer une voie alternative et originale qui permettra d'étudier les effets indirects d'irradiation tout en gardant les avantages des deux approches classiques précédentes : étude en phase condensée de systèmes biomoléculaires pertinents et compréhension des processus à l'échelle moléculaire par l'utilisation de techniques d'analyse physiques en phase gazeuse. Pour cela, nous utiliserons l'opportunité unique de coupler une plateforme d'irradiation par des ions simplement chargés de basses énergies à l'expérience de mise en phase gazeuse de grandes biomolécules par désorption laser non-résonnante sur micro-gouttelettes, développée et caractérisée durant ma thèse.

Mon manuscrit est divisé en 4 chapitres. **Le premier chapitre** commence par décrire les interactions entre les ions et la matière, puis il présente un état de l'art des effets des rayonnements ionisants sur le vivant. Il montre notamment le constat d'échec des deux approches ("*top-down*" et "*bottom-up*") pour étudier l'origine des dommages radio-induits sur l'ADN. Il se termine par la description de la nouvelle approche que nous proposons pour investiguer de manière plus pertinente les effets des rayonnements ionisants.

Le deuxième chapitre recense les différentes sources de mise en phase gaz et explique notre choix. Dans la suite de ce chapitre, je présente donc, en détail, la source que j'ai développée au sein de notre équipe.

Le troisième chapitre décrit les expériences de caractérisation de notre source de mise en phase gaz. Dans ce chapitre, tous les résultats obtenus durant mes trois années de thèse sont exposés. Notamment, plusieurs spectres de masses obtenus avec cette source sont présentés et discutés. Des simulations obtenues avec le logiciel SIMION sont également présentées ; elles permettent d'interpréter nos résultats expérimentaux.

Le dernier chapitre porte sur le couplage de l'expérience de mise en phase gaz à une plateforme d'irradiation. Je présente principalement l'intérêt de ce projet qui est cours de

réalisation au sein de l'équipe.

Enfin, une **annexe** décrit des expériences effectuées au CLUPS, à Orsay, dans lesquelles nous nous sommes intéressés à la photo-fragmentation de divers dérivés d'hyprodyxypri-dine. Des spectres vibroniques sont présentés et comparés à des calculs de chimie quantique.

Chapitre 1

Effets des rayonnements ionisants sur le vivant

CHAPITRE 1 : Effets des rayonnements ionisants sur le vivant

1.1 Contexte scientifique

L'étude des rayonnements ionisants débute avec la découverte des rayons X le 8 novembre 1895, par **Wihelm Conrad Roentgen** (prix Nobel en 1901). Il remarque que lorsque des électrons frappent une plaque de métal dans une ampoule en verre vide d'air, des rayons X sont émis. Ces rayons furent nommés ainsi en raison du caractère mystérieux de ces derniers aux yeux de Roentgen, qui étaient pour lui un type de rayonnement inconnu alors. Il les utilisa le 22 Novembre 1895 sur la main de sa femme, pour réaliser la première image radiographique (figure 1.1).



FIGURE 1.1 – Première image obtenu avec des rayons X [1].

A la suite de cette découverte, le physicien français **Henri Becquerel** découvre que l'uranium émet naturellement un rayonnement sans cause extérieure.

Peu de temps après les travaux d'Henri Becquerel sur l'uranium, **Marie Curie** démarre une thèse sur les rayons de Becquerel. En 1898, avec l'aide de son mari Pierre Curie, elle parvient à extraire du minerai d'uranium deux nouveaux éléments : le polonium et le radium. Ces éléments ont la particularité d'émettre davantage de rayonnements que l'uranium. Ils montrent que cette particularité provient de la nature de l'atome et donnent un nom à ce phénomène appelé la radioactivité. Pour ces travaux, Pierre et Marie Curie, ainsi qu'Henri Becquerel, obtiendront le prix Nobel en 1903.

Dans les années qui suivent, d'autres éléments radioactifs sont découverts et l'anglais **Ernest Rutherford** met en évidence trois types de radioactivité : alpha, bêta, gamma. Très rapidement les applications se développent, notamment dans la radiologie avec les rayons X, ou encore le traitement de cancers avec les rayons gamma. En parallèle des utilisations des rayonnements ionisants, les premières manifestations néfastes de l'action de ces rayonnements sur les tissus vivants apparaissent, telles que des brûlures, des nécroses et des cancer radio-induits.

On dit qu'un rayonnement est ionisant lorsque l'énergie qu'il peut transférer aux électrons de la matière est suffisante pour les arracher de leur atome. On distingue les rayonnements ionisants selon leur nature. Ils sont soit particuliers, tels que les électrons, les ions, les protons et les neutrons, soit de nature électromagnétique, tels que les photons X et γ . Les mécanismes d'interaction avec le milieu traversé sont différents selon la nature du rayonnement ionisant. Dans la suite, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'interaction, notamment utilisée en radiothérapie des ions et des protons avec la matière biologique.

De nos jours, nous sommes continuellement exposés aux rayonnements ionisants. Qu'ils soient d'origine naturelle ou artificielle les sources de rayonnements auxquelles les populations peuvent être exposées ont des origines très diverses. Sur la figure 1.2 sont représentées les différentes sources d'exposition.

Les sources de rayonnements naturelles sont soit d'origine cosmique, provenant de réactions nucléaires dans les étoiles et des explosions de supernovas, soit d'origine terrestre, provenant de matériaux naturellement radioactifs contenus dans l'écorce terrestre. Le rayonnement tellurique (rayonnement infrarouge) et le radon (gaz radioactif) sont contenus dans cette écorce terrestre. En ce qui concerne les rayonnements produits par l'homme, on les retrouve dans différents domaines : l'industrie agroalimentaire afin de stériliser des aliments par irradiation, le domaine militaire pour l'armement, le domaine de la production d'énergie avec la conception et l'exploitation de centrales nucléaires, et enfin, le domaine médical. Dans ce dernier, on les utilise comme outil de diagnostique pour les techniques de radiographie, de scanner ou de scintigraphie. On les utilise également pour soigner des patients atteints de cancer, via la radiothérapie.

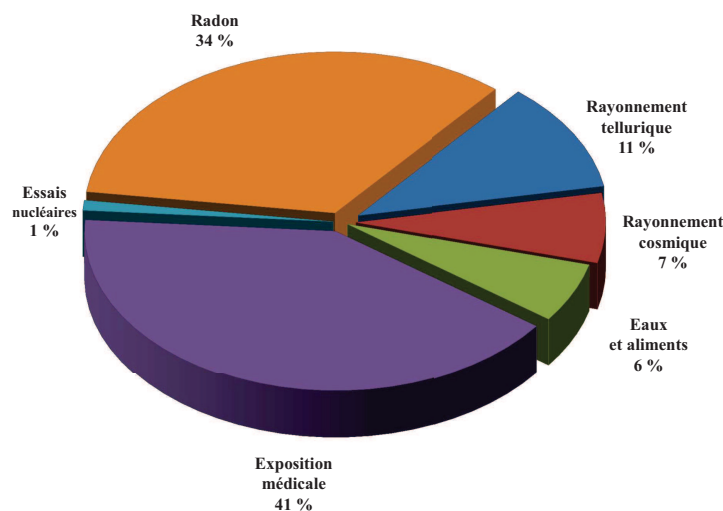


FIGURE 1.2 – Exposition moyenne de la population aux sources d'exposition radioactives (2008) [2].

1.1.1 Radiothérapie

La radiothérapie est une méthode médicale qui permet de traiter des cancers par l'utilisation de rayonnements ionisants. Ces rayonnements vont détruire les cellules cancéreuses et bloquer leur capacité à se multiplier, tout en préservant le mieux possible les tissus environnants. Aujourd'hui, plus de la moitié des patients atteints d'un cancer sont traités par radiothérapie. La radiothérapie regroupe différentes techniques : la curiethérapie, la radiothérapie métabolique vectorielle et la radiothérapie externe. La curiethérapie consiste à insérer des éléments radioactifs scellés sous la forme de grains dans l'organisme, soit au contact de la tumeur, ou dans la tumeur elle-même. Ces éléments radioactifs (iode 125 ou iridium 192) vont libérer des rayonnements ionisants du fait de leur radioactivité, et détruire des cellules cancéreuses. La radiothérapie métabolique vectorielle utilise des éléments radioactifs non scellés, en solution, injectés par voie veineuse, buccale ou aérienne et qui se fixent préférentiellement sur les cellules cancéreuses.

Dans le cadre de cette thèse, nous discutons plus en détail de la radiothérapie externe, qui comme son nom l'indique, utilise une source de rayonnement placée à l'extérieur du patient. Cette source permet de délivrer des photons allant de 6 MV à 20 MV ou des électrons allant de 6 MeV à 22 MeV, par le biais d'un accélérateur linéaire. Ils traversent alors la peau et pénètrent dans l'organisme jusqu'à la tumeur. La radiothérapie utilisant des électrons ou des photons est appelée la radiothérapie conventionnelle. Cependant, il n'y a pas que les électrons ou les photons qui sont utilisés en radiothérapie, d'autres types de particules telles que les protons permettent de cibler la zone à traiter de manière bien plus précise.

1.1.2 Pic de Bragg

D'autres types de radiothérapie externe existent ou émergent, comme notamment l'hadronthérapie qui utilise des particules chargées telles que les alphas ou encore les ions carbone [3]. L'hadronthérapie a l'avantage par rapport à la radiothérapie conventionnelle d'être beaucoup plus précise. La figure 1.3 montre que les dépôts d'énergies pour les ions carbone et les protons sont plus localisés que pour les photons X. En radiothérapie, on utilise la dose (ou dose absorbée) pour parler de dépôt d'énergie. La dose absorbée (D) est la quantité d'énergie absorbée par unité de masse. Initialement l'unité de la dose absorbée était le rad, alors qu'aujourd'hui on utilise le Gray ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$), qui équivaut à 100 rad.

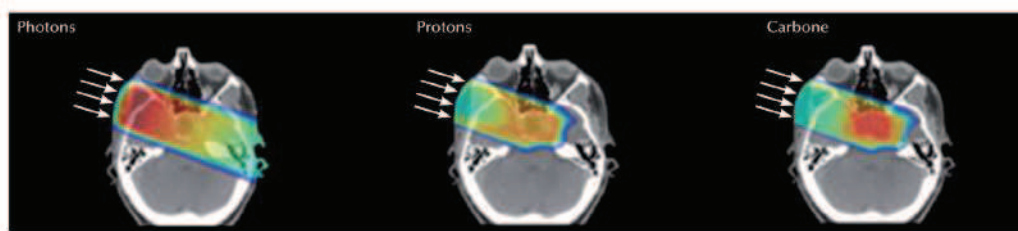


FIGURE 1.3 – Simulations du dépôt de dose en fonction du type de rayonnement. En rouge correspond aux doses les plus importantes. A gauche : Photons, au milieu : protons, à droite : carbone [4].

Les dépôts de dose en fonction de la profondeur du tissu entre les particules utilisées en hadronthérapie et les photons ou les électrons sont très différents. En effet, les photons et les électrons ont un dépôt d'énergie maximum dès les premiers centimètres du tissu humain et qui décroît ensuite de manière progressive, alors que pour les ions chargés tels que les protons, le dépôt d'énergie est maximum en fin de parcours avec un dépôt d'énergie faible dans les premiers centimètres (figure 1.4). Ce dépôt d'énergie maximum en fin de parcours est appelé pic de Bragg [5,6]. La position du pic de Bragg est fonction de l'énergie cinétique des particules. Plus l'énergie cinétique du faisceau d'ions est grande plus le pic de Bragg est situé profondément dans le milieu irradié.

On voit clairement l'intérêt de tels faisceaux par rapport aux faisceaux de rayons X pour des tumeurs profondes et qui nécessitent des dépôts de dose localisés. Grâce à la précision balistique des ions, on épargne mieux les tissus sains et on dépose une dose plus importante qu'avec les rayons X sur la tumeur. Des cancers de la thyroïde, de la prostate et du poumon, ont pu être soignés par le biais de l'hadronthérapie. Même des tumeurs proches d'organes sensibles tel que des mélanomes de l'oeil, où le nerf optique est à proximité, ont pu être soignés grâce justement à cette précision balistique des protons. Cependant, certaines tumeurs ont une taille de plusieurs centimètres, et pour les détruire il faudrait élargir ce pic de Bragg. Ceci est possible, notamment en faisant varier très rapidement l'énergie incidente des ions, ce qui revient à produire plusieurs pic de Bragg dont la somme des pics génèrent un pic de Bragg étalé (SOBP : Spread-Out Bragg Peak) comme on peut le voir sur la figure 1.5.

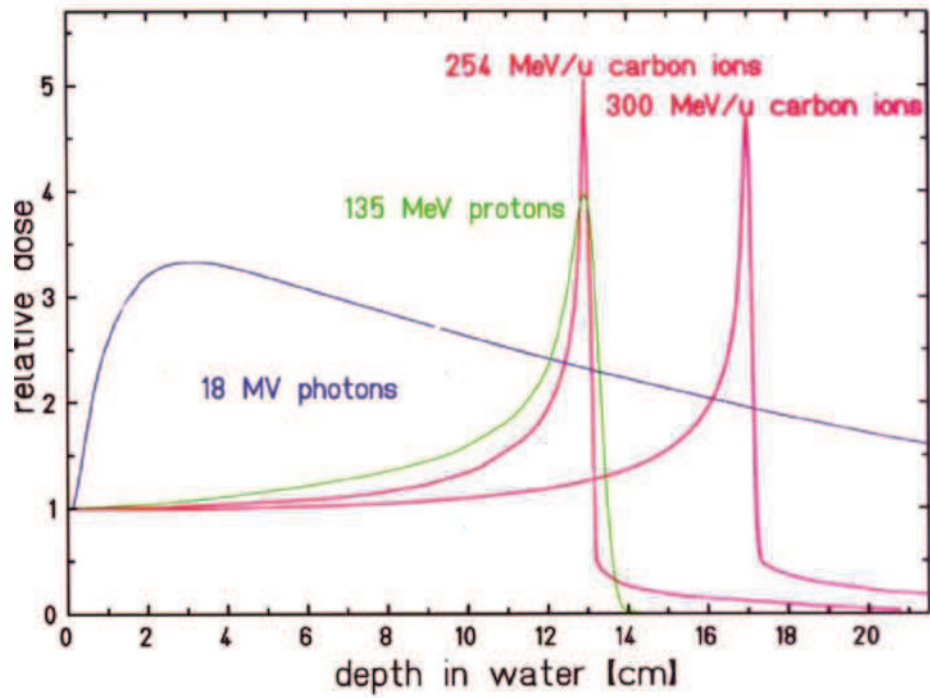


FIGURE 1.4 – Profil de dépôt de dose pour des faisceaux de photons, de protons et d’ions carbone de différentes énergies [7].

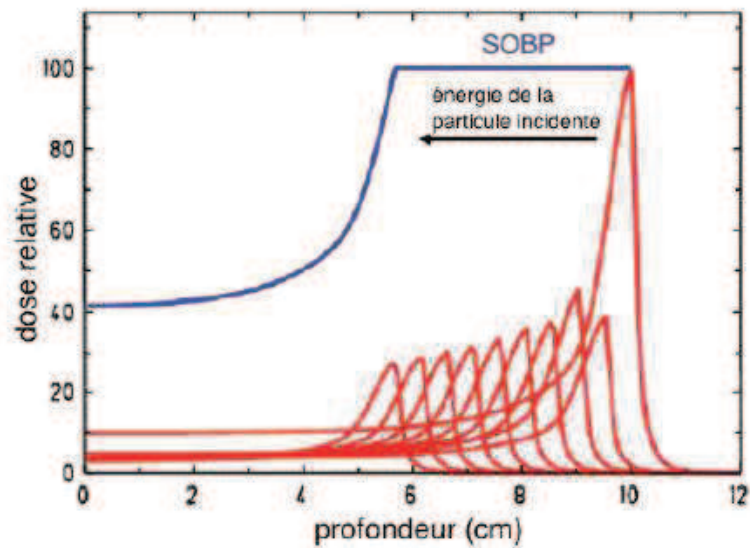


FIGURE 1.5 – En rouge, on voit l’évolution de la position du pic de Bragg en fonction de l’énergie incidente. Les particules sont des protons dans la gamme du MeV. La courbe bleu correspond à la somme qui permet de tout construire ce qu’on appelle le pic de Bragg étalé.

Malgré le grand intérêt de l'hadronthérapie par rapport à la radiothérapie conventionnelle, elle est encore aujourd'hui très peu développée. Par exemple, en France, il y a seulement deux centres de proton-thérapies : le centre de proton-thérapie de Paris-Orsay, dont l'énergie des protons maximale est de 230 MeV, et le centre Antoine Lacassagne à Nice, dont l'énergie des protons maximale est de 65 MeV. Un centre de recherche d'hadronthérapie est en cours de construction à Caen (projet ARCHADE). Il y a également un centre d'hadronthérapie à Lyon, le projet ETOILE.

Afin de comprendre plus en détail ce qui se produit pour des faisceaux d'ions lorsqu'ils traversent la matière, il est nécessaire d'introduire le pouvoir d'arrêt qui est la perte d'énergie élémentaire dE sur une distance dx dans la matière. Ce pouvoir d'arrêt est la somme du pouvoir d'arrêt électronique (collisions inélastiques avec le cortège électronique de l'atome cible) et du pouvoir d'arrêt nucléaire (collisions élastiques avec les noyaux de la cible) :

$$S = -\left(\frac{dE}{dx}\right)_{total} = -\left[\left(\frac{dE}{dx}\right)_e + \left(\frac{dE}{dx}\right)_v\right] \quad (Equation 1.1)$$

On peut montrer que le pouvoir d'arrêt électronique, tant que l'énergie de l'ion est de quelques MeV, a l'expression suivante (formule de Bethe [8]) :

$$-\frac{dE}{dx} = \frac{4\pi e^4 Zm Zp^2}{neV^2} \left[\ln \frac{2meV^2}{<I>} - \ln(1 - \beta^2) - \beta^2 - \frac{C}{Zm} - \frac{\delta}{2} \right] \quad (Equation 1.2)$$

Avec Zm la charge du milieu, Zp la charge du projectile, V la vitesse du projectile, I le potentiel d'ionisation du milieu, $\beta = V/c$ (c vitesse de la lumière), C/Zm le terme de correction d'écrantage électronique de la cible à basse énergie et δ un terme prenant en compte l'influence de la densité du milieu à haute énergie.

On voit notamment avec l'équation précédente, que plus la vitesse de l'ion est faible plus le pouvoir d'arrêt est grand. En effet, plus l'ion a une vitesse faible plus il interagit longtemps avec le cortège électronique du milieu et donc plus la perte d'énergie est grande. Ceci explique pourquoi la perte d'énergie est maximale en fin de parcours (pic de Bragg). Il y a un paramètre important, autre que la vitesse, qui influe également de manière significative sur la perte d'énergie, c'est la charge du projectile. Pour une énergie donnée, plus la charge du projectile est grande (la force coulombienne augmente avec la charge de l'ion) plus sa perte d'énergie est grande. On voit donc l'intérêt d'utiliser des ions de carbone plutôt que des protons car la dose déposée au niveau du pic de Bragg est plus importante pour les ions de carbone. Cela est très intéressant dans le cas de cellules tumorales qui résisteraient à un faisceau de protons. Néanmoins, on observe pour les ions de carbone qu'un dépôt de dose subsiste après le pic de Bragg, appelé "queue de fragmentation". Elle est due à la fragmentation du projectile qui produit des particules plus légères que le carbone. Les fragments les plus produits sont l'hydrogène et l'hélium. Puisque la charge de ces particules est plus faible, leur parcours est plus long que les ions carbone. Donc une dose non négligeable peut être déposée sur des tissus sains après le pic de Bragg, ce qui n'est pas le cas pour un faisceau de protons.

Donc, pour des ions dans la gamme de quelques MeV, seules des collisions inélastiques ont lieu (voir figure 1.6). Ce mode d'interaction correspond donc au pouvoir d'arrêt électronique. Si la vitesse du projectile ralenti et devient comparable à la vitesse des électrons du milieu, alors des échanges de charge ont lieu. L'ion qui initialement est dépourvu d'électrons, du fait des processus de recombinaison avec la matière voit sa charge diminuer. On dit que le projectile se "rhabille". Il faut donc changer la valeur Z_p par une charge effective Z_{eff} décrite par Barkas [9] telle que :

$$Z_{eff} = Z_p[1 - \exp(-125\beta Z_p^{-2/3})] \quad (Equation 1.3)$$

On atteint un maximum de perte d'énergie pour une vitesse v_p tel que :

$$v_p = Z_p^{2/3} v_0 \quad (Equation 1.4)$$

Avec $v_0 = \frac{e^2}{h}$, la vitesse de Bohr. Notamment, pour un faisceau d'ion carbone, ce maximum est atteint pour une énergie de 350 keV, correspondant à une distance de 8 μm .

Ces collisions inélastiques conduisent à des excitations (un électron passe d'un niveau énergétique stable vers un niveau d'énergie supérieur), des ionisations (l'énergie de l'ion est tel qu'un électron de la cible est éjecté) et à de la capture électronique (un électron lié à un état initial de la cible passe à un état final lié au projectile). Lors du phénomène de capture électronique et de l'ionisation, la matière se trouve ionisée et ceci engendre des processus de recombinaison ou une désexcitation pour retourner vers le niveau fondamental. C'est cette gamme d'énergie qui est nécessaire pour traiter des tumeurs profondes (jusqu'à 30 cm). En effet, pour atteindre 30 cm de profondeur, un faisceau de protons nécessite une énergie de 220 MeV alors que pour un faisceau constitués d'ions de carbone, il faut 430 MeV.

Pour des faisceaux d'hadrons avec des énergies de l'ordre du keV, ce sont des collisions élastiques entre les noyaux de la cible et la particule incidente qui dominant puisque, cette fois-ci, les vitesses des électrons de la cible sont bien plus grandes que la vitesse de l'ion. On parle alors de pouvoir d'arrêt nucléaire. C'est lors de ce type de collisions que la queue de fragmentation apparaît.

En résumé, aux grandes énergies (MeV), la perte d'énergie est dominée par des collisions inélastiques entre l'ion et les électrons de la cible qui contribuent majoritairement à la perte d'énergie, alors qu'aux faibles énergies (keV) il y a des collisions élastiques entre l'ion et les noyaux de la cible. Pour l'hadronthérapie, ce sont donc les collisions inélastiques qui contribuent majoritairement à la perte d'énergie étant donné que les énergies utilisées sont de l'ordre de la dizaine voir de la centaine de MeV.

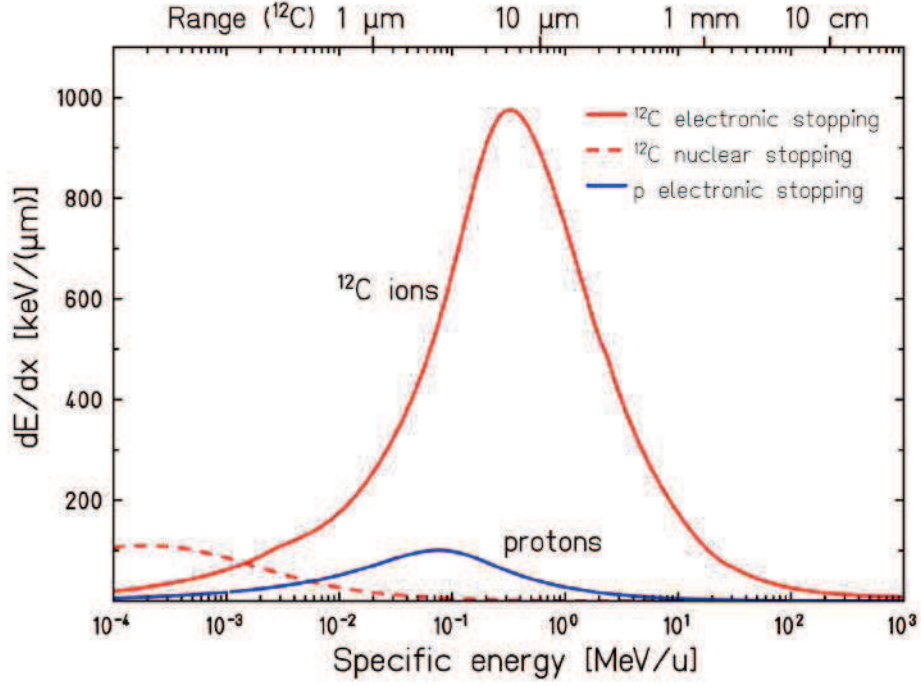


FIGURE 1.6 – Perte d'énergie dans l'eau en fonction de l'énergie incidente pour un faisceau d'ions de carbone et pour un faisceau de protons [10].

Il y a également une autre différence entre les protons et les ions de carbone. En ce qui concerne leurs parcours respectifs. Ce dernier est proportionnel à $\frac{A}{Z^2}$. Donc pour une énergie donnée, c'est le proton qui aura le chemin le plus long (figure 1.7).

On constate également que la charge du milieu Zm joue un rôle : plus le matériau est dense et lourd plus la perte d'énergie est grande. Notamment pour un proton de 200 MeV, le parcours est de 26 cm dans l'eau alors qu'il est de 4.7 cm dans le plomb. Donc, il y a plusieurs paramètres qui influent sur la perte d'énergie.

Lors des ionisations, des électrons secondaires sont produits sur la trace, c'est-à-dire au voisinage de la particule ionisante. Certains électrons ont une énergie suffisamment grande pour s'éloigner de la trace. On les nomme électrons δ . Pour quantifier le dépôt local d'énergie du faisceau ionisant au voisinage de sa trace, on introduit le Transfert d'Énergie Linéique (TEL) qui est le pouvoir d'arrêt S auquel on retranche l'énergie cinétique totale des électrons δ qui ont quitté la trace. Le TEL est donc également une perte d'énergie par unité de distance (keV/μm). Son expression est la suivante :

$$\text{TEL} = S - \sum e_{\delta} \quad (\text{Equation 1.5})$$

Pour bien différencier le TEL et le pouvoir d'arrêt S , je prends l'exemple d'un faisceau d'électrons de 1 MeV dans de l'eau. Son pouvoir d'arrêt est de 0.2 keV/μm et son TEL est

de 0.12 keV/ μm . Donc la dose déposée au voisinage de la trace est de 60 % et le dépôt déposé par les électrons δ est de 40 %.

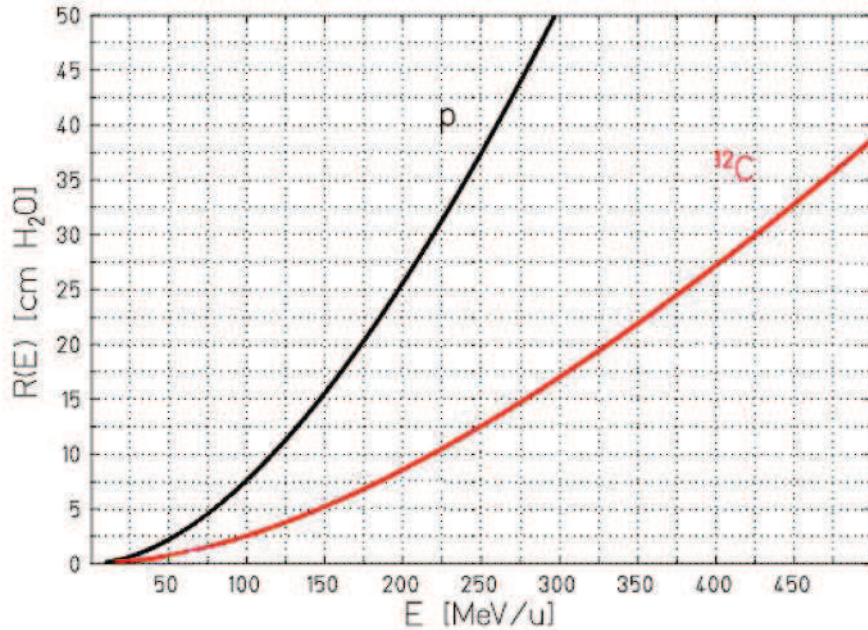


FIGURE 1.7 – Parcours dans l’eau pour des protons et des ions de carbone en fonction de leur énergie [10].

Le TEL est très intéressant pour classer les types de rayonnements en fonction des dégâts biologiques causés. Plus le TEL sera grand plus les dégâts seront importants et vice versa. En effet, un TEL grand signifie une densité d’ionisation importante et donc plus de dégâts. C’est le cas notamment pour les ions lourds tels que les ions carbone. Ils vont donner lieu à des ionisations et excitations très proches et donc la densité d’ionisation sera importante (figure 1.8). Les rayons X ou les électrons correspondent à des cas de faible TEL. Lorsque par exemple des rayons X sont absorbés par la matière, ils vont générer des électrons qui ont des trajectoires très séparées dans l’espace. Ainsi les excitations et ionisations provoquées par ces électrons seront diffuses dans l’espace.

Le TEL permet de calculer le dépôt d’énergie total le long de la trace de la particule, mais il ne suffit pas pour caractériser complètement l’endommagement provoqué par un rayonnement ionisant. En effet, il faut faire appel à d’autres quantités physiologiques, telles que la dose équivalente et la dose efficace, qui permettent de prendre en compte l’influence du type de rayonnement et du type de tissu.

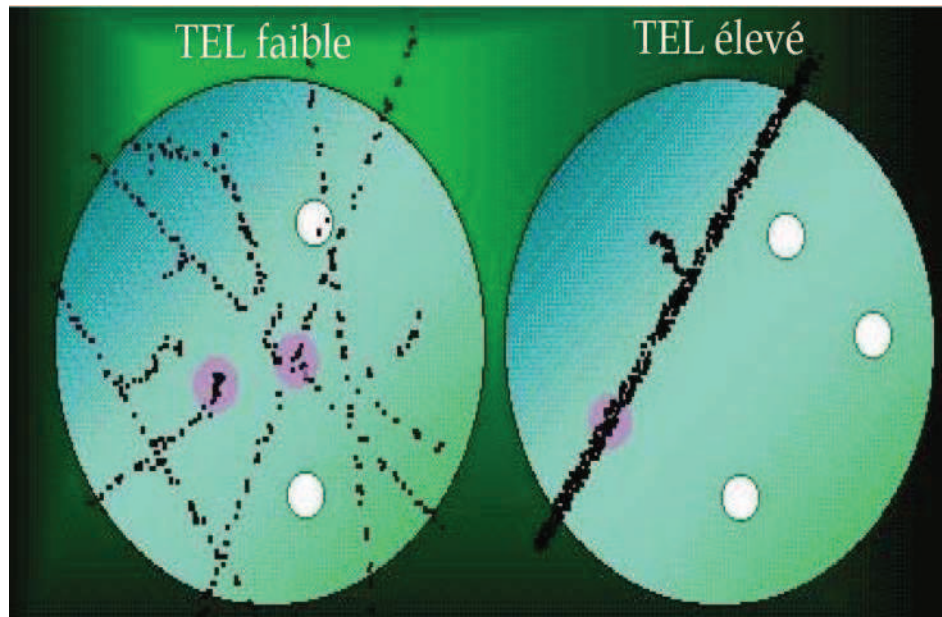


FIGURE 1.8 – Illustration d’un trajet dans la matière avec un TLE faible et avec un TEL élevé [11]. Les cercles blancs et gris représentent des molécules d’intérêts biologiques dissous dans l’eau.

1.1.3 Notions de radiobiologie

1.1.3.1 Dose équivalente

La dose équivalente est le produit de la dose absorbée D par un facteur de pondération w_r , qui prend en compte le type de rayonnement. Pour chaque rayonnement, on peut ainsi définir la dose équivalente qui correspond à la dose de rayonnement gamma qui conduit à des résultats (sensiblement) équivalents. Les facteurs de pondération supérieurs à 1 concernent seulement les neutrons, les protons et les ions lourds tels que les ions carbone. Quelques valeurs de pondérations en fonction du type de rayonnement sont présentées dans le tableau 1.1. La dose équivalente s’exprime en sievert (Sv). Grâce à cette notion de dose équivalente, on peut classer les conséquences des rayonnement ionisants sur l’organisme en deux catégories : les faibles doses et les fortes doses.

$$\text{Dose équivalente} = D w_r \quad (\text{Equation 1.6})$$

On parle de fortes doses lorsque l’exposition est supérieure à 200 mSv (d’après le comité scientifique sur l’effet des rayonnements de l’ONU, UNSCEAR de 2010 [12]). Cette valeur est basée sur le seuil d’apparition d’effets déterministes, c’est-à-dire des effets qui apparaissent obligatoirement chez toutes les personnes exposées au-delà de ce seuil. Ces

effets peuvent apparaître au bout de quelques jours ou semaines. Notamment entre 0.5 et 2 Sv, il y a apparition de nausées, d’asthénie (fatigue physique) ou des vomissements 3 à 6 h après l’exposition. Entre 4 et 4.5 Sv, l’exposition va entraîner le décès de plus de 50% des personnes.

En-dessous de 200 mSv, les conséquences sont insidieuses, puisqu’elles ne peuvent être observées que très longtemps après l’exposition, jusqu’à plusieurs dizaines d’années, ce qui est bien plus long si on compare aux effets déterministes. Dans le cas des faibles doses, les effets peuvent ou non apparaître. Le hasard intervenant, on parle d’effets probabilistes ou d’effets stochastiques. Ce domaine de doses concernent notamment la santé humaine. En effet, pour les examens radiologiques les doses délivrées sont inférieures à une dizaines de mSv. Les irradiations que reçoivent les travailleurs du nucléaire ou bien les personnes qui résident dans des villes où la radioactivité est importante, sont également de cet ordre de grandeur. Ces faibles doses sont à prendre au sérieux, puisque une dose seulement de 0.01 mSv peut développer (à long terme) l’apparition d’un cancer.

Type de radiation et énergie	Facteur de pondération radio-biologique W_r
<i>Photons toutes énergies</i>	1
<i>Électrons toutes énergies</i>	1
<i>Neutrons < 10 keV</i>	5
<i>Neutrons de 10 keV à 100 keV</i>	10
<i>Neutrons de 100 keV à 2 MeV</i>	20
<i>Neutrons de 2 MeV à 20 MeV</i>	10
<i>Neutrons > 20 MeV</i>	5
<i>Protons d’énergie de 135 MeV</i>	3.3
<i>Ions carbone d’énergie de 290 MeV</i>	73

TABLE 1.1 – Facteurs de pondération radiologique de différents types de radiation en fonction de leurs énergies.

1.1.3.2 Dose efficace

Pour une dose équivalente donnée, la sensibilité aux rayonnements n’est pas la même en fonction du tissu. Par exemple, le foie est plus radio-résistant que la moelle osseuse. C’est pour cette raison que la Commission internationale de protection radiologique (CIPR, en anglais c’est ICRP pour International Commission on Radiological Protection) a introduit un second facteur de pondération, qui est fonction du type de tissu. Il suffit de multiplier la dose équivalente par un facteur de pondération w_t , qui prend en compte le type de tissus. Notamment, le facteur de pondération tissulaire est de 0.12 pour la moelle

osseuse, alors que pour le foie, il est de 0.05. La dose efficace s'exprime également en Sv. La somme des doses efficaces de l'ensemble des tissus ou organes correspond à la dose efficace de l'organisme entier.

$$\text{Dose efficace} = \text{Dose équivalente } w_t = \text{Dose absorbée } w_r w_t \quad (\text{Equation 1.7})$$

Pour récapituler, la figure 1.9 représente schématiquement la relation entre les grandeurs.

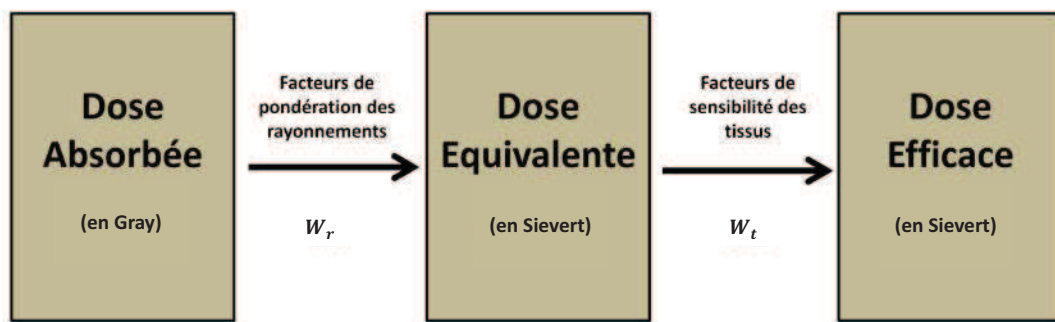


FIGURE 1.9 – Schéma illustrant la relation entre la dose absorbée, la dose équivalente et la dose efficace.

Les rayonnements ionisants jouent un rôle crucial en santé publique aussi bien par leur utilisation en radiothérapie que par leurs effets néfastes. Si la radiothérapie a prouvé son efficacité, certains effets secondaires liés à l'irradiation de tissus sains entourant le tissu tumoral peuvent cependant apparaître. Ces dommages induits par les rayonnements ionisants peuvent à long terme provoquer des cancers secondaires. Le domaine de la radio protection prend lui de plus en plus d'importance, en raison des risques d'exposition potentielle auxquelles sont soumises les populations suite à un incident dans une centrale nucléaire (accident majeur à Fukushima en 2011). Il est donc indispensable d'étudier, à l'échelle moléculaire, l'origine physico-chimique des dommages induits par radiation sur le vivant, afin d'optimiser le traitement des cancers par radiothérapie, et de protéger le mieux possible les travailleurs du nucléaire, ainsi que les populations proches géographiquement de centrale nucléaire.

Les dommages induits par les rayonnements ionisants concernent les molécules constitutives des cellules telles que la molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN), les protéines, l'eau et les lipides. Pour préserver le plus efficacement une cellule, il faut protéger l'ADN. En effet, la destruction de l'ADN entraîne la destruction de la cellule qui le contient. Lorsque l'ADN est modifié suite à une irradiation il peut se réparer par différents mécanismes, soit de manière fidèle et alors la cellule survie, soit de manière infidèle et des mutations peuvent survenir et être à l'origine de cancers radio-induits. Dans la suite je

présente la molécule d'ADN ainsi que ses constituants de manière générale, ainsi que les conséquences des rayonnements ionisants sur la molécule d'ADN.

1.2 Systèmes étudiés

1.2.1 La molécule d'ADN, base ADN, base ARN

Comme je l'ai dit précédemment l'ADN est le site sensible des rayonnements ionisants. Cette molécule présente chez tous les êtres est le support de l'information génétique qu'on retrouve chez les procaryotes et les eucaryotes. Chez les procaryotes, l'ADN est libre dans le cytoplasme des cellules, alors que pour les eucaryotes, il est placé dans le noyau de chaque cellule de l'organisme. Chez ces derniers, la molécule d'ADN, qui peut atteindre 1.60 m lorsqu'elle est dépliée, est comprimée sous forme de chromosomes pour que la molécule puisse être contenue dans un noyau de quelques μm de diamètre (voir figure 1.10).

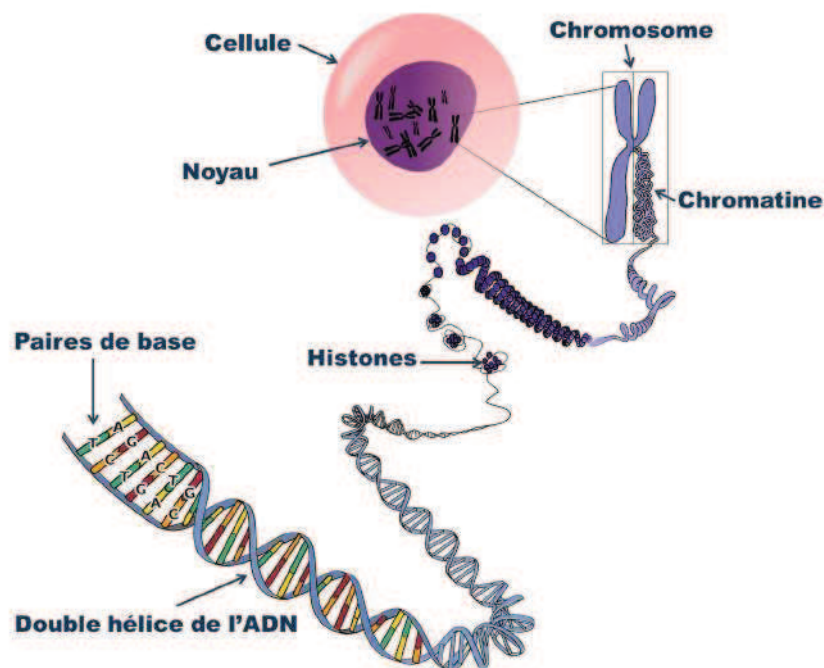


FIGURE 1.10 – Représentation des différents niveaux d'enroulement de l'ADN dans une cellule eucaryote.

La structure de l'ADN a été mise en évidence en 1953 par Francis Crick et James Watson [13]. L'ADN est une double hélice composée de 2 brins complémentaires. Chaque brin est composé d'une succession de nucléotides. Un nucléotide possède trois parties : un sucre pentose, une base azotée et un groupement phosphate. Il y a 4 bases azotées différentes : A (adénine), T (thymine), G (guanine) et C (cytosine). Le nucléotide T ne peut se lier qu'au

nucléotide A, et le nucléotide G qu'au nucléotide C. Cela explique la complémentarité d'un brin par rapport à l'autre. Le sucre pentose est lié à la fois au groupe phosphate par une liaison ester, et à la base azotée par une liaison N-glycosidique. Les 2 brins de l'ADN sont liés par des liaisons hydrogènes entre les bases puriques (adénine et guanine) et pyrimidiques (thymine et cytosine), comme on peut le voir sur figure 1.11. Deux bases azotées liées par une liaison hydrogène formant une paire est dite de Watson-Crick.

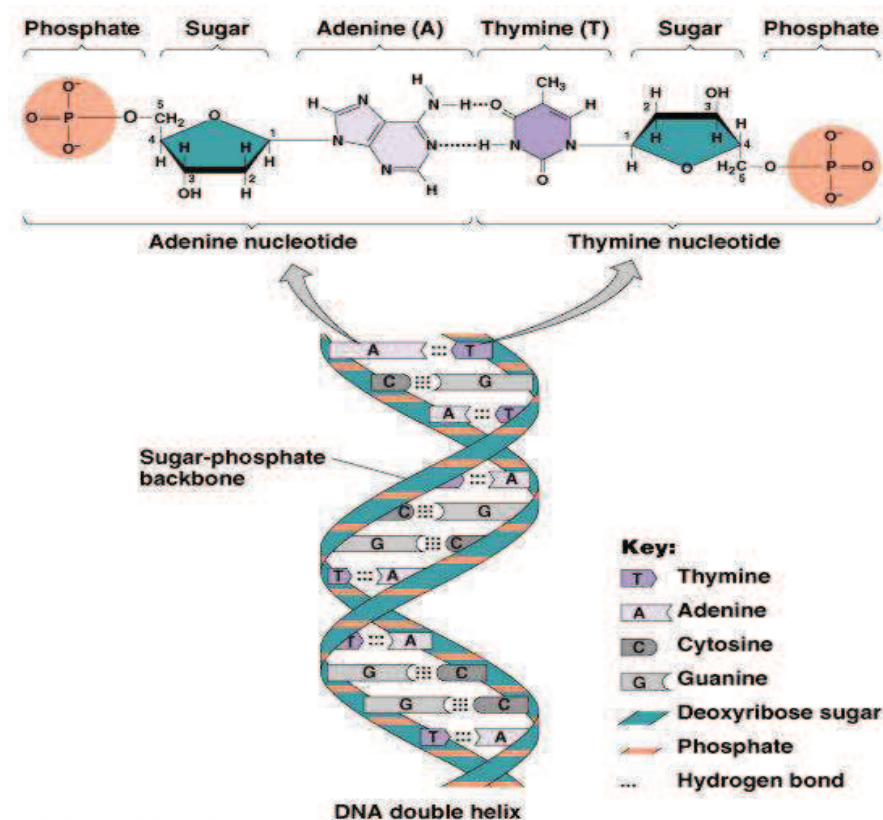


FIGURE 1.11 – Structure de la molécule d'ADN.

L'ordre dans lequel se succèdent les nucléotides dans un brin constitue la séquence de ce brin. C'est cette séquence qui porte l'information génétique. L'ADN a deux fonctions : la transmission de l'information génétique et la synthèse des protéines.

La transmission de l'information génétique est assurée par l'étape de "réplication". La molécule d'ADN s'ouvre, comme une fermeture à glissière. Chaque brin est parcouru par une enzyme spécifique, l'ADN polymérase. Elle permet de synthétiser un nouveau brin, complémentaire du premier. Ainsi, une molécule d'ADN mère est transformée en deux nouvelles molécules filles, ayant la même séquence de nucléotides. Ce mécanisme de réplication permet de transmettre l'information génétique à la descendance.

La molécule responsable de la synthèse des protéines, est l'acide ribonucléique (ARN). Elle est produite dans le noyau des cellules pour les organismes eucaryotes ou dans le

cytoplasme pour les organismes procaryotes. La synthèse d'une protéine se déroule en deux étapes. Tout d'abord, la séquence d'ADN codant le gène (un gène est une portion de l'ADN) associé à la protéine est transcrite en ARN messager. Par la suite, l'ARN messager est traduit en protéine. D'un point de vue structural, l'ARN a des similitudes avec l'ADN. L'ARN contient cependant des résidus de ribose là où l'ADN contient du désoxyribose, et la thymine de l'ADN est remplacée par l'uracile (figure 1.12).

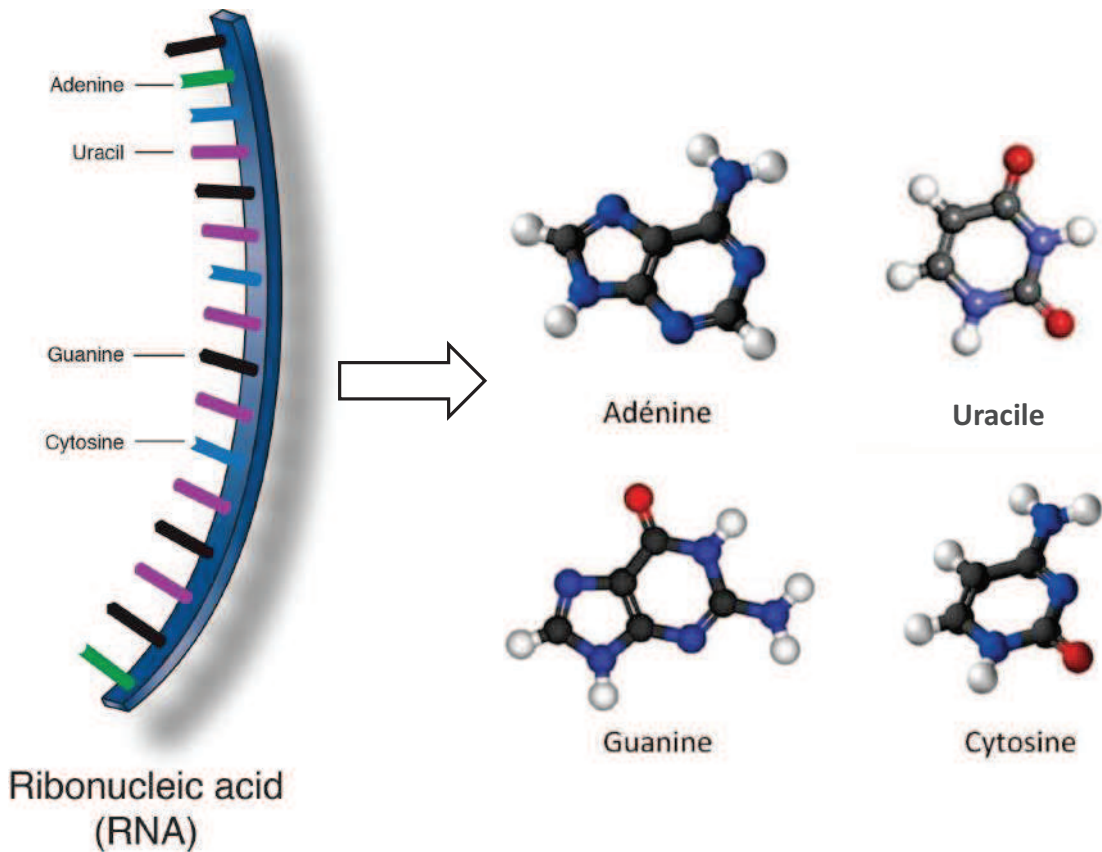


FIGURE 1.12 – Structure de la molécule d'ARN et des bases de l'ARN. L'ARN est formé d'un brin, contrairement à l'ADN. On dit qu'il est mono-caténaire.

1.2.2 Acides aminés, peptides et protéines

Le but de nos études est d'obtenir des informations sur les mécanismes des dommages radio-induits, à l'échelle moléculaire. Il est donc indispensable d'irradier la molécule d'ADN avec son environnement, afin d'obtenir des données pertinentes d'un point de vue biologique. Cet environnement est représenté en grande partie par de l'eau (l'eau est le constituant majoritaire de l'organisme vivant (80 %)), mais d'autres molécules sont présentes, comme les protéines, dont les constituants de base sont les acides aminés.

Les acides aminés sont des molécules organiques qui possèdent un groupement amine (-NH_2), un groupement carboxylique (-COOH) et une chaîne latérale (figure 1.13). On dénombre 20 acides aminés communs à l'ensemble des espèces, qui diffèrent par leur chaîne latérale. Ils sont présentés sur la figure 1.14. On désigne les acides aminés par un code, composé d'une lettre ou de trois lettres, défini par l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).

Il existe plusieurs sortes d'acides aminés, qui se différencient par le nombre d'atomes de carbone entre la fonction amine et la fonction carboxylique. On appelle les acides aminés comportant un seul atome de carbone entre ces deux fonctions les acides α -aminés (ce sont les constituants des protéines). S'il y a deux atomes de carbone, on parle d'acides β -aminés, et pour trois atomes de carbone d'acides γ -aminés. Chaque atome de carbone comporte sa chaîne latérale.

Dans une protéine, les acides aminés sont liés entre eux de manière covalente entre une fonction amine et un groupement carboxylique, avec la perte d'une molécule d'eau. On parle de liaison peptidique (voir figure 1.15). L'enchaînement des acides aminés forme la structure primaire de la protéine. L'acide aminé qui perd la molécule d'eau, lorsqu'il se lie à un autre acide aminé, est appelé résidu.

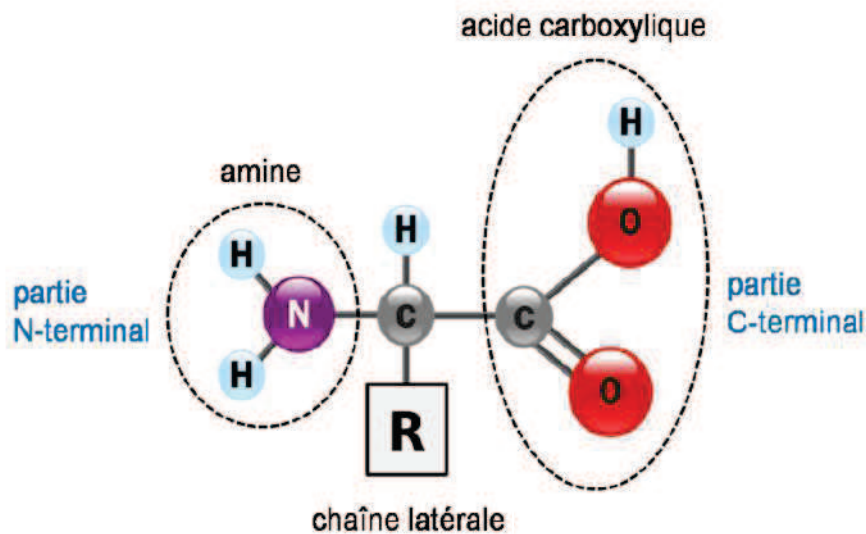


FIGURE 1.13 – Structure d'un acide aminé

La différence entre un peptide et une protéine est basée sur le nombre d'acides aminés liés entre eux. Pour un enchaînement de moins de 20 acides aminés on parle de peptide. Si le nombre d'acides aminés est compris entre 20 et 100, on parle de polypeptide. Au-dessus de 100 acides aminés, on considère que c'est une protéine. Les acides aminés sont donc les

constituants de base d'une protéine.

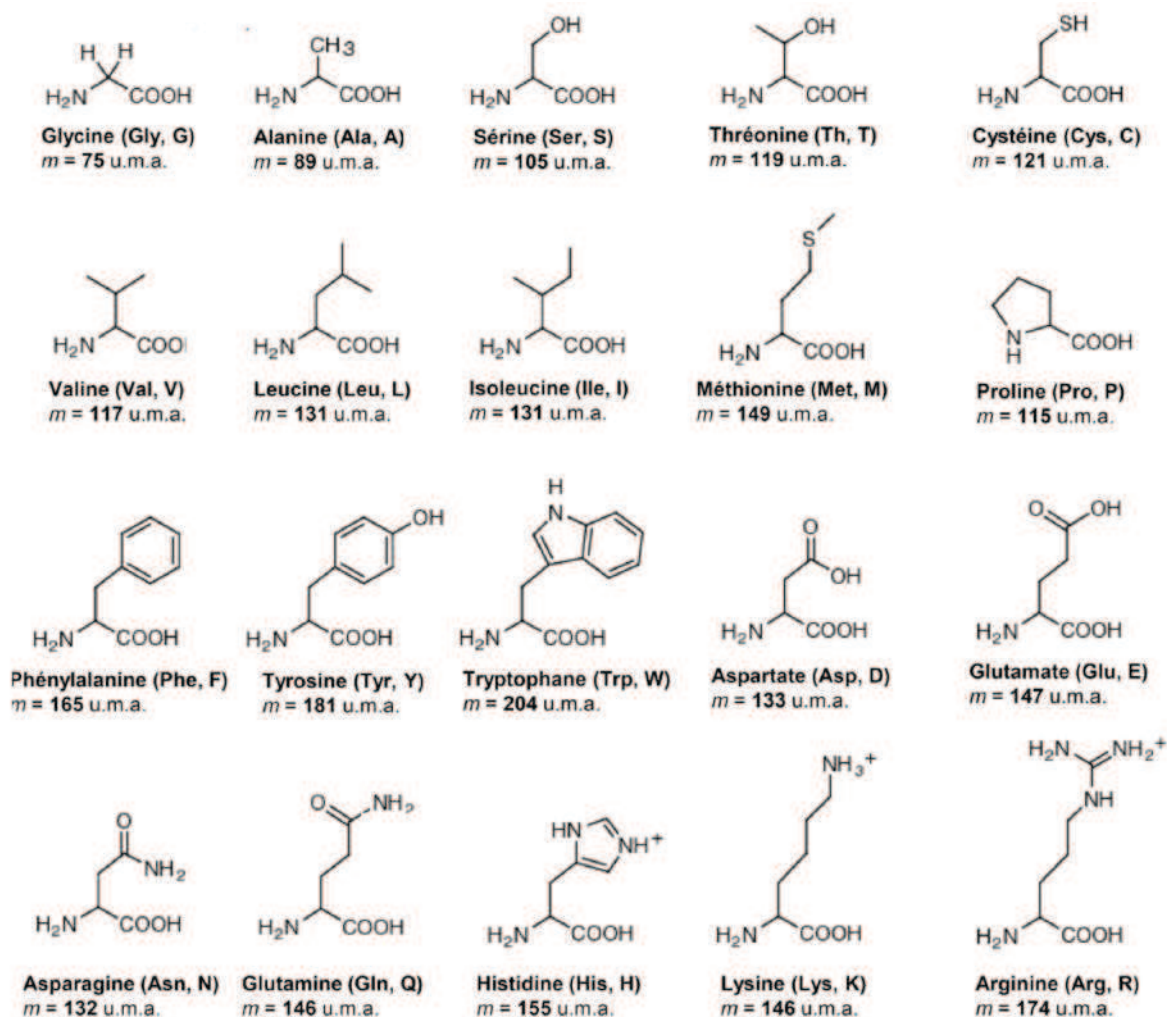


FIGURE 1.14 – Représentation de 20 acides aminés, ainsi que leur abréviation et leur masse en unité de masse atomique ($1\text{Da} = 1\text{u.m.a} \simeq 1.660537781(82) \times 10^{-27}\text{kg}$).

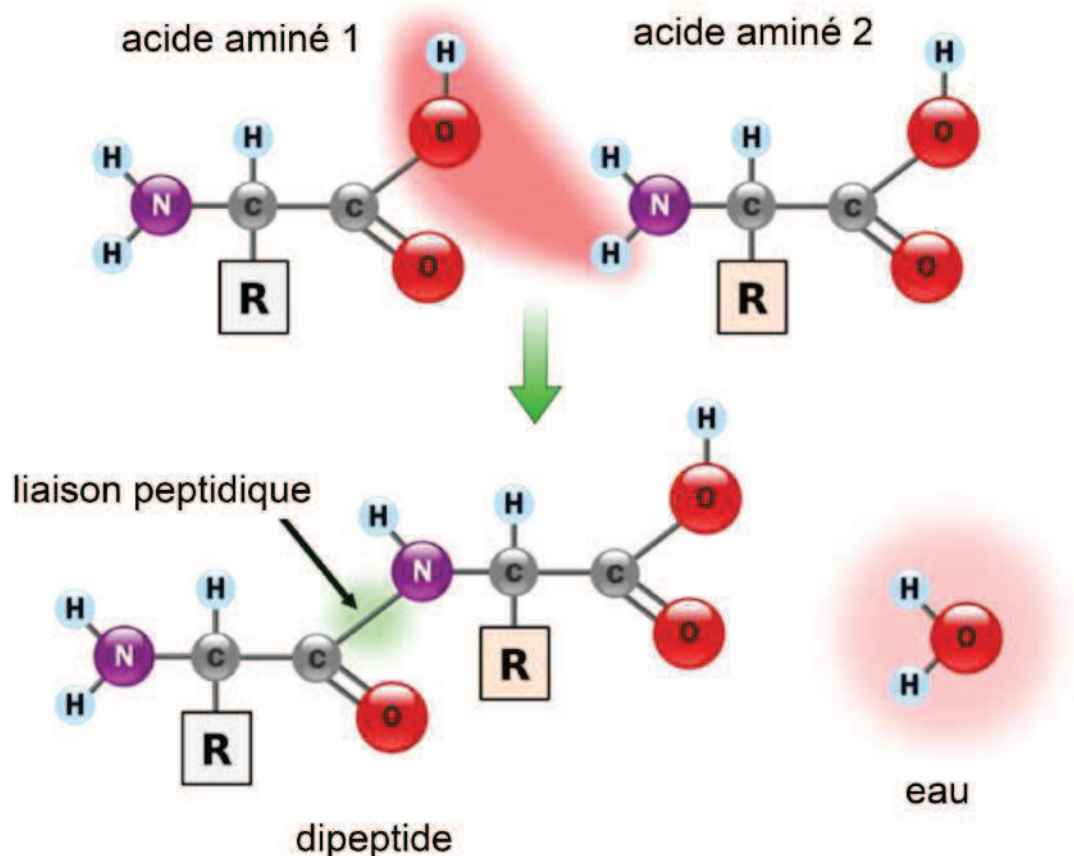


FIGURE 1.15 – Représentation de la formation de la liaison peptidique. La formation de cette liaison produit une molécule d'eau, en solution.

1.3 Conséquences des rayonnements ionisants sur l'ADN

Maintenant que la molécule d'ADN a été présentée, voyons quelles sont les modifications qu'elle subit lorsqu'elle est soumise à un rayonnement ionisant. Lorsque les rayonnements ionisants interagissent avec l'ADN ils peuvent produire de nombreux dégâts. Ces dégâts par irradiation résultent soit d'ionisations directes dues à l'interaction avec le rayonnement primaire (effet direct), soit d'interactions avec des électrons ou des ions lents simplement chargés ou des espèces radicalaires (effets indirects) formés par la radiation primaire interagissant avec le milieu biologique (essentiellement de l'eau). Ces espèces secondaires réagissent par la suite avec l'ADN pour produire des cassures de cette molécule.

1.3.1 Effets directs

Lorsque l'interaction entre le rayonnement incident (quelque soit sa nature et son énergie) et la molécule cible se produit sans étape intermédiaire on parle d'effet direct. Cette interaction directe entre la cible le rayonnement incident va induire une chaîne d'évènements

conduisant aux effets biologiques.

1.3.2 Effets indirects : production d'espèces radicalaires

Dans le cas des effets indirects, le rayonnement incident et les produits secondaires interagissent avec le milieu environnant de la molécule d'intérêt. Ce milieu environnant est essentiellement constitué d'eau, qui représente 80 % de la cellule. Cette interaction entre le rayonnement ionisant et l'eau a pour conséquence de déclencher un ensemble de processus de décomposition de la molécule d'eau appelé radiolyse.

Dans la radiolyse de l'eau, des espèces secondaires très réactives vont être produites telles que des radicaux libres ($\text{OH}^\cdot$, $\text{H}^\cdot$) et des électrons solvatés. la figure 1.16 illustre les deux processus induits par l'interaction d'un rayonnement ionisant avec une molécule d'eau : l'ionisation et l'excitation. L'ionisation conduit à la formation de H_3O^+ , $\text{OH}^\cdot$ et d'un électron. L'électron libéré lors de l'ionisation peut se recombiner avec une molécule d'eau et donner un électron solvaté ou provoquer la formation de $\text{H}^\cdot$ et $\text{OH}^\cdot$. Les molécules d'eau peuvent également passer dans un état excité une fois le rayonnement absorbé, pour soit retomber dans leur niveau fondamental (chaleur et vibration), soit se dissocier en $\text{H}^\cdot$ et $\text{OH}^\cdot$ [14]. Ces espèces, de nature très réactive, vont pouvoir interagir avec la molécule d'ADN et induire des dégâts sur cette dernière.

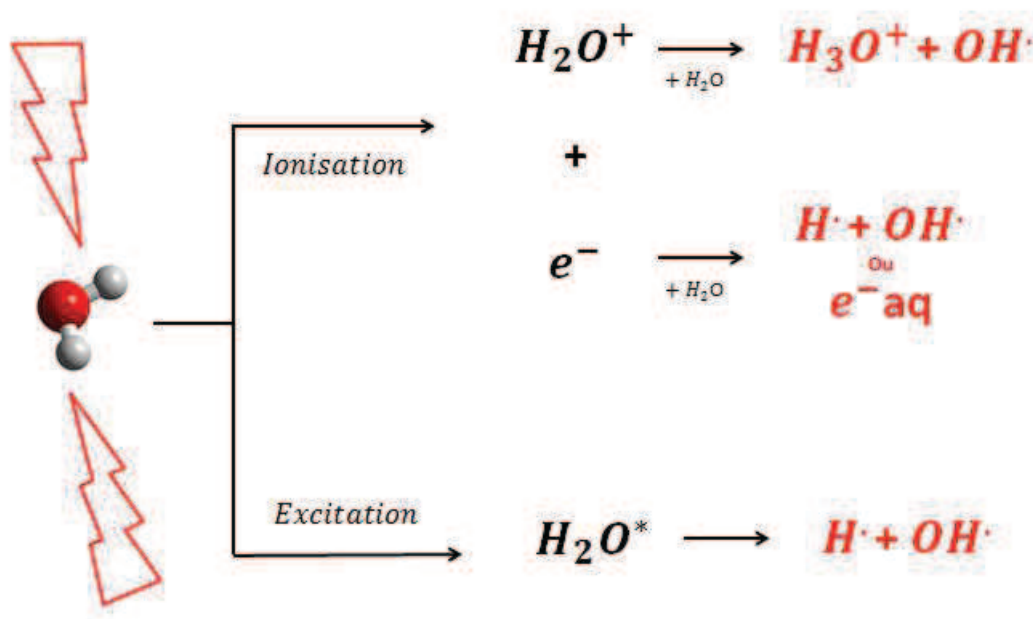


FIGURE 1.16 – Schéma de la radiolyse de l'eau.

Les effets directs et indirects peuvent tous deux induire des dégâts sur la molécule d'ADN. Néanmoins, ils n'ont pas la même contribution. En effet, des expériences ont montré qu'avec l'ajout de certaines molécules telles que la vitamine C ou le diméthylsulfoxyde

qui ont la capacité de capter très efficacement les radicaux hydroxyles, les effets des rayonnements diminuent de 70% à 80% [15]. Cette observation démontre que les effets indirects sont majoritaires lorsque la matière vivante est soumise à un rayonnement, et il est donc primordial de comprendre les mécanismes sous-jacents à ce type d'effet.

1.3.3 Chronologie des événements d'irradiation

Dans le cadre de la radiothérapie et de manière plus large dans celui de la protection des humains vis à vis des rayonnements ionisants présents dans notre quotidien, il est nécessaire de comprendre finement l'interaction d'un rayonnement ionisant avec la matière biologique à l'échelle moléculaire afin de s'en protéger le mieux possible. C'est pour cela que beaucoup d'équipes dans le monde entier tentent de comprendre quels sont les mécanismes initiateurs menant aux effets d'endommagement. Cela permettrait d'optimiser la radiothérapie et de mieux se protéger des rayonnements ionisants présents dans notre quotidien.

Nous savons qu'aujourd'hui lorsqu'un rayonnement ionisant interagit avec la matière biologique, les conséquences biologiques telles que la mort cellulaire ou l'apparition d'un cancer radio-induit apparaissent au bout de plusieurs étapes. On dénombre cinq étapes entre le moment où le rayonnement interagit avec la cellule et le moment où les conséquences biologiques apparaissent (figure 1.17).

1) **L'étape physique** de très courte durée ($t < 10^{-16}$ s) permet la formation d'espèces excitées et ionisées dans la cellule et l'ADN. Cela conduit à une première altération des molécules d'intérêt biologique par effet direct.

2) **L'étape physico-chimique** qui se déroule entre 10^{-16} s et 10^{-12} s, génère des radicaux libres ($\text{OH}\cdot$ et $\text{H}\cdot$) et des électrons solvatés issus de la radiolyse de l'eau. En effet, les molécules d'eau ionisées et excitées durant la première étape sont instables. Elles se dissocient en produit radicalaires. On les appelle également : espèces secondaires.

3) **L'étape chimique** qui a lieu entre 10^{-12} s et 10^{-6} s, va permettre aux différentes espèces secondaires produites de diffuser et de réagir entre elles.

4) **L'étape biochimique** se produit au-delà de la microseconde. Dans cette étape se manifeste l'altération chimique des molécules biologiques par les radicaux libres (effets indirects).

5) **Finalement**, les conséquences biologiques telles que la mutation, les cancers et la mort cellulaire, apparaissent à des temps plus long : jour, semaine, mois, ans.

Dans ce mémoire, nous nous limiterons à l'étude des quatre premières étapes.

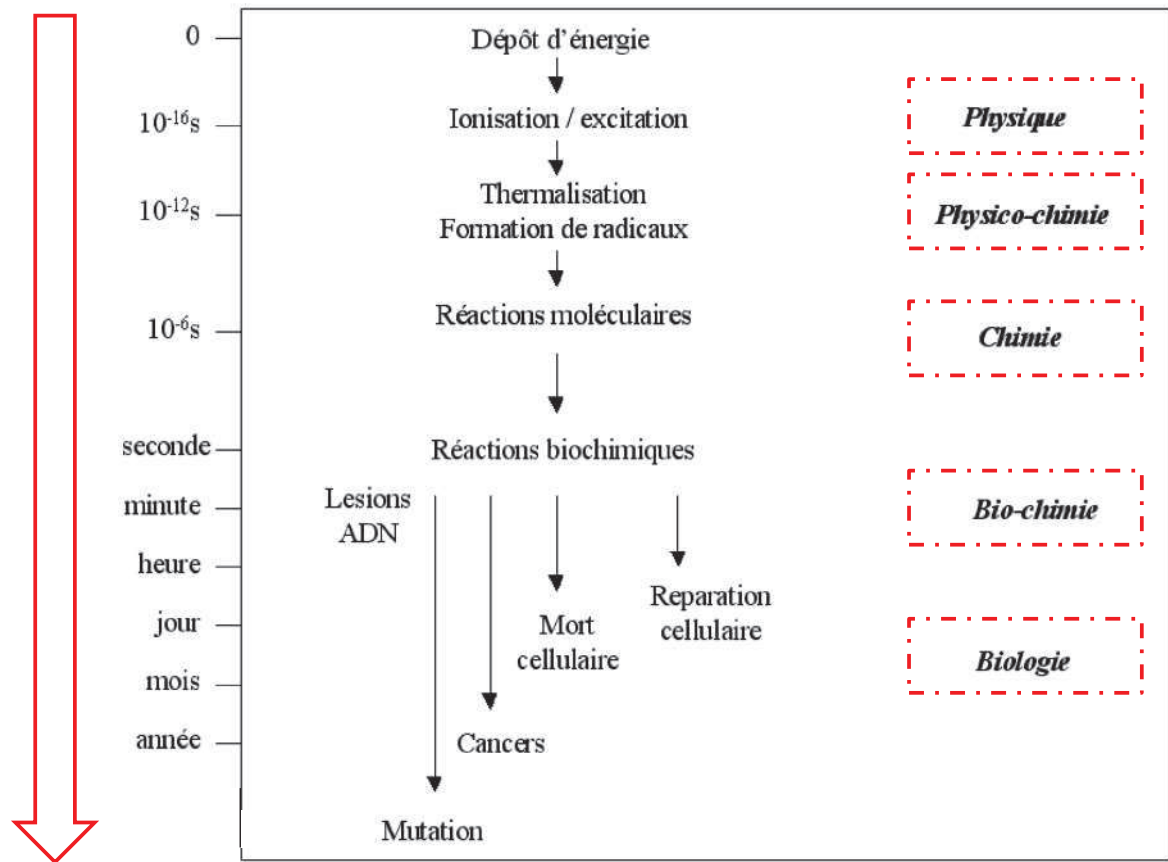


FIGURE 1.17 – Chronologie des effets lors de l’irradiation de matière biologique [16].

1.3.4 Types de dégâts sur l’ADN

Les dégâts ou lésions sur la molécule d’ADN apparaissent lors de l’étape 1 pour les effets directs et lors de l’étape 4 pour les effets indirects. Ces deux effets vont produire plusieurs lésions de différentes natures telles que des cassures simple ou double brins, des modifications ou pertes de bases, ou encore des pontages ADN-protéine (figure 1.18). Une cassure simple brin (CSB) résulte d’une rupture de la liaison phosphate-sucre. Ce type de cassures a peu d’impact en terme de létalité cellulaire puisqu’elles sont rapidement réparées. Une cassure double brin (CDB) survient lors d’une rupture des 2 chaînes en des sites proches l’un de l’autre, séparés d’une distance inférieure ou égale à une dizaine de paires de bases [17]. Ce type de cassures fait partie des lésions les plus délétères puisqu’elles sont plus complexes à restaurer et donc la cellule risque d’être détruite.

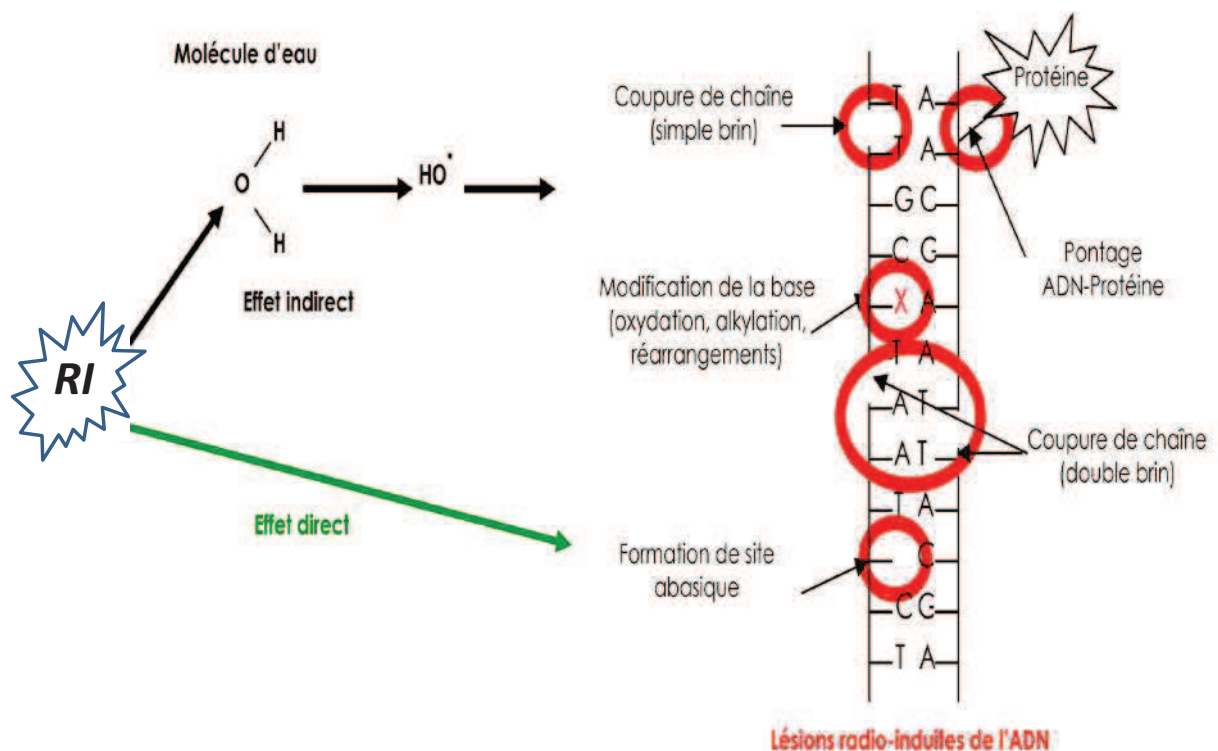


FIGURE 1.18 – Effets des rayonnements ionisants sur l'ADN. Représentation schématique des effets directs et indirects, ainsi que des différentes lésions produites [18].

Ces lésions de différentes natures peuvent soit induire la mort de la cellule, soit être réparées. Cette réparation peut être réalisée de manière fidèle, et n'aura alors aucun effet délétère. Ou bien la réparation est non fidèle, et cela engendre alors des séquences génétique modifiées, provoquant l'apparition de mutations ou de modifications chromosomiques. Notamment, si ces mutations surviennent au niveau des gènes codant des protéines qui contrôlent la stabilité génétique et cellulaire, cela peut avoir pour effet de développer des cancers. Un des mécanismes de réparation fidèle de la molécule d'ADN est celui de l'excision-resynthèse. Lorsqu'une lésion est reconnue, elle est excisée, puis le segment manquant est synthétisé en prenant comme modèle une chaîne complémentaire intacte (voir figure 1.19).

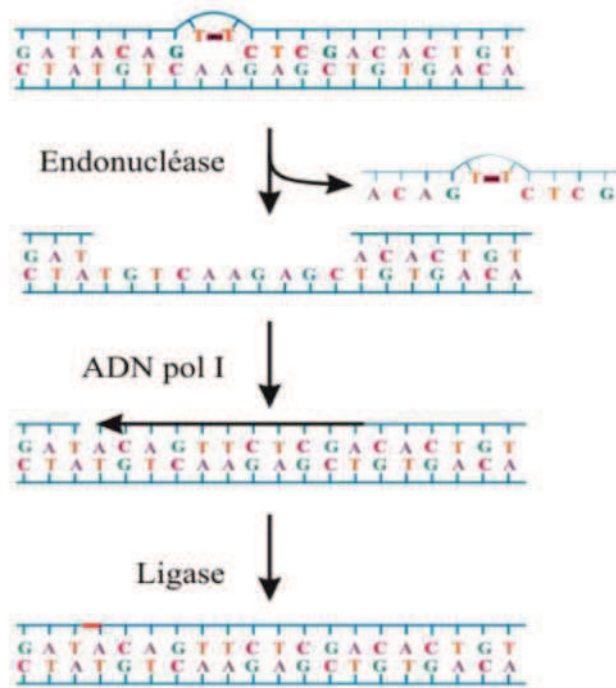


FIGURE 1.19 – Représentation schématique du mécanisme de réparation par excision-resynthèse.

Il est important de comprendre comment surviennent ces différents dégâts afin d’avoir la possibilité d’agir sur ces derniers. Depuis de nombreuses années, des chercheurs tentent donc de comprendre quels sont les processus physiques responsables des dégâts sur le vivant lors d’une irradiation, en particulier sur la molécule d’ADN. Des études ont été menées pour mettre en lumière les mécanismes menant aux effets d’endommagement selon deux approches : *top-down* et *bottom-up*. L’approche *top-down* repose sur l’irradiation de molécules d’ADN ou de cellules. La seconde approche, *bottom-up*, est fondée sur des collisions à basse énergie sur des briques constitutives de l’ADN. Dans la suite, je détaille ces deux approches ainsi que les avantages et les limitations de chacune.

1.4 Expériences “*top-down*”

Cette approche qui repose donc sur l’irradiation de cellules, de molécules d’ADN ou de grands fragments d’ADN est pertinente d’un point de vue biologique. En effet, l’irradiation de grands systèmes tels que des molécules d’ADN en phase aqueuse permet de se rapprocher des conditions du vivant. Grâce à cette approche, des études ont montré que les plus sévères conséquences de l’irradiation sur le milieu vivant résultaient de l’endommagement de la molécule d’ADN par cassures simple et double brin de celle-ci [19] et l’agglomération de ce type de lésions [20]. Cela a pour effet d’entraîner une mauvaise réparation de la structure et provoque des mutations conduisant à des dégénérescences génétiques ou à la mort de la cellule.

Comme je l'ai dit plus haut, les effets d'endommagement ne résultent pas uniquement de l'interaction directe entre le rayonnement ionisant et les cellules vivantes mais aussi de l'interaction avec des électrons ou des ions lents simplement chargés ou des espèces radicalaires (effets indirects) formés par la radiation primaire interagissant avec le milieu biologique (essentiellement de l'eau). Ces espèces secondaires sont formées lors de la deuxième étape des événements d'irradiation (étape physico-chimique). C'est lors de la quatrième étape que ces particules secondaires participent à l'altération du matériel biologique en produisant des cassures de la molécule d'ADN et donc participent aux effets d'endommagement au même titre que les effets directs. C'est pour cela que le groupe de L. Sanche s'est intéressé aux effets de ces particules secondaires sur le matériel biologique en irradiant des molécules d'ADN plasmide (molécule d'ADN de forme circulaire présentes dans les bactéries) [21].

Ces ADN plasmide dont les extrémités sont jointes ont la particularité d'avoir un brin qui présente des tours supplémentaires par rapport à l'autre. On dit alors que le plasmide est surenroulé. On dit qu'il est relâché lorsqu'il y a rupture d'un brin, et la rupture des deux brins conduit à un plasmide ouvert appelé linéaire. On peut séparer ces trois formes (surenroulée (S), relâchée (R) et linéaire (L)) par la technique d'électrophorèse sur gel d'agarose. En effet, ces trois formes ont des tailles différentes et ne vont pas migrer à la même vitesse lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique dans le gel d'agarose. On repère leur position grâce à la coloration des gels avec du bromure d'éthidium qui présente une fluorescence dans l'UV. On distingue ainsi les différentes cassures de l'ADN plasmide en fonction de leur position dans le gel d'agarose après qu'il a été irradié.

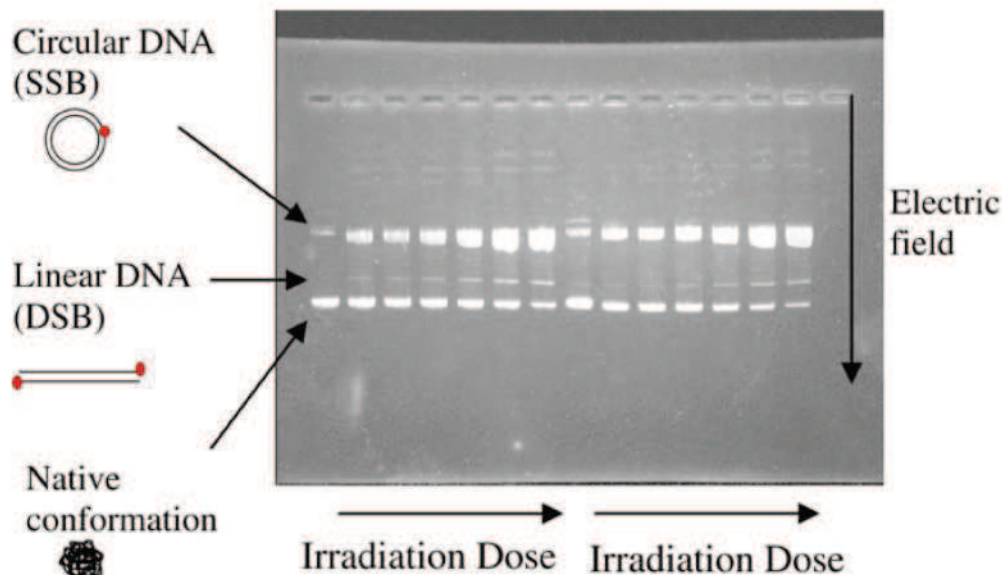


FIGURE 1.20 – Résultat d'une expérience d'électrophorèse sur gel d'agarose [22].

L. Sanche a donc irradié ces ADN plasmide avec des électrons de basse énergie compris entre 0 et 20 eV (ces électrons de basse énergies sont les plus abondantes des particules secondaires [23]) afin de simuler les effets des particules secondaires. Ils ont observés que ces électrons de basse énergie participent à la production de cassures simple et double brin de la molécule d'ADN [21] avec un maximum vers 9 eV (figure 1.20). Même des électrons d'énergie cinétique nulle peuvent induire une cassure simple brin [24]. Ces résultats n'étaient pas prévisible puisque les notions admises voulaient que les effets d'endommagement surviennent à des énergies plus grandes.

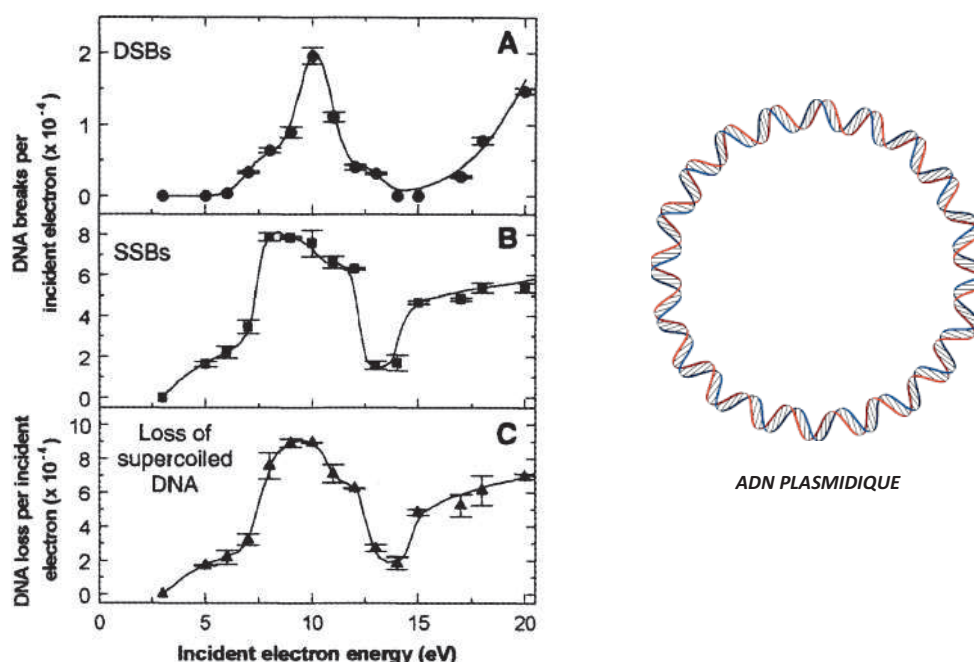


FIGURE 1.21 – Rendements des cassures simple et double brins en fonction de l'énergie du faisceau d'électrons pour l'irradiation d'ADN plasmidique [21].

Par ailleurs, des études ont été menées afin de mesurer la contribution de chacun des deux effets (effets direct et indirect) qui conduisent aux effets d'endommagement sur l'ADN. L'idée était de s'affranchir des effets indirects par l'intermédiaire de certaines molécules qui captent très efficacement les radicaux hydroxyles telles que les composés avec des fonctions thiols R-SH ou le diméthylsulfoxyde. Notamment, l'équipe de S. Adelstein a comparé le rendement de cassures simple et double brin sur de l'ADN plasmide avec ou sans DMSO (figure 1.14) irradié par un faisceau de rayons gamma [15]. Ils ont observé que les cassures simple ou double brin diminuent très fortement en présence de DMSO. Cela suggère que les dégâts sur l'ADN sont causés majoritairement par les effets indirects.

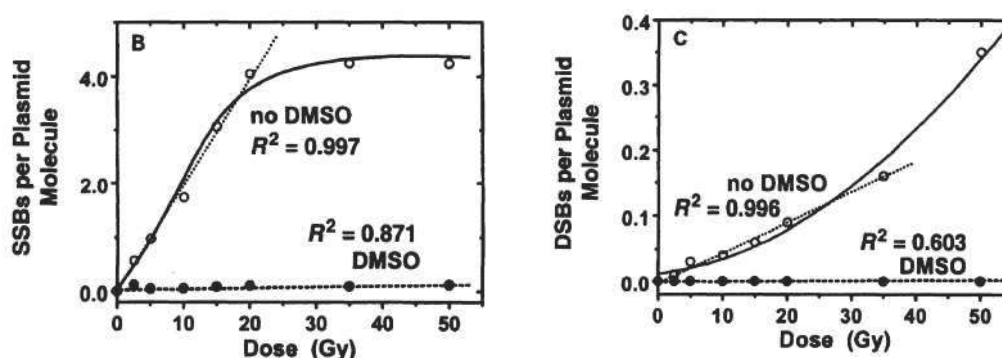


FIGURE 1.22 – Rendements des cassures simple et double brins en fonction de l'énergie d'un faisceau de rayons gamma pour l'irradiation d'ADN plasmidique, avec ou sans DMSO [15].

Cette approche *top-down* pertinente d'un point de vue biologique ne permet d'observer que les conséquences à long terme telles que des cassures simple et double brin de la molécule d'ADN [25] et de les quantifier. Néanmoins, les origines des dommages à l'échelle moléculaire ne sont pas clairement établies en raison de la grande complexité des systèmes étudiés qui ne permet pas d'extraire les origines physico-chimiques de l'endommagement. Cette complexité est également liée au travail en milieu aqueux. Pour avoir accès aux origines physico-chimiques des endommagements, d'autres équipes ont donc décidé de s'intéresser à de petites molécules d'intérêt biologique en phase gazeuse.

1.5 Expériences "*bottom-up*"

Pour pallier aux limitations de l'approche *top-down*, une approche totalement opposée a également émergé depuis une dizaine d'années. Il s'agit de l'approche *bottom-up*, fondée sur des collisions à basse énergie sur des briques constitutives de l'ADN (figure 1.22) isolées en phase gazeuse et dont le but est d'avoir accès aux mécanismes des dégâts d'irradiation au niveau moléculaire [26,27]. En effet, les systèmes irradiés sont largement simplifiés puisque l'interaction se fait uniquement entre le rayonnement ionisant et une "petite" molécule (telle que la thymine) qui de surcroît est en phase gazeuse. On s'affranchit donc des effets du milieu environnant contrairement à l'approche *top down* et on peut comparer aisément les résultats expérimentaux aux calculs de chimie quantique. Avec cette approche, on peut obtenir des informations sur les mécanismes physiques responsables des dégâts sur l'ADN.

Dans le cas de l'irradiation par des électrons de basse énergie les travaux de L. Sanche [28] et T. Mark [29] ont montré qu'il existe un processus d'attachement électronique dissociatif sur des bases nucléiques isolées en phase gazeuse lorsqu'elles sont irradiées avec des énergies proches de celles observées pour la production de cassure simple brin de la molécule d'ADN dans l'approche *top down*. Ces expériences montrent qu'il y a un processus d'attachement électronique dissociatif qui mène à ce type

d'endommagement.

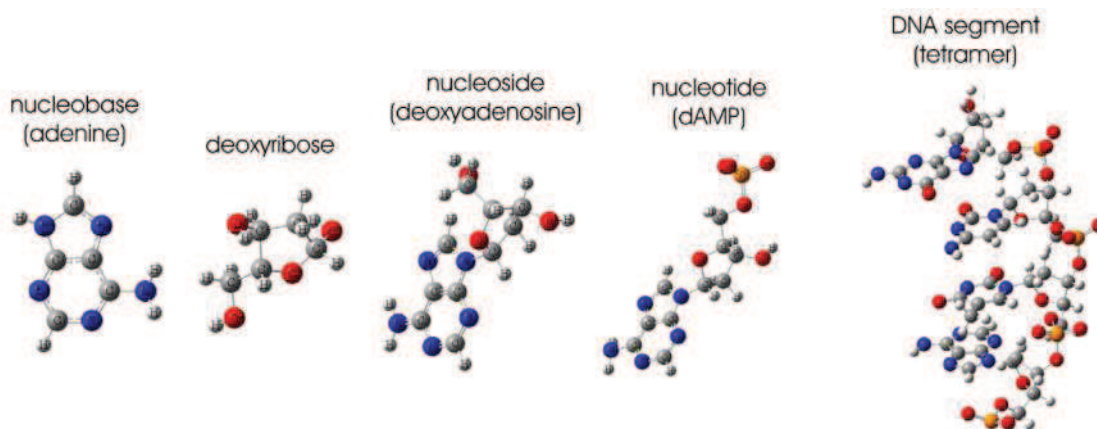


FIGURE 1.23 – Les différentes briques constitutives de la molécule d'ADN [30]

D'autres études ont été réalisées sur les voies de fragmentation des briques constitutives des molécules d'ADN et d'ARN. Ces études ont montré des différences sur la distribution des fragments concernant l'uracile et la thymine suite à une irradiation par des ions carbone simplement chargés de 24 keV [31]. En effet, pour l'uracile, on observe l'absence de grands fragments, liés à la perte d'au moins 1 ou 2 atomes lourds tel que l'oxygène (figure 1.24). Donc, la dynamique de dissociation dépend fortement des propriétés structurales de la molécule cible. Ces spectres de fragmentation permettent de ce rendre compte de l'intérêt d'une telle approche puisqu'on a accès facilement à la dynamique de dissociation. Les mécanismes physiques responsables des dégâts sur le vivant sont mis en évidence grâce à cette approche. L'approche *bottom-up* a donc permis d'extraire des informations à l'échelle moléculaire.

Toutefois, on peut se demander si ces données sont transposables aux conséquences biologiques. En effet, ces systèmes de petite taille par rapport aux systèmes étudiés dans l'approche *top-down* ne sont pas très pertinents d'un point de vue biologique mais intéressant pour les comparer à des calculs de chimie quantique. De plus, les difficultés de mise en phase gazeuse de molécules complexes ont fortement limité cette approche. La quasi-globalité des études menées jusqu'à présent s'est limitée à de petites molécules (bases nucléiques) représentant les briques constitutives des biomolécules présentes dans le milieu cellulaire car la mise en phase gazeuse de molécules isolées se fait habituellement par évaporation d'une poudre pour en former un jet moléculaire effusif.

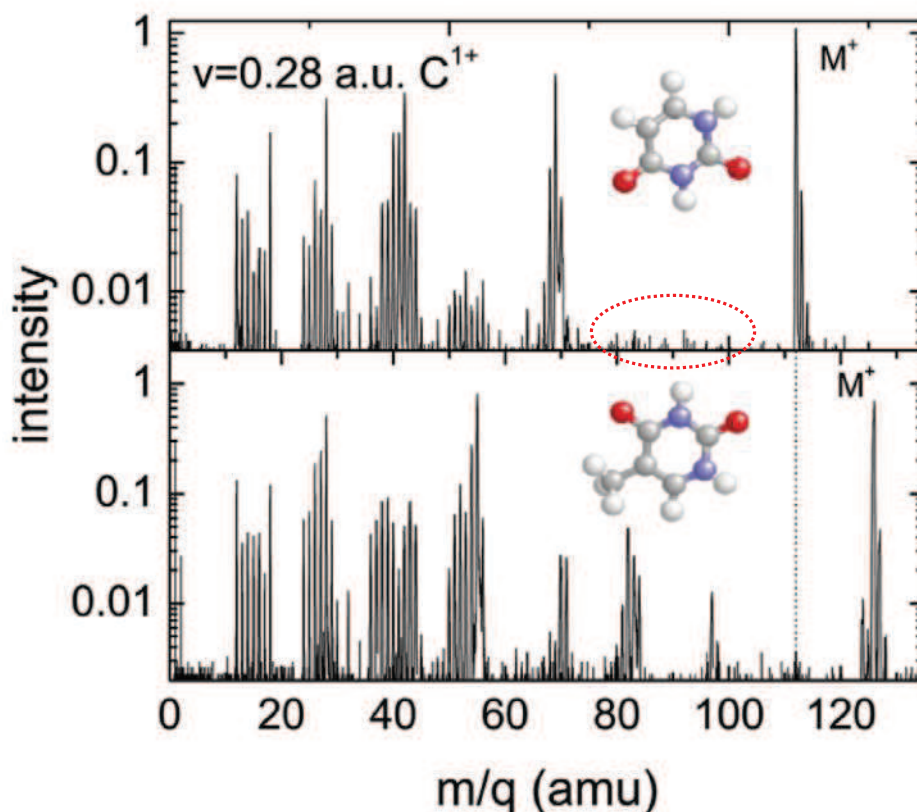


FIGURE 1.24 – Spectre de fragmentation de l’uracile (en haut) et de la thymine (en bas) irradié par un faisceau d’ions carbones simplement chargés de 24 keV. J’ai entouré en rouge les fragments manquants [31].

La pertinence de cette approche repose également sur l’hypothèse que les dynamiques d’ionisation et de dissociation sont similaires pour des molécules isolées et des molécules incorporées dans un environnement biologique. Or, ceci n’est pas nécessairement le cas. En effet, des études en solution aqueuse ont montré que les énergies verticales pour les briques constitutives de l’ADN sont altérées [32, 33]. De plus, le transfert d’énergie d’excitation au milieu environnant la molécule n’est pas pris en compte dans cette approche.

Pour répondre à la problématique de l’absence d’environnement de l’approche *bottom-up*, quelques études ont été menées en tentant de simuler un environnement aqueux. C’est notamment le cas pour l’étude de l’adenosine 5’-monophosphate (AMP) hydraté, endommagé suite à une collision sur un jet d’atomes neutres (Ne, Na) à 50 keV [34]. Les collisions de l’ordre du keV avec des constituants de l’ADN permettent l’étude de la fin du pic de Bragg. On peut voir sur la figure 1.25, le spectre obtenu après irradiation en fonction du nombre de molécules d’eau entourant AMP[−]. On constate que le spectre dépend fortement du nombre de molécule d’eau. Notamment, à partir de 13 molécules d’eau, AMP[−] ne se fragmente plus. On comprend alors que l’environnement joue un rôle important et est donc indispensable pour la compréhension des origines physico-chimiques des endommagements.

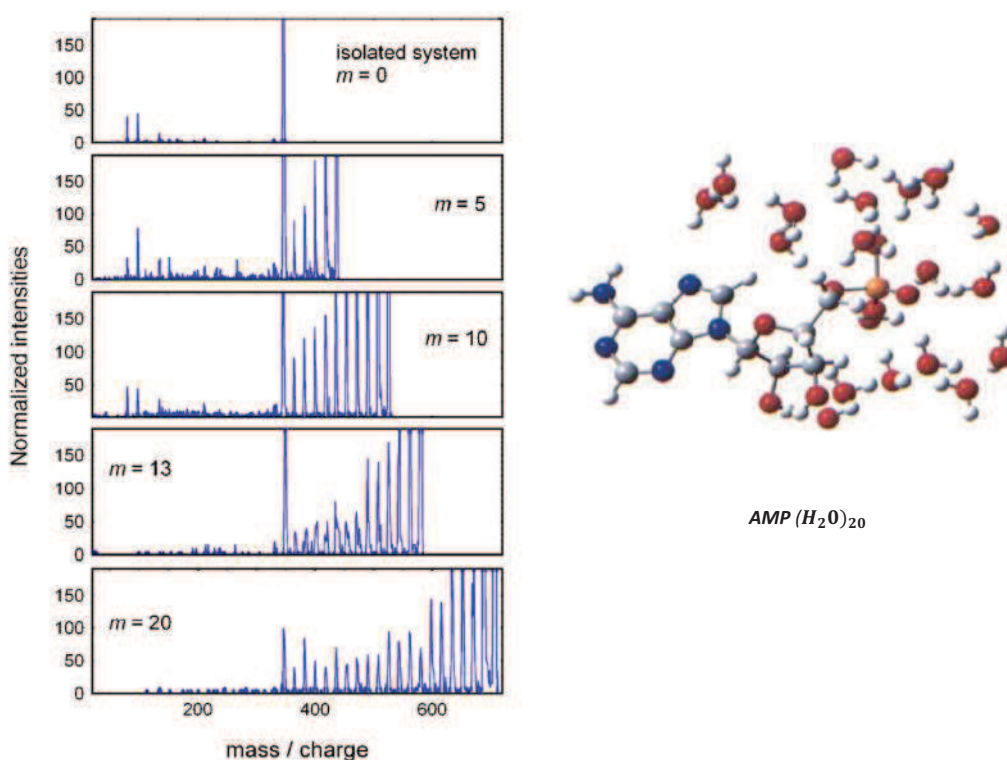


FIGURE 1.25 – Spectre de fragmentation de la molécule d’adenosine 5’-monophosphate irradiée par un jet d’atomes de sodium neutres à 50 keV en fonction du nombre de molécules d’eau attachées [34].

Cependant, ce dernier résultat ne permet pas de simuler un environnement biologique pertinent. En effet, ici les quelques molécules d’eau agissent comme un tampon d’énergie et non pas comme un producteur de radicaux libres crédibles d’un point de vue biologique. Donc, quelques molécules d’eau ne suffisent pas à simuler le milieu environnant de la molécule. Il permet de constater que la prise en compte d’un environnement affecte la dynamique de fragmentation. Dans l’idéal il faudrait irradier des brins d’ADN en phase aqueuse et analyser les résultats en phase gazeuse pour avoir accès aux mécanismes d’endommagement à l’échelle moléculaire. Il en résulte donc, que ces expériences *bottom-up* qui, a contrario de celles précédemment présentées, permettent d’extraire une multitude de données sur les processus physiques d’endommagement des systèmes étudiés, se sont révélées inutiles pour extrapoler leurs résultats à l’explication de conséquences biologiques observables lors d’une irradiation.

1.6 Alternative aux expériences "*top-down*" et "*bottom-up*"

Les approches *top-down* et *bottom-up*, n'ont pas permis de mettre clairement en évidence les origines des dommages, à l'échelle moléculaire. En effet, l'approche *top-down*, a uniquement permis de mettre en exergue les conséquences biologiques liées à l'irradiation telles que les cassures simple et double brin de la molécule sans déceler les causes étant donné la grande complexité des systèmes étudiés. L'approche *bottom-up* a mis en évidence des processus physiques à l'échelle moléculaire mais sans pouvoir extrapoler les résultats aux conséquences biologiques observables puisque les systèmes étudiés étaient de petite taille (briques constitutives de la molécule d'ADN) et sans environnement biologique (irradiation en phase gazeuse).

Au cours de cette thèse, j'ai développé un dispositif expérimental permettant l'ouverture d'une voie alternative et originale, qui combinera les avantages des deux approches classiques précédentes : étude en phase condensée de biomolécules pertinentes (telles que des brins d'ADN) et compréhension des processus à l'échelle moléculaire par l'utilisation de techniques d'analyse en phase gazeuse.

Cette nouvelle approche repose sur le couplage d'une expérience de mise en phase gazeuse de grandes biomolécules par désorption laser non-résonnante sur microgouttelettes (que je vais décrire dans le chapitre suivant) et d'une plateforme d'irradiation par des ions simplement chargés de basse énergie. La plateforme d'irradiation, ainsi que son couplage à l'expérience de mise en phase gazeuse seront présentées dans le chapitre 4.

Dans le chapitre suivant, après une brève description des différents sources de mise en phase gazeuse dite classiques, je vais expliquer pourquoi notre choix s'est porté sur le développement d'une source de mise en phase gazeuse reposant sur une désorption laser non-résonnante sur micro-gouttelettes, et je vais détailler le fonctionnement d'une telle source.

Chapitre 2

Mise en phase gazeuse de biomolécules

CHAPITRE 2 : Mise en phase gazeuse de biomolécules

Pour comprendre la fonction biologique d'une molécule, il faut avoir accès à sa structure tridimensionnelle car ces deux données sont intimement liées. On le constate dans le cas de la maladie d'Alzheimer, causée notamment par un mauvais repliement d'une protéine active (amyloïde). La structure tridimensionnelle est donc une donnée essentielle pour établir un lien avec l'activité biologique.

Cependant, les molécules peuvent adopter différentes structures selon leur environnement. La structure dite native, est celle adoptée dans le milieu biologique. C'est cette structure qui est pertinente d'un point de vue biologique car c'est celle-ci qu'on peut relier à la fonction biologique. Les structures en phase condensée sont obtenues le plus souvent par cristallographie X ou par résonance magnétique nucléaire (RMN). Des modèles théoriques ont été développés pour les comparer aux résultats expérimentaux. Or, pour ces modèles, en plus des interactions intramoléculaires il faut prendre en compte les interactions intermoléculaires. Ceci constitue un vrai challenge d'un point de vue théorique étant donné la complexité des systèmes étudiés et ces modèles sont donc souvent peu pertinents.

C'est dans ce contexte qu'ont émergé les études en phase gazeuse, qui permettent de développer plus facilement des modèles car dans cette phase le système est considérablement simplifié du fait qu'on s'affranchit des effets d'environnement, donc des interactions intermoléculaires. Ainsi, l'absence de solvant nous donne accès aux propriétés intrinsèques de la molécule. Dans cette phase "simplifiée", on peut également manipuler facilement les espèces ioniques par des champs électrostatiques, les piéger dans des pièges à ions, les thermaliser et les interroger par spectroscopie laser pendant des échelles de temps allant jusqu'à la seconde. Tout ceci n'est pas permis en phase condensée. Donc, en plus des modèles théoriques plus simples, les techniques d'analyses en phase gazeuse offrent plus de flexibilités pour avoir accès à des informations structurales.

Cependant, on peut se poser la question de savoir si la structure adoptée en phase gazeuse est proche ou non de la structure en phase condensée, donc de la structure native. Le processus de mise en phase gazeuse peut en effet être un processus un peu trop "violent". Si la structure adoptée en phase gazeuse est très différente de la structure native, alors l'information structurale ne peut pas être corrélée à la fonction biologique. C'est pour cette raison que, depuis plusieurs dizaines d'années, des équipes ont développé des sources de mise en phase gazeuse qui ont pour but de préserver au mieux la structure native afin de rester pertinent d'un point de vue biologique. Je présente par la suite, les sources de mise en phase gazeuse conventionnelles et j'explique pourquoi nous avons

choisi de développer notre propre source de mise en phase gazeuse.

2.1 Les sources de mise en phase gazeuse classiques

La mise en phase gazeuse permet de transférer un échantillon initialement sous forme liquide ou solide en phase gazeuse, soit par évaporation, soit par désorption. Les premières sources permettant de transférer des molécules en phase gazeuse étaient très énergétiques et destructrices, en raison de la grande quantité d'énergie transférée aux molécules à étudier [35]. Ainsi, il était impossible de s'intéresser à des molécules d'intérêt biologique. Il aura fallu attendre les années 80-90, pour voir se développer des sources telles que l'Electrospray (ESI), et l'Ionisation/Désorption laser assistée par matrice (Maldi), qui ont permis de mettre en phase gazeuse et d'ioniser des molécules d'intérêt biologique sans les fragmenter [36], et même en gardant intactes des liaisons non covalentes telles que les liaisons hydrogènes, responsables notamment de la structure secondaire. Je vais d'abord présenter ces sources de mise en phase gazeuse dites "classiques". Ensuite, je présenterai une nouvelle source "alternative" développée au cours de ma thèse.

2.1.1 Sublimation

A tout échantillon liquide ou solide correspond une pression de vapeur saturante. Il existe un équilibre à la surface de l'échantillon entre les molécules qui sont désorbées par agitation thermique et celles qui sont adsorbées. Une augmentation de la température produit une élévation non-linéaire de la pression de vapeur saturante, d'après la formule de Claypeyron :

$$\frac{dP}{dT} = \frac{L}{T\Delta V} \quad (\text{Equation 2.1})$$

où P est la pression de vapeur, T la température, L la chaleur latente et ΔV la variation du volume molaire. On peut en augmentant la température mettre un échantillon en phase gazeuse. Cependant, cette technique n'est adaptée qu'à des molécules qui sont thermiquement stables, autrement dit qui doivent posséder une énergie de dissociation plus élevée que celle nécessaire pour être désorbées de l'échantillon. On ne peut mettre en phase gazeuse que des molécules contenant moins de 20 atomes environ, comme des bases de l'ADN, telles que la thymine, l'adénine et la cytosine [37].

Cette technique n'est toutefois pas adaptée à des molécules de haut poids moléculaire ou à des molécules qui sont thermiquement fragiles. Ceci représente donc pour nos études une trop grande limitation.

2.1.2 Electrospray

L'électrospray (ou électronébulisation) est une technique, mise au point par J.B. Fenn (prix nobel de chimie de 2002) [38], qui permet de mettre en phase gazeuse des molécules de grandes tailles multi-protonées, de manière douce. Les premiers spectres de masse présentés par l'équipe de Fenn en 1988 lors d'une conférence montraient des pics d'ions multichargés de l'alcool déshydrogénase (jusqu'à 45+) possédant une masse de 40000 Da (figure 2.1).

Le processus de mise en phase gazeuse par électronébulisation peut être décrit en trois étapes :

1. formation de gouttelettes chargées à l'extrémité d'un capillaire métallisé
2. évaporation du solvant et explosions coulombiennes des gouttelettes
3. obtention d'espèces ioniques en phase gazeuse

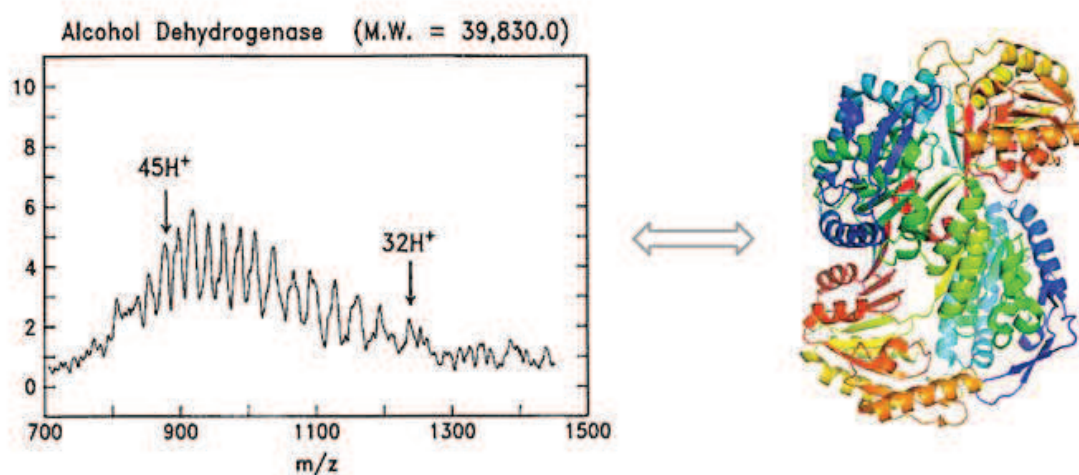


FIGURE 2.1 – Spectre de masse d'alcool déshydrogénase produit par électrospray. Figure tirée de la référence [39]. A droite du spectre est représentée la structure d'un alcool déshydrogénase humain cristallisé obtenue par Rayon X.

1) Formation des gouttelettes chargées à l'extrémité d'un capillaire métallisé :

La solution est introduite dans un capillaire grâce à une seringue. Ce capillaire est porté à un fort potentiel électrique de plusieurs kilovolts. Cette différence de potentiel entre ce capillaire et une contre électrode, placée quelques millimètres en aval, entraîne les cations à l'extrémité du capillaire (dans le cas où le capillaire est porté à un potentiel positif), tandis que les anions vont se déplacer dans le sens inverse en s'accumulant à l'intérieur du capillaire.

Cette séparation des cations et des anions induit la formation d'un cône de Taylor par répulsion électrostatique à l'extrémité du capillaire. Ce cône est conservé tant qu'il y a un équilibre entre les forces électrostatiques et la tension de surface. Il suffit alors d'une faible augmentation du champ électrique pour rompre le cône de Taylor en fines gouttelettes multichargées. Par la suite, les gouttelettes chargées se déplacent sous l'action conjuguée du champ électrique et d'un gradient de pression qui s'applique entre la source et l'entrée d'un spectromètre de masse.

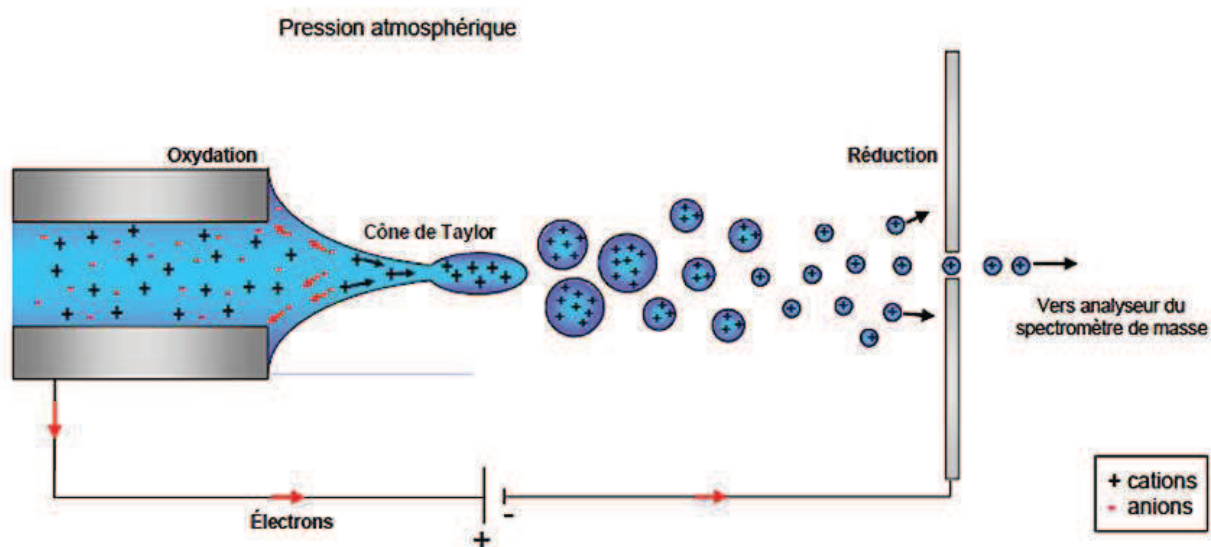


FIGURE 2.2 – Principe de l'électrospray. Les cations sont attirés vers la contre-électrode, et les anions vers le capillaire. Cette séparation de charges produit une déformation sous la forme d'un cône de Taylor. Par la suite, des explosions coulombiennes surviennent lorsque la limite de Rayleigh est atteinte [40].

2)Evaporation du solvant et explosions coulombiennes :

Les gouttelettes multichargées entrent en collision avec le gaz résiduel et subissent une évaporation du solvant en gardant un nombre de charges constant. Dans certaines sources, la température peut être augmentée pour rendre plus efficace l'évaporation du solvant. La diminution du rayon R des gouttelettes, qui possèdent une charge q constante, conduit à la limite de Rayleigh. A partir de cette limite, la gouttelette devient instable, et on observe l'émission de jets très fins de gouttelettes plus petites (*figure 2.2*). Ce phénomène se reproduit lorsque les nouvelles gouttelettes atteignent à leur tour la limite de Rayleigh, donnée par :

$$q_{Ry} = 8\pi(\epsilon_0\gamma R^3)^{1/2} \quad (\text{Equation 2.2})$$

où q_{Ry} est la charge à la limite de Rayleigh, ϵ_0 la permittivité du vide, R le rayon de densité de charges et γ la tension de surface. Une explosion coulombienne se traduit par la production de gouttelettes plus petites.

Cette explosion coulombienne est optimale lorsque les gouttelettes ont une tension superficielle non modifiée par des tensio-actifs. C'est pour cette raison qu'il est nécessaire d'éviter d'utiliser tout détergent lors de la préparation d'un échantillon étudié avec une source ESI. On peut ajouter que la désorption se fait mieux pour les analytes hydrophobes que pour les analytes hydrophiles. En effet, les analytes hydrophobes moins solubles dans l'eau de la gouttelette, migreront plus facilement en périphérie de la gouttelette, et se désorberont en premier.

3) Obtention d'ions en phase gazeuse

Deux mécanismes encore en débat peuvent expliquer le phénomène de désorption. Le premier est le modèle des résidus chargés ou << Charged Residue Model >> (CRM) qui est décrit par Dole en 1968 et étendu par Röhlgen [41]. Dans ce modèle on considère qu'une succession d'explosions coulombiennes conduit à des gouttelettes chargées de plus en plus petites jusqu'à ce que la dernière ne contienne qu'un seul ion (*figure 2.3 a*). Le second mécanisme, proposé en 1979 [42], est appelé le modèle de l'évaporation ionique ou << Ion Evaporation Model >> (IEM). Dans ce modèle comme dans celui du CRM, des explosions coulombiennes se succèdent, sauf qu'ici des ions peuvent être expulsés directement en phase gazeuse alors qu'il y a plusieurs ions dans une gouttelette (*figure 2.3 b*). Iribane et Thomson proposent que lorsque les gouttelettes obtiennent un rayon de l'ordre de 10 nm, et une densité de charge élevée, l'expulsion des ions en phase gazeuse est possible. L'électrospray produit en règle générale des espèces fortement protonées ou déprotonées.

Aujourd'hui il est établi que dans le cas des molécules de tailles importantes, c'est le modèle du CRM qui donne les meilleures estimations.

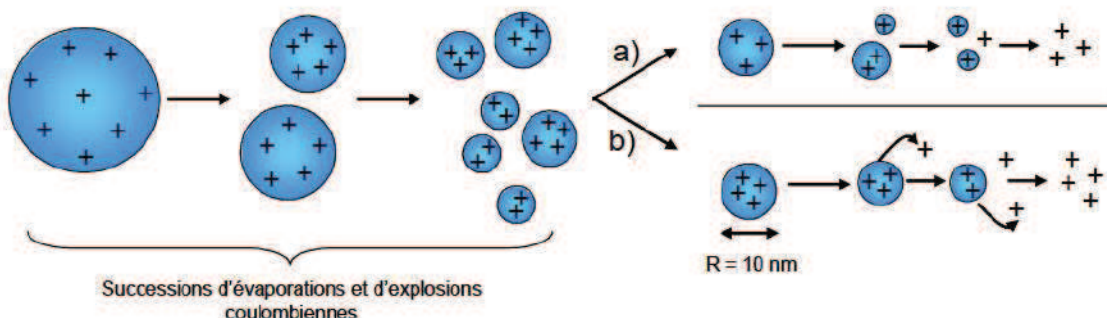


FIGURE 2.3 – Les deux mécanismes suggérés pour l'obtention d'ions désolvatés en phase gazeuse (a) Modèle des résidus chargés proposé par Dole (b) Modèle de l'évaporation ionique proposé par Iribane et Thomson. [40].

Nous avons utilisé cette technique de mise en phase gaz dans les expériences menées au CLUPS, à Orsay, pour l'étude des hydroxypyridines protonées (Annexe A).

Il existe une version optimisée de l'électrospray : le nano-electrospray (nanoESI). Le nanoESI fut développé en Allemagne à l'EMBL (European Molecular Biology Laboratory) au milieu des années 90 par Matthias Wilm et Matthias Mann [43]. La technique, proche de l'ESI, consiste à introduire un faible volume d'échantillon (2-3 μl) dans une aiguille métallisée qui possède un orifice de sortie de l'ordre de 1 à 2 μm de diamètre. On applique une différence de potentiel entre cette aiguille et une contre-électrode placée quelques millimètres plus loin, et cela génère un fin spray de gouttelettes avec un débit évalué à 20-100 $\text{nl}\cdot\text{min}^{-1}$. La différence de potentiel appliquée est de quelques centaines de volts contre quelques milliers de volts pour l'ESI.

L'avantage du nanoESI par rapport à l'ESI, est que c'est une technique qui consomme moins de produit, puisque quelques μl à une concentration de l'ordre du μM suffisent à obtenir un spectre de masse. Cela est très intéressant si on désire travailler avec des espèces qui sont disponibles en faible quantité, ce qui est le cas pour de nombreuses protéines. Un second avantage repose sur sa sensibilité. Il est admis que le nanoESI est 100 fois plus sensible que l'ESI. Cela provient du faible diamètre de sortie de l'aiguille permettant de former des gouttelettes très petites et donc de former plus rapidement des ions en phase gazeuse puisque le volume de solvant à évaporer est moindre.

Néanmoins, le nanoESI présente un inconvénient majeur : sa reproductibilité. Le diamètre de l'aiguille ne peut pas être contrôlé avec précision, or ce diamètre joue un rôle important sur la taille initiale des gouttelettes, qui elle-même jouera sur le spectre obtenu, en particulier l'état de charge des ions et l'intensité des différentes espèces dans le spectre.

Pour nos études, on désire irradier des molécules d'intérêts biologiques en solution, pour ensuite les transférer en phase gazeuse de la manière la plus douce possible, afin de préserver au mieux la structure adoptée en solution. Or, avec l'électrospray, la fragmentation est importante, car une phase d'accélération des ions se fait à pression atmosphérique (le libre parcours moyen pour des molécules d'air à pression atmosphérique est de 93 nm). Les collisions à pression atmosphérique sont donc nombreuses. De plus, les ions produits sont multichargés, ce qui implique une forte répulsion électrostatique, et provoque un changement de la structure présente en solution (déploiement). On peut ajouter également le fait qu'il n'est pas aisé d'irradier en solution les molécules d'intérêts biologiques puisqu'elles sont dans un capillaire. Pour ces raisons, cette technique de mise en phase gazeuse n'est pas suffisamment douce et n'est pas adaptée à nos études d'endommagement.

2.1.3 Maldi

La technique MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) a été introduite en 1988 par Karas et Hillenkamp [44]. Ils ont présenté le spectre d'une enzyme de masse 116900 Da. C'était la molécule la plus lourde jamais étudiée en spectrométrie de masse. Cette technique repose sur l'incorporation de biomolécules dans une matrice. Un faisceau laser envoyé sur la matrice est absorbé, ce qui génère l'éjection des biomolécules en phase gazeuse. La figure 2.4 illustre ce principe.

En ce qui concerne la phase de préparation de l'échantillon, la substance à étudier est co-cristallisée avec une matrice de molécules absorbant dans l'UV (un composé généralement aromatique), et déposée sur une plaque métallique appelée cible MALDI. L'échantillon peut aussi être piégé dans de fines poudres de matériaux légers [45].

L'étape de l'ionisation/désorption est réalisée par un laser pulsé émettant dans l'UV. Le laser le plus utilisé est le laser à azote qui irradie à 337 nm. On place le mélange sous vide (10^{-10} mbar), et on l'irradie avec un laser par des impulsions nanosecondes. La matrice étant 10000 fois plus concentrée que l'analyte, c'est elle qui absorbe la majeure partie du rayonnement. La matrice est ainsi ionisée, et elle se désexcite ensuite de 2 manières : soit par voie radiative (émission d'un photon), soit par voie non radiative (augmentation de son énergie ro-vibrationnelle). C'est dans ce dernier cas de figure que la matrice joue son rôle. Étant donné que la matrice est co-cristallisée avec les molécules de l'analyte, il y a un transfert énergétique vers les molécules de l'analyte, ce qui engendre la sublimation des cristaux de matrice puis l'expansion en phase gazeuse d'un nuage moléculaire. Finalement, pendant l'expansion, l'analyte s'ionise par transfert de protons de la matrice vers l'analyte.

Ainsi les molécules sont désorbées et ionisées. La matrice sert de relais énergétique entre le laser et l'analyte, sans quoi l'irradiation du laser provoquerait la destruction des molécules de l'analyte. Le choix de la matrice dépend de l'espèce à étudier. Par exemple, pour analyser des peptides, c'est l'acide α -cyano-hydroxycinnanique qui est le plus utilisé, alors que pour des composés de haute masse moléculaire comme les protéines, c'est l'acide sinapinique qui est le mieux adapté. En effet, le poids moléculaire de l'acide sinapinique (224 Da) qui est plus important que l'acide α -cyano-hydroxycinnanique (189 Da), conduit à un bruit de fond qui empêche de détecter des peptides avec une masse proche de 1000 ce qui explique que l'on privilégie l'acide α -cyano-hydroxycinnanique pour l'étude de ces derniers.

La dernière étape consiste à extraire les ions produits par une différence de potentiel, afin de les amener dans un analyseur par temps de vol. Toutefois, les espèces produites en phase gazeuse ont une distribution de vitesse large, ce qui est un problème pour la résolution, lorsqu'on couple le MALDI à un spectromètre de masse à temps de vol. C'est pour cette raison que dorénavant, une grande majorité de spectromètres à temps de vol possèdent une extraction retardée qui a pour principe d'appliquer une impulsion électrique typiquement de 300 ns [46, 47] après avoir produit les espèces, pour améliorer la résolution. Nous avons utilisé ce type d'extraction dans notre spectromètre de masse et je décrirai en détail son fonctionnement par la suite (voir chapitre 3 section 3.1.3.3).

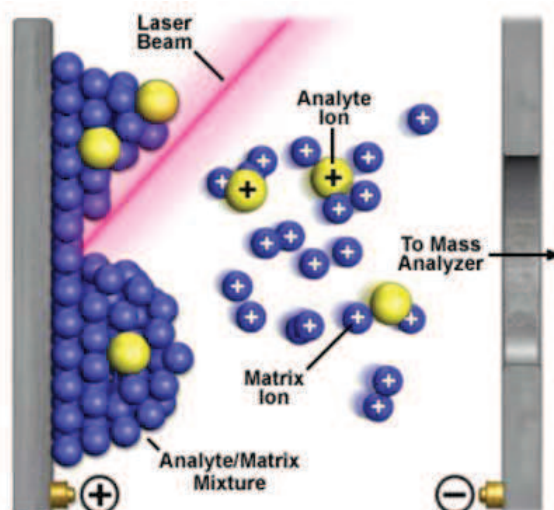


FIGURE 2.4 – Schéma de principe du MALDI. L'irradiation de la matrice par un laser UV engendre une expansion en phase gazeuse. Un transfert de proton de la matrice vers l'analyte permet d'ioniser ce dernier [48].

Cette technique génère essentiellement des espèces simplement protonées, ou simplement déprotonées. C'est à la fois un inconvénient technique et un avantage majeur pour la thématique. Un inconvénient technique en ce qui concerne la détection des molécules de grandes tailles par spectrométrie de masse, puisque plus les molécules ont des états de charge faibles plus le détecteur doit posséder une gamme de masse importante. Un avantage majeur pour notre thématique dans le but de préserver au mieux la structure native, puisque les effets de répulsion coulombienne sur la structure adoptée par les molécules en phase gazeuse sont faibles [49]. Des espèces neutres sont produites également par le même processus, on parle alors de MALD.

A l'instar de l'électrospray, cette technique est considérée comme une méthode de mise en phase gazeuse "douce". Elle produit cependant un taux de fragmentation élevé [50, 51]. C'est pour cette raison que certains groupes utilisent la technique MALDI avec un laser IR, dans le but de diminuer le taux de fragmentation, en particulier pour des systèmes tels que les protéines [52].

Toutefois, avec la technique MALDI, la prise en compte d'un environnement pertinent biologiquement n'est pas possible, puisque les molécules sont co-cristallisées dans une matrice. Pour nos études, cela représente un inconvénient majeur puisqu'on veut s'approcher au plus des conditions physiologiques du vivant.

2.1.4 Désorption laser ultra-douce sur jet liquide sous vide

Ce type de source de mise en phase gazeuse a été développé par deux groupes, celui de B.Brutschy [53] en Allemagne, et celui de T.Kondow [54] au Japon. Les molécules à étudier sont dissoutes dans de l'eau ou dans de l'alcool. Un jet liquide (contenant les molécules à étudier) est généré sous vide par injection du solvant à travers un orifice de 10 à 20 μm de diamètre à des pressions de 10 à 100 bars, avec une vitesse de propagation du jet de 10 à 100 m.s^{-1} . Un piège refroidi à l'azote liquide (77 K) est situé à 10 cm en aval du jet, pour obtenir un vide aux alentours de 10^{-6} mbar dans l'enceinte expérimentale. La figure 2.5 présente le schéma du montage.

Les ions moléculaires, après absorption par le jet liquide d'une impulsion laser (soit UV, soit IR) sont éjectés sous vide. Les ions, après leur désorption du jet, sont analysés par un spectromètre de masse de type temps de vol.

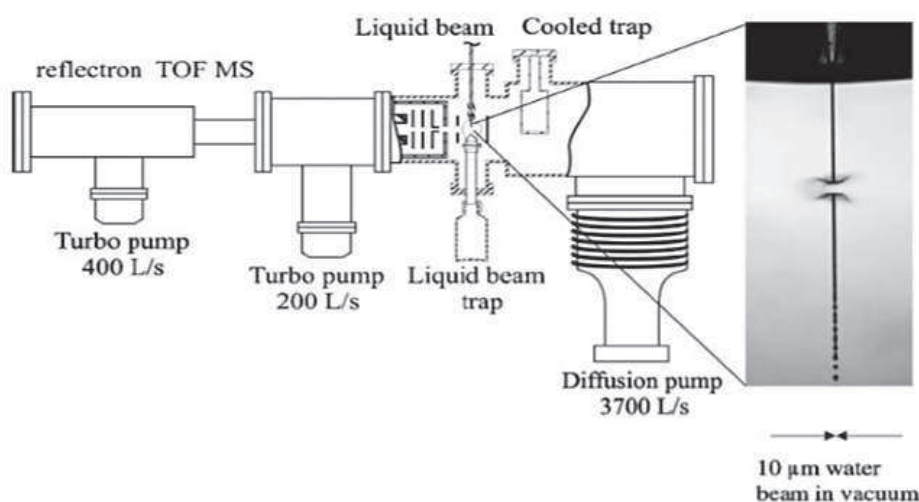


FIGURE 2.5 – Schéma d'un montage expérimental de désorption sur jet liquide (figure tirée de la référence [55])

Cette technique présente plusieurs avantages pour l'étude de molécules d'intérêts biologiques en phase gazeuse. En effet, les ions produits ont des états de charge très faibles contrairement à l'électrospray : un ou deux protons sont ajoutés ou enlevés. Cela a pour effet de minimiser les interactions électrostatiques et donc de limiter le déploiement des molécules en phase gazeuse. De plus, en optimisant les conditions de focalisation et d'intensité laser, la technique LILBID présente un taux de fragmentation très faible. Des complexes non-covalents spécifiques, de peptides et d'ADN, ont pu être détectés intacts [56,57]. Il n'est donc pas impossible que la structure native soit conservée en partie lors de la désorption. Contrairement à la technique MALDI, où la prise en compte d'un environnement biologique n'est pas permise, puisque l'échantillon à étudier est co-cristallisé dans une

matrice, ici cela est rendu possible, et donc présente une pertinence biologique crédible. Tous ces avantages font que la technique LILBIB est l'une des méthodes de désorption les plus douces qui existent. Cependant, cette technique est très consommatrice en produits en raison du jet continu. Une amélioration a été développée pour réduire la quantité de produits : elle consiste à travailler non plus avec un jet liquide mais avec des micro-gouttelettes. C'est sur cette technique que repose la source que nous avons développée et que je décrirai dans la section 2.2.

2.1.5 Synthèse des techniques décrites

La sublimation et la désorption par impact d'ions sont des techniques simples à mettre en œuvre mais ne permettent pas de s'intéresser à des molécules d'intérêts biologiques de hauts poids moléculaire. En effet, la sublimation ne permet de mettre en phase gazeuse que des molécules contenant moins de 20 atomes. De plus, le processus de mise en phase gazeuse de cette technique est "violente".

Pour l'ESI, l'étude de molécules d'intérêt biologique de haut poids moléculaire est possible. Toutefois, si on souhaite préserver au mieux la structure adoptée en solution sous forme gazeuse, elle n'est pas idéale. Les ions sont produits à pression atmosphérique, et l'activation de la molécule avec le gaz résiduel est donc importante. De plus, les états de charge sont élevés, ce qui implique une forte répulsion coulombienne. Enfin, cette technique n'est pas adaptée à nos études d'endommagement puisque nous ne pouvons pas irradier des molécules en phase liquide, car dans cet état, elles sont dans un capillaire.

Le MALDI ou le MALD, pourrait être une technique de mise en phase gazeuse intéressante pour les systèmes biologiques que l'on souhaite étudier. En effet, des molécules de grande taille peuvent être transférées en phase gazeuse (jusqu'à 500000 Da). L'activation très importante en ESI, est limitée pour le MALDI, car les ions sont produits directement sous vide. Avec le MALDI, les ions sont essentiellement monochargés, donc la répulsion électrostatique est faible, contrairement à l'ESI. Malgré un processus de mise en phase gazeuse considéré comme doux, le MALDI ne permet cependant pas de prendre en compte convenablement l'environnement (l'eau) dans lequel se trouvent les molécules d'intérêts biologiques. Cela constitue un inconvénient majeur pour l'extrapolation de résultats à des fins biologiques. On peut également ajouter comme inconvénient le problème de reproductibilité avec cette technique. Ceci fait donc que cette technique n'est pas adaptée à nos études sur l'irradiation en solution de molécules d'intérêts biologiques.

La désorption sur jet liquide permet de garder les avantages des sources ESI et MALDI, tout en éliminant leurs principaux inconvénients. La désorption est réalisée directement sous vide, les états de charge sont faibles, le taux de fragmentation est minime et il est possible de travailler dans un environnement biologiquement pertinent. Ces avantages font que la technique LILBID est l'une des techniques de mise en phase gazeuse les plus douces qui existe. Toutefois, en raison du jet liquide, le rendement d'ions rapporté à la consommation de produits est très faible. Pour pallier ce problème, Brutschy a mis au point la désorption laser ultra-douce sur micro-gouttelettes [58]. Nous avons développé une source de ce type pour réaliser nos expériences.

2.2 Désorption laser ultra-douce sur micro-gouttelettes sous vide

2.2.1 Principe général de l'expérience

La source que nous avons développée repose sur une désorption laser sur des micro-gouttelettes (LILBID pour Laser-Induced Liquid Bead Ionization /Desorption) directement sous vide avec une détection des ions désorbés par spectrométrie de masse. Cette technique a été développée à l'origine par le professeur Brutschy à Francfort [58]. Sur la figure 2.6, on peut voir l'expérience dans son ensemble, séparée en trois parties distinctes : la source, la zone de temps de vol libre (zone vol libre) et le détecteur. Dans ce chapitre, la source est décrite de manière précise. Dans le chapitre 3, l'analyseur par temps de vol sera exposé en détail.

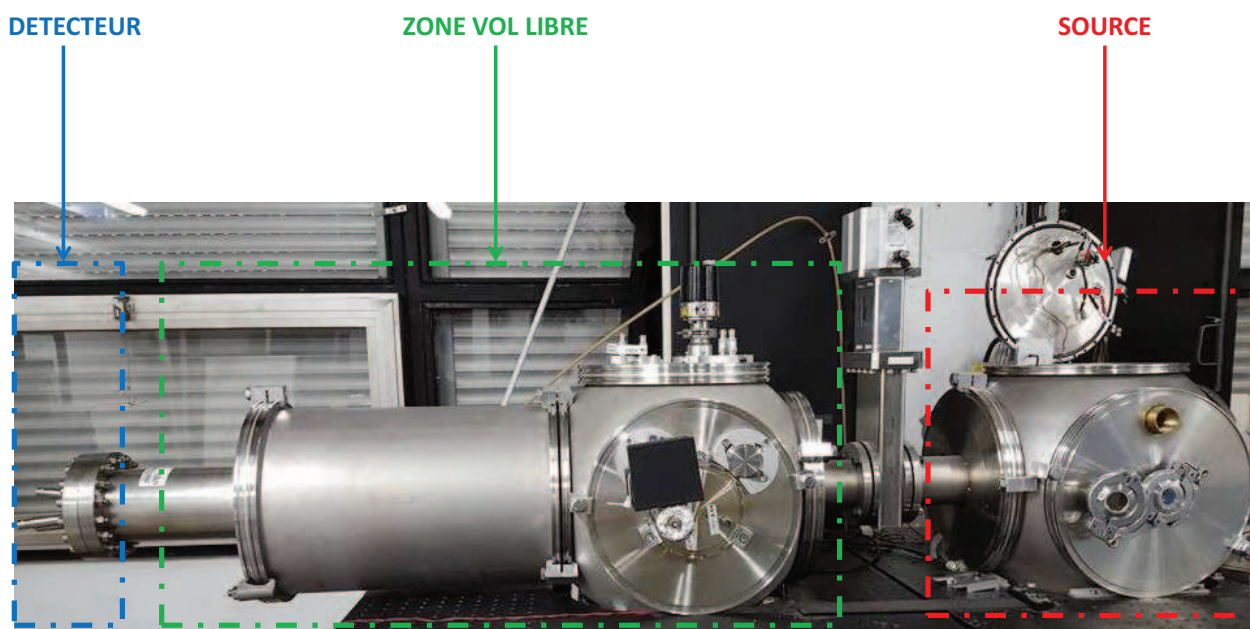


FIGURE 2.6 – Photographie de l'expérience. En rouge, la source, en vert, la zone de temps de vol libre (zone vol libre) et en bleu le détecteur.

Dans cette source, on dissout les molécules à étudier dans un solvant (dans notre cas, un mélange eau/diméthylsulfoxyde), à une concentration de l'ordre de $100\text{ }\mu\text{M}$. Un réservoir contenant ce mélange est relié à un dispenseur, qui permet de générer à la demande des micro-gouttelettes avec une taille de $50\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre. Ceci correspond à un volume de 65 pL . Ces micro-gouttelettes sont envoyées dans une chambre où règne un vide secondaire (10^{-6} mbar), après être passées au travers d'étages de pompage différentiel. De manière similaire au jet liquide, un laser IR centré sur une bande d'absorption du solvant est focalisé sur les micro-gouttelettes (voir figure 2.7, à droite). Ces dernières explosent après absorption du rayonnement IR, ce qui conduit à la désorption sous vide des molécules à

étudier.

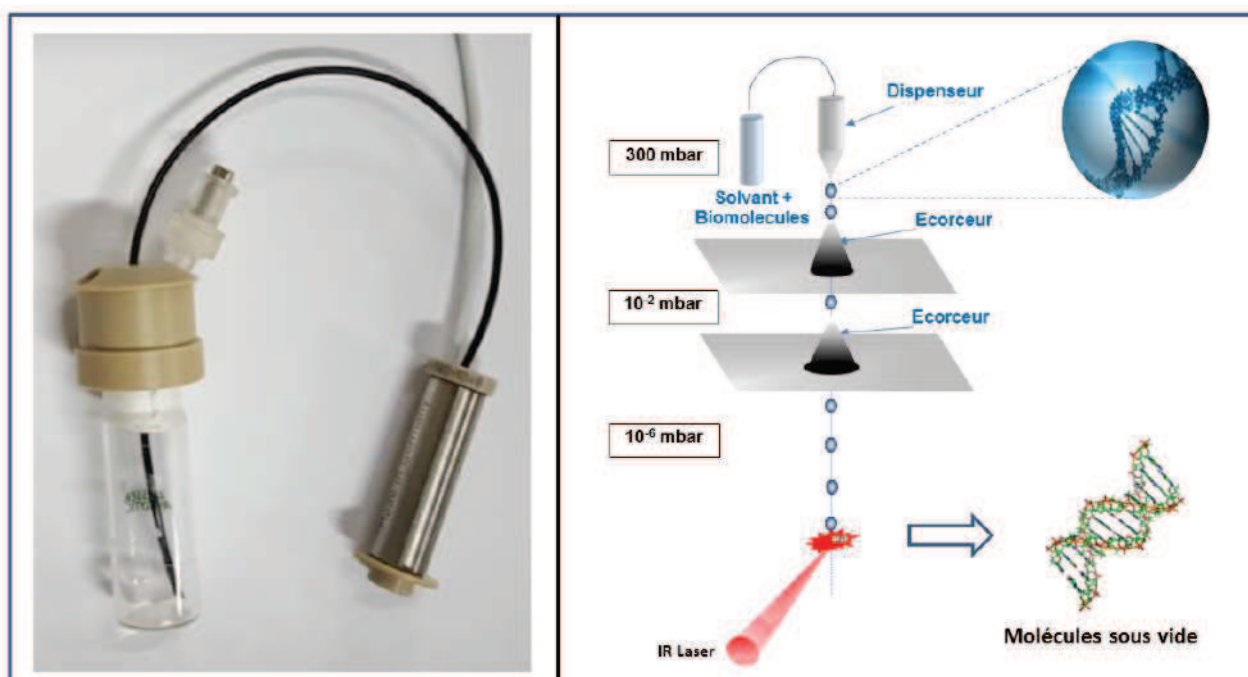


FIGURE 2.7 – A gauche, photo du dispenseur connecté à une fiole de 5 ml. A droite, j’ai représenté la source. Les micro-gouttelettes extraites du dispenseur dans une chambre à 300 mbar, sont mises en phase gazeuse grâce à un laser IR. Les molécules sont désorbées sous vide.

Sur la figure 2.8, le spectre d’absorption de l’eau est représenté, ainsi que les modes excités par notre laser IR. La zone de désorption est localisée entre deux plaques portées à des potentiels différents. On dirige ainsi les molécules désorbées dans un spectromètre de masse par temps de vol pour les analyser en masse.

Les concentrations utilisées ici sont 100 fois plus importante de celles utilisées pour l’électrospray. Cette technique a permis de mettre en phase gazeuse des molécules de haut poids moléculaire, telles que l’amyloïd bêta [59] (polypeptide composé de 40 à 42 acides aminés intervenant dans la maladie d’Alzheimer) ou encore, des oligonucléotides ayant une masse supérieure au Méga Dalton [60,61]. Contrairement à l’électrospray, la technique LILBID est plus tolérante à la présence de sels ioniques, ce qui est intéressant pour l’étude de protéines transmembranaires insolubles sans détergents [62]. Un des grands avantages de cette source concerne son processus de désorption, qui est l’un des plus doux existants. En effet, elle a permis de préserver des complexes spécifiques de protéines intacts [63,64] et des complexes ARN-ligand [65], qui étaient initialement en solution.

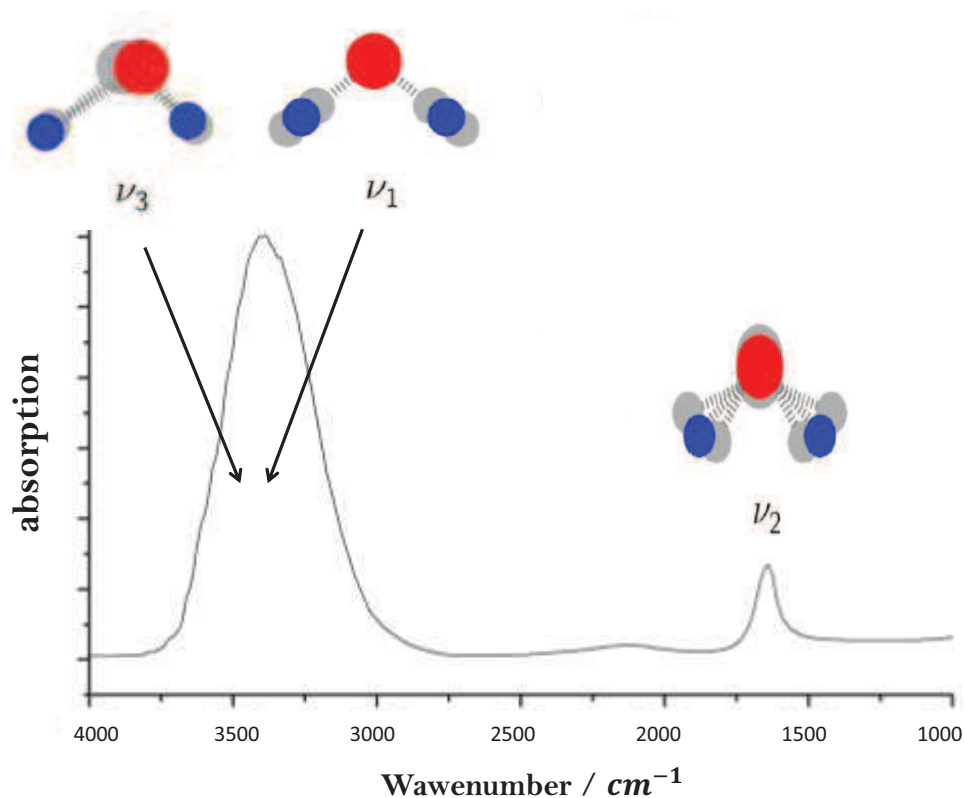


FIGURE 2.8 – Spectre d'absorption de l'eau. Le laser excite 2 modes de vibration de la liaison OH : le mode d'élongation symétrique ν_1 à 3652 cm^{-1} , et le mode d'élongation antisymétrique ν_3 à 3756 cm^{-1} .

En plus d'augmenter significativement le rendement d'ions rapporté à la consommation de produit, les micro-gouttelettes gardent tous les avantages du jet liquide :

1. Mise en phase gazeuse extrêmement douce
2. Tolérance par rapport à l'utilisation de sels destinés à solubiliser certaines molécules
3. Tendence à conserver certaines propriétés de la phase liquide
4. Faibles états de charge des molécules désorbées

L'une des difficultés de cette technique de désorption réside toutefois dans l'obtention de micro-gouttelettes stables sous vide. De plus, il faut éviter l'évaporation et la congélation du liquide qui peut se produire aux pressions basses. Dans les parties suivantes, je vais vous présenter la façon dont nous avons produits ces micro-gouttelettes stables sous vide, puis la façon dont nous provoquons la désorption des molécules d'intérêt biologique présentes dans les micro-gouttelettes.

2.2.2 Le pompage différentiel

Notre source est composée de trois parties distinctes séparées entre elles par des écorceurs. La partie la plus haute, celle contenant le générateur de micro-gouttelettes, est appelée la chambre "générateur", la partie juste en-dessous est la chambre intermédiaire, et la partie la plus basse est la chambre principale. La chambre générateur est couplée à une pompe primaire, la chambre intermédiaire à une pompe turbo, elle-même connectée à une pompe primaire et la chambre principale à une pompe magnétique d'un débit de 1600 l.s^{-1} soutenue par une pompe primaire. La figure 2.9 schématise les trois chambres avec leur pressions respectives.

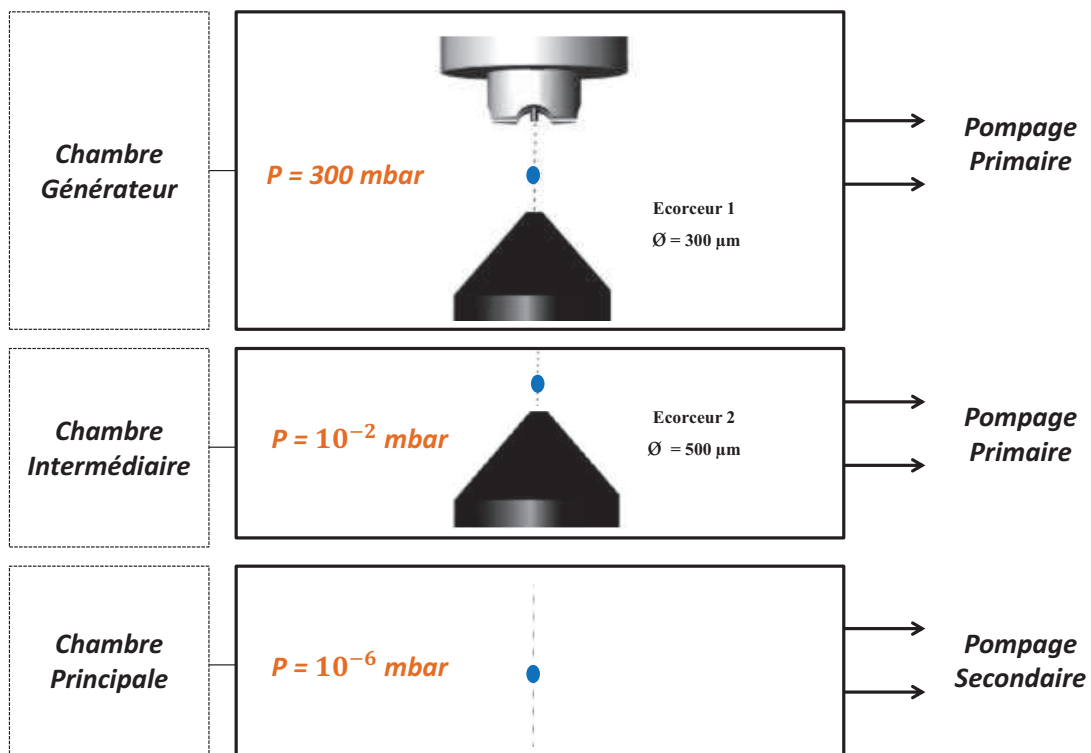


FIGURE 2.9 – Le pompage différentiel est obtenu par l'intermédiaire des écorceurs. Une micro-gouttelette (pas à l'échelle) est représentée dans chaque chambre

Les différences de pression entre les différentes chambres proviennent du faible diamètre des trous des écorceurs. Les écorceurs 1 et 2 ont des diamètres respectifs de $300 \mu\text{m}$ et $500 \mu\text{m}$. L'intérêt du pompage différentiel est de pouvoir passer d'une haute pression à une basse pression le plus rapidement possible afin d'éviter l'évaporation et la congélation des micro-gouttelettes. La partie la plus délicate concerne la chambre générateur. Pour générer des micro-gouttelettes dans cette chambre, il est nécessaire que la pression de vapeur saturante du solvant soit plus faible que la pression de la chambre. Notre objectif

initial était d'utiliser de l'eau comme solvant. Or, la pression de vapeur saturante de l'eau est de 27 mbar, alors que la pression atteinte dans la chambre générateur sur une journée d'expérience était de l'ordre de 10^{-1} mbar. Il a donc fallu modifier cette pression pour rester au-dessus de 27 mbar. Cela a été réalisé à l'aide d'une micro-fuite dont l'ouverture a été réglée pour maintenir une pression d'environ 300 mbar dans la chambre générateur (la limite basse de fonctionnement correspondant à une pression de 250 mbar). Les gouttelettes d'eau obtenues dans ces conditions se sont cependant révélées être trop instables pour pouvoir être guidées jusqu'à la chambre principale. Ceci est très certainement lié à la faible viscosité de l'eau qui rend l'éjection des micro-gouttelettes difficile, et à la conception du dispenseur utilisé, qui est censé fonctionner à pression atmosphérique.

Des tests ont donc été réalisés avec un autre solvant organique, le DMSO (diméthylsulfoxyde) qui a une pression de vapeur saturante de 5.10^{-1} mbar, bien plus faible que celle de l'eau, et une viscosité de 1.996 cP, bien plus grande que celle de l'eau (tableau 2.1). De plus, le DMSO présente une forte bande d'absorption dans l'IR, autour de $3.3 \mu\text{m}$, correspondant aux modes de vibration d'élongation CH. Il est donc bien adapté à notre laser IR de désorption. C'est un solvant peu onéreux, et il permet de dissoudre la plupart des composés organiques d'intérêt biologique. Toutes ces caractéristiques permettent au DMSO d'être un solvant intéressant pour caractériser cette source. Cependant, il ne présente aucune pertinence biologique et représente même un handicap majeur pour l'étude des effets indirects impliqués dans les phénomènes d'endommagement, car il neutralise très efficacement les radicaux libres. Nous verrons dans le chapitre 4 que nous apportons actuellement des modifications à notre source afin de remédier à cet inconvénient et de l'adapter à nos futures études d'irradiation.

Caractéristiques	EAU	DMSO
Pression de vapeur saturante	30 mbar	5.10^{-1} mbar
Viscosité dynamique	80.10^{-2} cP	1.996 cP

TABLE 2.1 – Valeurs de la pression de vapeur saturante et de la viscosité dynamique à 293 K pour les deux solvants constituant les micro-gouttelettes.

En travaillant avec des mélanges d'eau et de DMSO, nous avons pu observer des gouttelettes stables dans la chambre principale. Cependant, le manque de pertinence biologique du DMSO nous conduit progressivement à modifier notre dispositif pour travailler avec de l'eau uniquement. Dans la suite, je décris comment nous produisons ces micro-gouttelettes, et les techniques de visualisation qui permettent de les observer.

2.2.3 Génération de micro-gouttelettes

Le dispenseur, qui est un générateur de micro-gouttelettes, a été acheté chez la société allemande Microdrop. Ce dispenseur commercial donne des résultats très satisfaisants en terme de stabilité. Son principe de fonctionnement est le suivant : le liquide passe dans un capillaire en verre d'un diamètre de $100\text{ }\mu\text{m}$, et ce capillaire est entouré d'un matériau piézoélectrique. Si une impulsion électrique est envoyée sur ce dernier, cela provoque la contraction du piézoélectrique, et une onde de choc est envoyée au capillaire, qui finalement transmet cette onde de choc au liquide. Des micro-gouttelettes d'un diamètre environ égal à celui de la sortie du capillaire ($50\text{ }\mu\text{m}$), sont produites. Sur la figure 2.10, on voit l'évolution de la formation d'une micro-gouttelette lorsqu'une impulsion électrique est envoyée au capillaire.

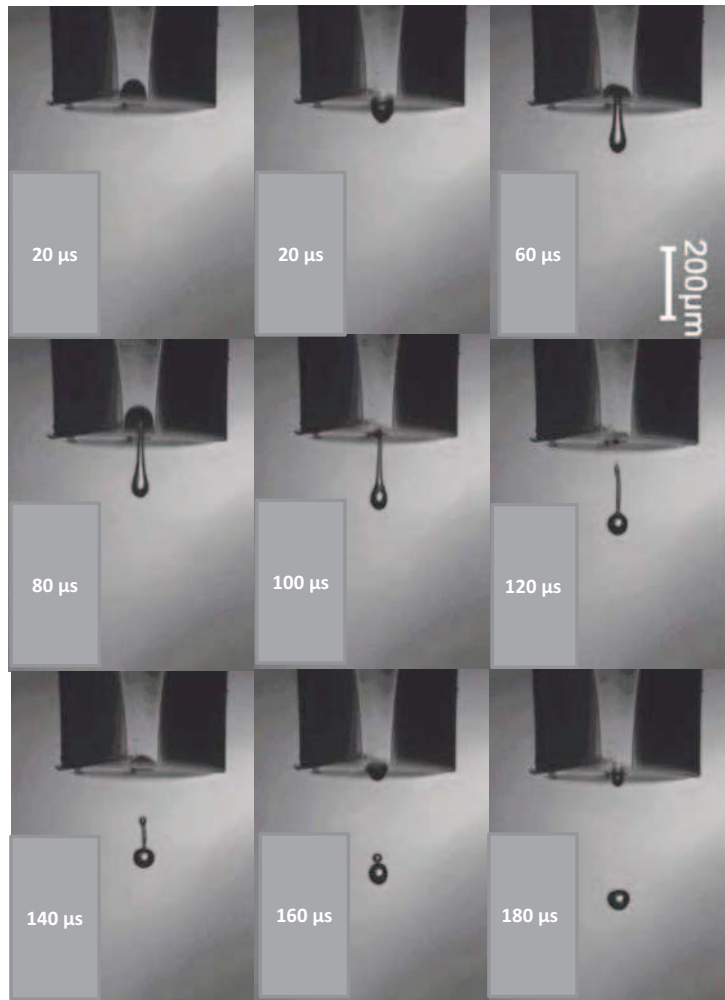


FIGURE 2.10 – Création d'une micro-gouttelette. A $t = 0\text{ s}$, une impulsion est envoyée sur le capillaire. A $t=180\text{ }\mu\text{s}$ une micro-gouttelette est éjectée [66]

L'impulsion électrique à envoyer pour générer des micro-gouttelettes stables dépend

fortement de la viscosité et de la température du liquide. Les conditions d'éjection dépendent donc du solvant utilisé. Nous avons vu que, pour des raisons de stabilité, nous utilisons du DMSO. Dans l'objectif de nous rapprocher d'un environnement biologique, nous avons progressivement ajouté de l'eau au DMSO. La plupart du temps, nous utilisons un mélange eau/DMSO dans les proportions suivantes : $\frac{1}{4}$ d'eau et $\frac{3}{4}$ de DMSO. Pour ce mélange, l'impulsion qu'il faut produire doit être de 1.5 V sur une durée de 30 μ s, afin de produire des micro-gouttelettes stables. Les impulsions sont produites grâce à un générateur d'impulsions (GINI conçu et fabriqué par l'atelier électronique du laboratoire ISMO à Orsay) piloté par une interface Labview. D'autres proportions du couple eau/DMSO nous ont permis d'obtenir des micro-gouttelettes stables sous vide. Les valeurs requises de l'impulsion en fonction des proportions de solvant sont recensées dans le tableau 2.2.

Mélange eau/DMSO	Tension	Durée
$\frac{1}{4}/\frac{3}{4}$	1.5 V	30 μ s
$\frac{1}{2}/\frac{1}{2}$	1.2 V	34 μ s
$\frac{3}{4}/\frac{1}{4}$	1.3 V	37 μ s

TABLE 2.2 – Caractéristique tension/durée des impulsions permettant l'obtention de micro-gouttelettes stables sous vide.

Tous ces mélanges permettent d'obtenir des micro-gouttelettes proprement éjectées, c'est-à-dire une micro-gouttelette stable toutes les 50 ms (cette durée est adaptée à la fréquence de 20 Hz de la chaîne laser utilisée pour la désorption des micro-gouttelettes). Néanmoins, nous avons constaté expérimentalement que le mélange idéal est le premier du tableau. Pour les autres mélanges, à un moment donné, le dispenseur commence à produire plusieurs micro-gouttelettes à la fois, voire finit par se boucher.

Une fois la micro-gouttelette générée, il faut adapter la position et l'inclinaison du dispenseur pour qu'elle traverse successivement les deux écorceurs qui séparent la chambre générateur de la chambre principale. Ceci nécessite une visualisation de la micro-gouttelette le long de sa trajectoire, et notamment au niveau des deux écorceurs. C'est cette méthode de visualisation que je vais maintenant décrire.

2.2.4 Méthode de visualisation

La visualisation de la micro-gouttelette en différents points de sa trajectoire se fait à travers des hublots portés par une des brides de l'enceinte (figure 2.11).

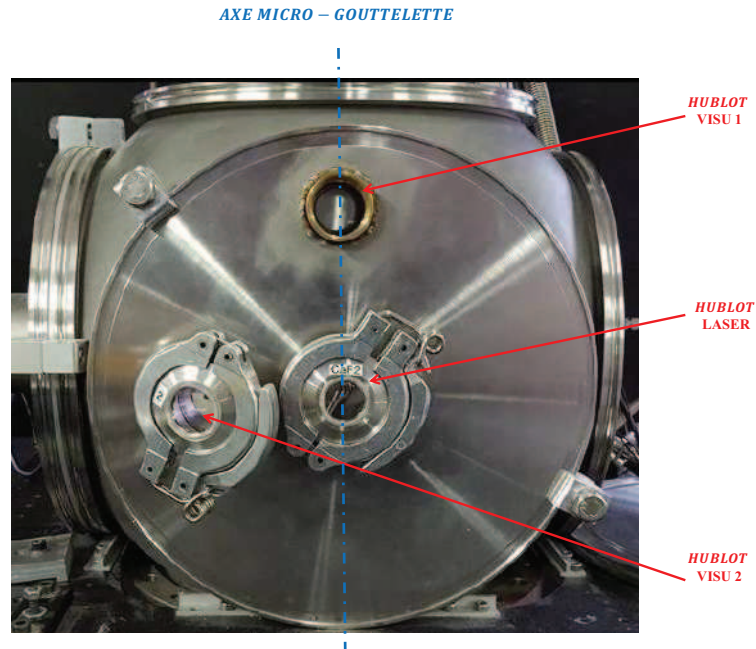


FIGURE 2.11 – Photo de la bride supportant les hublots de visualisation. La bride possède trois hublots : le hublot "*VISU 1*" permet de visualiser la micro-gouttelette dans la chambre "générateur", "*LASER*", sur le même axe, permet l'entrée du laser IR dans l'enceinte, et le hublot "*VISU 2*" permet la visualisation de la micro-gouttelette dans la chambre principale.

Ces différents hublots donnent optiquement accès à différents points remarquables de la trajectoire de la micro-gouttelette, dans la chambre générateur et dans la chambre principale. Les figures 2.12 à 2.14 permettent de visualiser ces différents points à l'intérieur de l'enceinte. La figure 2.12 présente une vue d'ensemble de l'intérieur de la source.

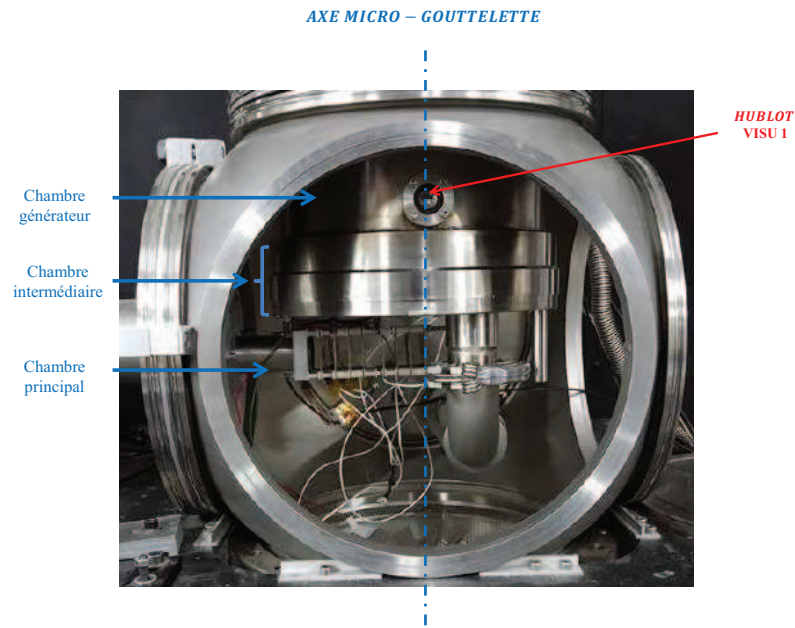


FIGURE 2.12 – Photographie de la partie source sans la bride portant les hublots.

Sur la figure 2.13, la pièce comprenant la chambre "générateur" et la chambre intermédiaire sont montées séparément du reste de la source. Le hublot est celui de la chambre générateur et permet de visualiser l'écorceur 1 (hublot "VISU 1"). Sur la figure 2.14, la bride appartenant à la partie inférieure de la chambre intermédiaire a été enlevée afin de pouvoir visualiser la profondeur de cette chambre. L'écorceur 2 est fixé sur cette bride. Dans notre expérience, nous n'avons aucun accès optique à cette chambre intermédiaire.

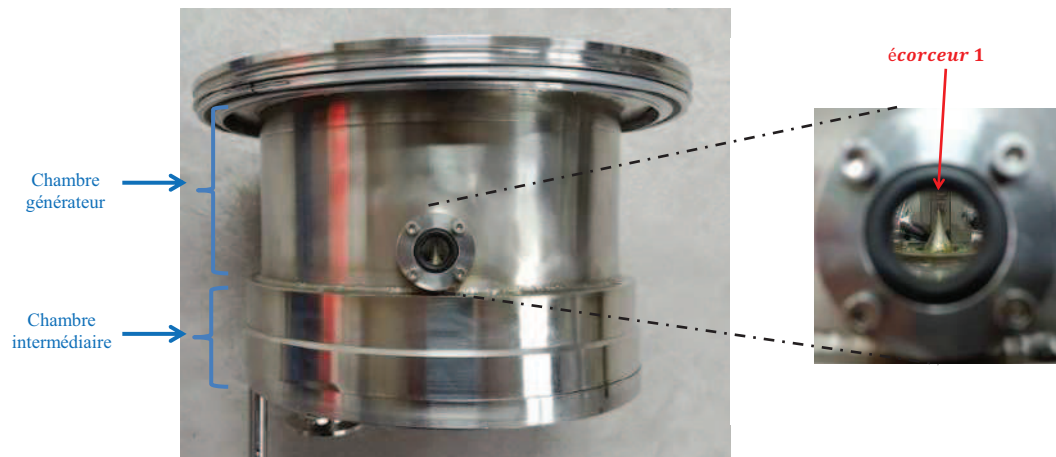


FIGURE 2.13 – Photographie de la pièce comprenant la chambre "générateur" et la chambre intermédiaire. Le zoom permet de voir clairement l'écorceur 1 dans la chambre générateur



FIGURE 2.14 – Photographie permettant d’observer l’intérieur de la chambre intermédiaire. A droite, on voit la bride qui ferme le dessous de la chambre intermédiaire. L’écorceur 2 repose sur cette bride

Les micro-gouttelettes éjectées ont une vitesse de l’ordre de 20 m.s^{-1} . On suit leur progression dans la chambre ”générateur” et principale par le biais de caméras CCD (situées à l’extérieur de l’enceinte) qui font face à des diodes pulsées (en phase de réglage, la fréquence à laquelle ces diodes sont pulsées est de 25Hz , soit un flash tous les 40 ms ce qui permet une observation confortable. En phase d’acquisition, cette fréquence est celle imposée par le laser de désorption, soit 20 Hz). Ces diodes sont placées devant le passage des micro-gouttelettes. On a fait le choix de visualiser les micro-gouttelettes par transmission et non par réflexion dans le but d’obtenir un meilleur contraste avec les diodes. Ces diodes sont synchronisées sur l’éjection des micro-gouttelettes. On peut faire varier le délai entre l’impulsion de la diode et l’impulsion du dispenseur. Cela permet de voir les micro-gouttelettes à différents moments, donc à différents endroits. Un système optique est réalisé dans les deux chambres afin d’obtenir un grandissement suffisant. Dans la chambre ”générateur”, il y a deux diodes pulsées : l’une en face de la sortie du capillaire, et l’autre en face du sommet de l’écorceur 1. Un système de deux lentilles convergentes est placé dans la chambre pour obtenir un grandissement de 4 (figure 2.15).

La lentille la plus proche de l’écorceur 1 est montée sur une platine de translation verticale. Elle permet de visualiser la micro-gouttelette de la sortie du capillaire jusqu’au sommet de l’écorceur 1. L’autre lentille est dans un barillet solidaire de l’enceinte, dans l’axe du hublot de visualisation ”VISU 1”. Les focales, ainsi que les positions des lentilles, sont données sur la figure 2.16. L’encombrement dans la chambre ”générateur” ne permet pas de placer la caméra CCD à l’intérieur de la chambre. Elle fait face au hublot ”VISU 1”. Cette caméra est de la marque BAUMER avec des temps d’exposition allant de $4 \mu\text{s}$ à 60 000 ms . Toutes les impulsions électriques sont fournies par un générateur d’impulsion électriques où la valeur et la durée de l’impulsion sont réglables. Cela permet de mesurer le délai entre l’impulsion électrique envoyée au dipenseur et le flash de la diode et donc d’en déduire la vitesse des micro-gouttelettes. La caméra CCD est également pulsée

à 25 Hz et synchronisée sur l'éjection des micro-gouttelettes. On peut régler le temps d'exposition de la caméra et la durée du pulse de la diode afin d'améliorer le contraste de l'image. Pour un bon contraste, la durée du pulse est de $2\text{ }\mu\text{s}$. Étant donné que la persistance rétinienne garde sur la rétine l'image pendant 40 ms (25 Hz), et que les diodes sont justement pulsées à 25 Hz en phase de réglage, on a l'impression de voir une gouttelette en lévitation (effet stroboscopique).

En ce qui concerne la visualisation dans la chambre principale, l'encombrement est encore plus important. En effet, la présence d'un système d'extraction qui permet de guider les espèces ioniques issues de la désorption laser et d'un tombac relié à la pompe turbo permettant de faire le vide dans la chambre intermédiaire, prennent beaucoup de place (figure 2.12). Pour cette chambre nous disposons de deux hublots placés à la même hauteur (le hublot "*VISU 2*" et le hublot "*LASER*", figure 2.11), mais distants de quelques cm sur l'horizontale. le hublot "*LASER*" permet l'accès du laser IR dans la zone d'interaction et le hublot "*VISU 2*" permet la visualisation de la micro-gouttelette dans cette même zone d'interaction. Pour visualiser la micro-gouttelette, la diode doit être légèrement inclinée pour que le trajet de la lumière émise ne soit pas confondu avec l'axe laser. Deux miroirs de l'autre côté de la micro-gouttelette sont nécessaires pour décaler le trajet de la lumière émise par la diode afin de ressortir par le hublot "*VISU 2*" (voir figure 2.16).

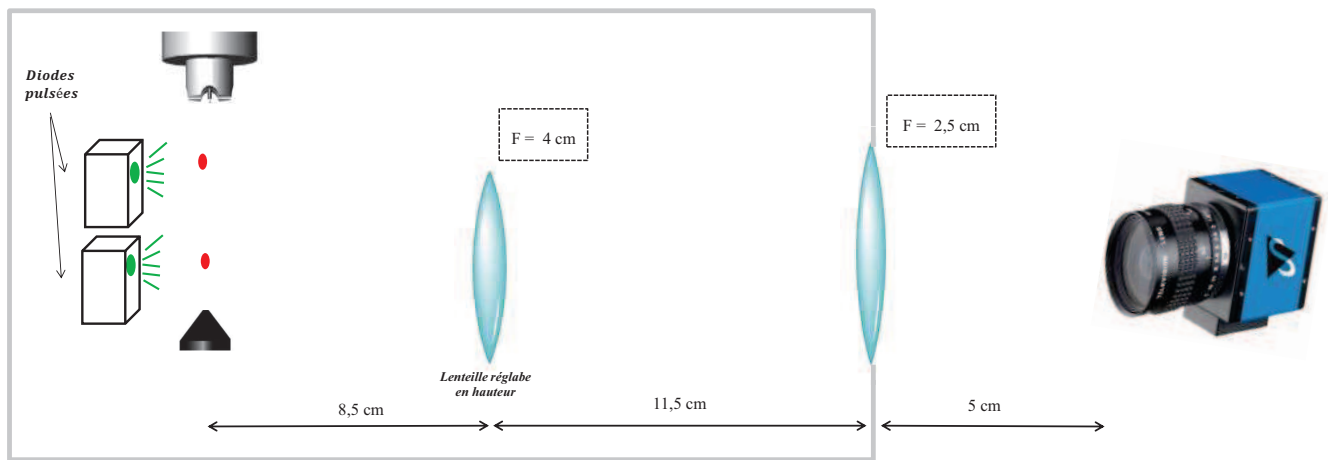


FIGURE 2.15 – Dispositif de visualisation de la micro-gouttelette dans la chambre générateur. La distance entre le dispenseur et l'écorceur est de 10 mm (cette distance peut être modifiée). La lentille montée sur la platine de translation a une étendue qui permet de suivre la micro-gouttelette depuis sa sortie du dispenseur jusqu'à son entrée dans l'écorceur 1.

Concrètement, une diode pulsée éclaire la micro-gouttelette. Cette lumière est réfléchi

par un premier miroir M1, puis par un deuxième miroir M2. Ensuite, le faisceau lumineux traverse une lentille convergente de focale 4 cm, et finalement traverse le hublot "VISU 2" pour terminer son chemin sur la caméra CCD. Cette caméra CCD n'a pas besoin d'être pulsée (c'est la diode qui est pulsée). Elle est composée d'un barillet dans lequel se trouve une lentille de courte focale pouvant être translatée. La mise au point est effectuée au préalable grâce à un fil d'étain placé suivant l'axe des micro-gouttelettes au niveau de la zone d'interaction. Le grandissement obtenu est de 4.

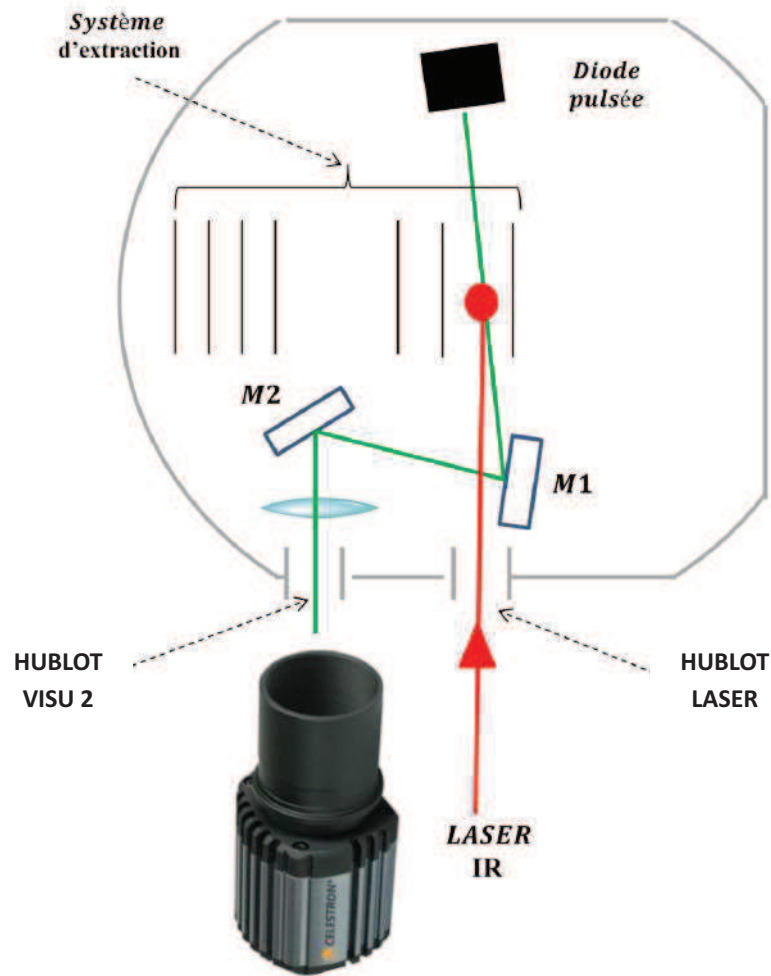


FIGURE 2.16 – Dispositif de visualisation des micro-gouttelettes dans la chambre principale. Vue de dessus. Le faisceau de la diode en vert, après avoir traversé M1 et M2, traverse la lentille. Le tombac n'est pas représenté sur le schéma afin de ne pas surcharger celui-ci.

2.2.5 Transfert des micro-gouttelettes dans la chambre principale

Une fois que les systèmes de visualisation sont réglés, l'étape suivante consiste à transférer les micro-gouttelettes sous vide secondaire. Le transfert des micro-gouttelettes de la chambre générateur où règne une pression de 300 mbar à la chambre principale où la pression est de 10^{-6} mbar, chambres séparées par une série d'écorceurs de 300 μm et 500 μm , n'est pas simple. En effet, aligner mécaniquement deux écorceurs de quelques centaines de μm de manière précise au 1/100 de mm est une tâche complexe. Pour cela, des empreintes ont été réalisées, pour positionner les écorceurs l'un en face de l'autre. De plus, des perturbations sont générées par le pompage différentiel, or la position de la micro-gouttelette doit être suffisamment stable (écart latéral de moins de 100 μm après un parcours de 10 cm, et écart temporel de moins de 2 μs après 5 ms de vol) afin de pouvoir désorber avec le laser les micro-gouttelettes à chaque impulsion (20 Hz). Pour permettre le transfert des micro-gouttelettes, il a fallu que le dispensateur puisse être mobile dans le plan horizontal. Ceci est réalisé par des montures piézoélectriques qui ont une précision de l'ordre du nm. Ces platines de translation permettent de positionner très précisément la sortie du dispensateur au-dessus du premier écorceur. De plus, des platines d'angle permettent d'aligner l'axe d'éjection des micro-gouttelettes avec l'axe défini par les deux écorceurs.

Dans la pratique, la première étape consiste à déplacer le dispensateur dans le plan horizontal pour que la micro-gouttelette se trouve au-dessus du premier écorceur. La micro-gouttelette se retrouve alors dans la chambre intermédiaire. Ensuite, la micro-gouttelette doit passer le second écorceur. L'absence de système de visualisation dans la chambre intermédiaire impose une recherche systématique basée sur l'évolution de la pression dans la chambre principale liée au passage ou non de la gouttelette à travers le deuxième écorceur. On déplace le dispensateur dans le plan horizontal de manière à obtenir une remontée de vide dans la chambre principale de l'ordre de quelques 10^{-6} mbar, signe que la gouttelette arrive dans cette chambre. Une fois cette remontée de vide obtenue, il faut faire varier le délai de la diode de la chambre principale de façon à pouvoir visualiser la micro-gouttelette. Les temps mis par la micro-gouttelette pour arriver en différents points de sa trajectoire, sont donnés dans le tableau 2.3.

Position micro-gouttelette	Délai	Pression	Vitesse
<i>Ecorceur 1</i>	1.2 ms	300 mbar	20 m.s ⁻¹
<i>Ecorceur 2</i>	2.3 ms	10^{-2} mbar	22 m.s ⁻¹
<i>Chambre principale</i>	5.3 ms	10^{-6} mbar	25 m.s ⁻¹

TABLE 2.3 – Délais d'observation de la micro-gouttelette pour différentes positions. Ces délais sont mesurés par rapport à l'instant d'éjection de la micro-gouttelette. Les pressions en ces différentes positions sont rappelées, ainsi que la vitesse des micro-gouttelettes.

L'absence de caméra dans la chambre intermédiaire rend la recherche de la micro-gouttelette dans la chambre principale assez longue et laborieuse. Une amélioration a donc été apportée pendant ma thèse par l'ajout de 2 caméras CCD placées à 90 degrés l'une de l'autre, avec en face de chacune d'elles une diode pulsée. Plusieurs contraintes pesaient sur le choix de ces caméras : la chambre intermédiaire ne pouvant être percée de hublots, ce système de visualisation devait nécessairement être placé dans l'enceinte, d'où la nécessité d'un encombrement très réduit et de pouvoir fonctionner à faible pression (10^{-2} mbar).

Des tests ont été réalisés avec une petite caméra de 3.2 cm x 3.2 cm x 2.5 cm. Les dimensions de cette caméra sont adaptées à celles de la chambre intermédiaire, qui a un rayon de 15 cm et une profondeur de 5 cm seulement (figure 2.17)

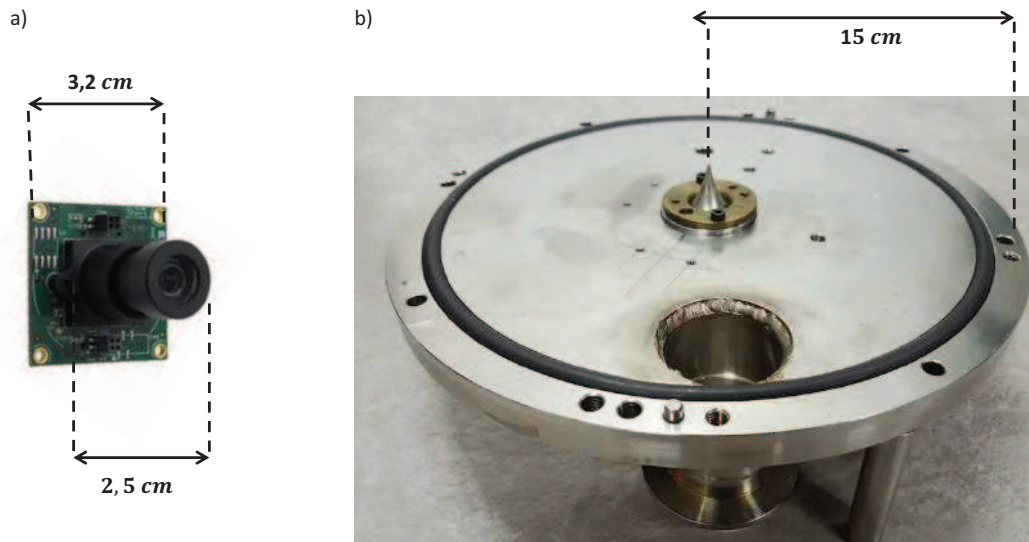


FIGURE 2.17 – a) Dimension de la caméra CCD. b) Bride permettant de fermer la partie inférieure de la chambre intermédiaire.

Cette caméra a été utilisée sans ajout d'optique complémentaire. Avec une distance de 10 mm entre le sommet de l'écorceur et l'objectif, le haut de l'écorceur a pu être imagé nettement avec un grandissement de 4. Le grandissement obtenu est ainsi le même que pour les autres systèmes de visualisation.

Grâce à cette amélioration, la recherche de la micro-gouttelette est beaucoup plus rapide. En effet, quelques minutes suffisent pour la trouver, alors qu'avant plusieurs dizaines de minutes, voire plus, étaient nécessaires. Sur la figure 2.18 a), on voit les caméras CCD couplées à des diodes pulsées. Les deux caméras croisées permettent

de s'assurer de la superposition de la gouttelette avec l'axe vertical passant par les écorceurs. Ce contrôle visuel dans deux directions horizontales perpendiculaires permet de s'affranchir du suivi de la remontée de pression dans la chambre principale lors du passage de la micro-gouttelette.

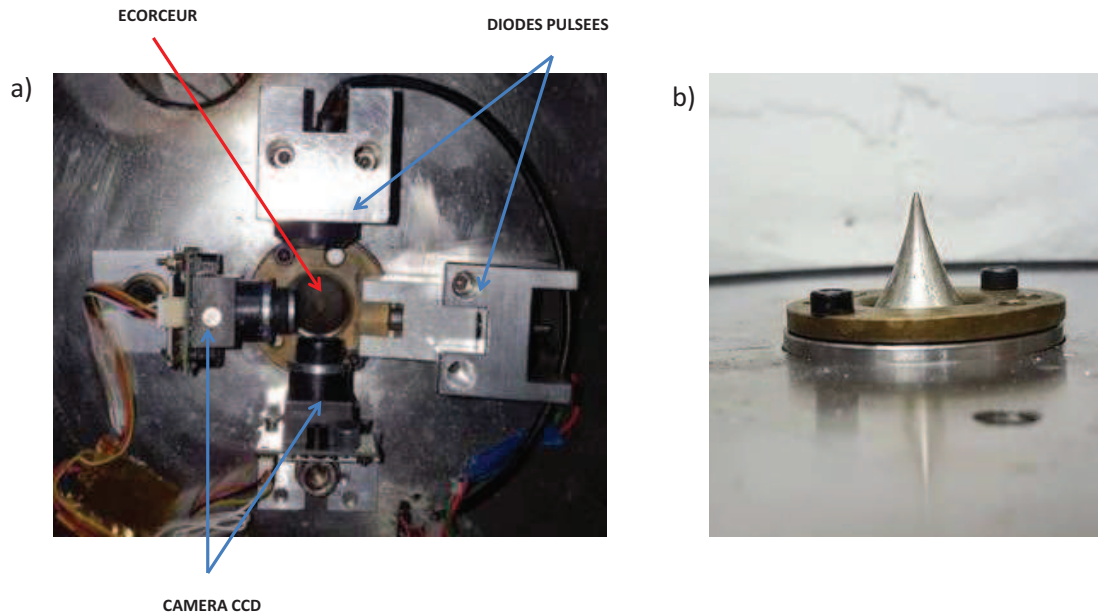


FIGURE 2.18 – Dispositif de visualisation des micro-gouttelettes dans la chambre intermédiaire. a) Les caméras sont placées à 90 degrés l'une de l'autre. Une diode pulsée est en face de chaque caméra CCD (vue de dessus). b) écorceur seul (vue de face)

Si les micro-gouttelettes sont liquides au moment de leur éjection, dans la chambre générateur, il n'en est pas nécessairement de même au moment de la désorption dans la chambre principale. Une micro-gouttelette à température ambiante (300 K) et à pression atmosphérique ($P = 1 \text{ atm}$), qui est mise sous vide secondaire de manière soudaine, se retrouve hors équilibre thermodynamique, et subit un refroidissement évaporatif. Toutefois dans notre cas, il est difficile de trancher sur la phase qu'adopterait la micro-gouttelette au bout des 5 ms qui lui sont nécessaires pour arriver dans la zone d'interaction avec le laser. Alors liquide ou solide ?

Des éléments de réponse sont apportés par L.Zich et al. dans une publication où ils étudient l'évaporation de micro-gouttelettes d'eau sous vide secondaire [67]. D'après leurs calculs, des micro-gouttelettes d'un diamètre de $10 \text{ }\mu\text{m}$, donc 5 fois plus petites que les nôtres, passent dans un état super-refroidi et se solidifient au bout de 3 ms. De plus, ils décrivent l'évolution temporelle de solidification en fonction du diamètre des micro-gouttelettes. Ils constatent que le temps au bout duquel les micro-gouttelettes se solidifient augmente à peu près linéairement avec le diamètre de la micro-gouttelette. Donc, dans notre cas, on peut estimer que la solidification se produit au bout de 15 ms.

D'autres éléments de réponse peuvent être apportés de manière qualitative par nos

propres observations. La figure 2.19 présente des images de vaporisation après absorption du laser IR, à l'air libre. Or, les images obtenues sous vide secondaire sont les mêmes qu'à l'air libre, et la longueur d'onde provoquant l'explosion est également la même qu'à l'air libre. Étant donné que le spectre d'absorption de l'eau dépend de sa phase (figure 2.20), ceci présente une indication qualitative du fait qu'une part importante de la micro-gouttelette est encore liquide au moment de l'interaction avec le laser de désorption. Donc, nous pensons que lors de la désorption, la micro-gouttelette est sous forme liquide.



FIGURE 2.19 – Explosion d'une micro-gouttelette. A gauche interaction avec le laser à $t = 0 \mu\text{s}$, au milieu à $t = 2 \mu\text{s}$, à droite à $t = 20 \mu\text{s}$. t représente le temps s'étant écoulé depuis l'envoi de l'impulsion laser.

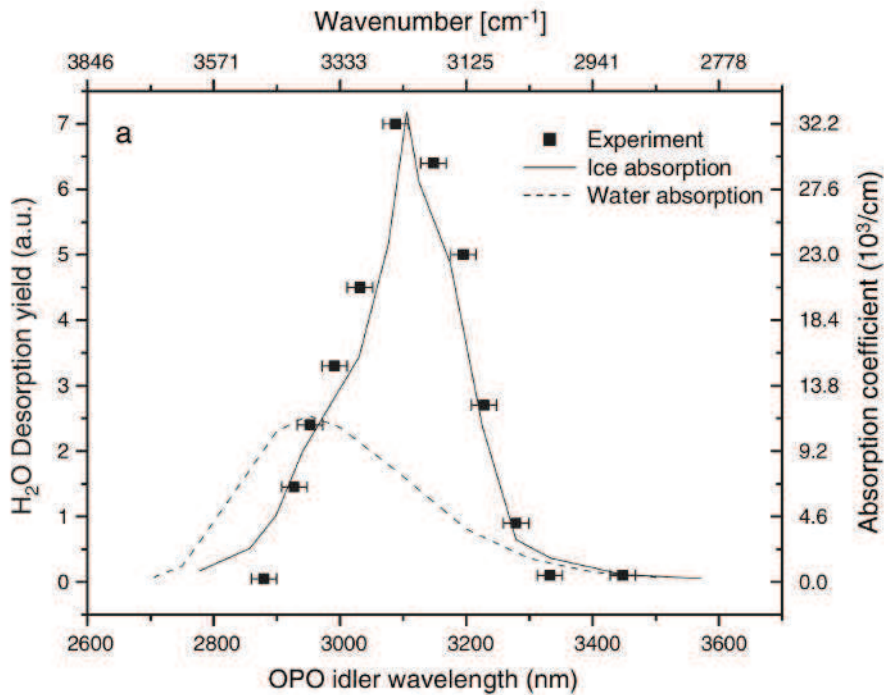


FIGURE 2.20 – Comparaison du spectre d'absorption de la glace à 100 K (ligne continu) et de l'eau [68].

Dans le dispositif actuel de la source, le dispenseur est dans une chambre à une pression de 300 mbar. Ceci complexifie le mode opératoire et n'est pas adapté au fonctionnement classique du dispenseur. En ce qui concerne le mode opératoire : toute intervention sur le dispenseur (changement de la solution dans le réservoir, débouchage manuel du capillaire) nécessite de casser le vide et d'ouvrir la chambre générateur. D'autre part, le dispenseur n'est pas fait pour travailler sous vide, mais plutôt à pression atmosphérique. Pour obtenir une gouttelette plus stable, et avec l'objectif d'utiliser de l'eau comme solvant, nous sommes en train de développer une nouvelle source, afin de faire fonctionner le dispenseur à pression atmosphérique. Cette nouvelle source permettra d'obtenir un vide dans la chambre principal aussi bon que dans la source actuelle, c'est-à-dire de 10^{-6} mbar. L'un des intérêts de cette nouvelle source est de pouvoir agir de manière plus souple sur le dispenseur, en cas de mauvais fonctionnement de ce dernier. De plus, le fait que le dispenseur fonctionne à pression atmosphérique supprime les problèmes de pression de vapeur saturante rencontrés dans la chambre générateur et devrait nous permettre de nous rapprocher d'un environnement biologique pertinent.

Dans cette nouvelle source, un pompage différentiel est également effectué. Il y a trois chambres et trois écorceurs, comme l'indique la figure 2.21. Pour le pompage, il y aura sur la première chambre une ouverture en DN40 pour un pompage primaire. Le vide attendu est de 10 mbar. Dans la seconde chambre intermédiaire, il y aura une ouverture en DN63 pour une petite turbo (vide de 10^{-2} mbar) soutenue par une pompe primaire. Dans la chambre principale, on gardera les mêmes pompes que pour la source actuelle : une pompe turbo moléculaire soutenue par une pompe primaire. Les passages DN 16 et DN 40 présents respectivement dans la première et dans la deuxième chambre, permettront de faire passer les câbles de connexions pour les caméras CCD et diodes permettant la visualisation de la micro-gouttelette dans ces deux chambres.

Étant donné la difficulté de transférer les micro-gouttelettes du dispenseur à la chambre principale avec deux écorceurs, le challenge avec trois sera encore plus complexe. Pour aligner mécaniquement le mieux possible les trois écorceurs, des empreintes centrées pour positionner les écorceurs ont été réalisées. Sur la figure 2.22, sont représentées ces empreintes ainsi que les ouvertures prévues pour réaliser les différents pompages. Il ne faut pas que le décalage entre deux écorceurs soit plus grand que 100 μm , sinon le transfert des micro-gouttelettes sera impossible. De plus, il faut que notre dispenseur puisse se déplacer dans le plan perpendiculaire à la trajectoire des micro-gouttelettes, et également en angle, comme c'est le cas pour la source actuelle. Pour rendre le transfert plus simple, deux systèmes en caméra croisées, comme décrit sur la figure 2.14, permettront de suivre les micro-gouttelettes dans les 2 chambres intermédiaires. Les mêmes systèmes de visualisation pour le dispenseur et pour la chambre principal sont en cours de réalisation.

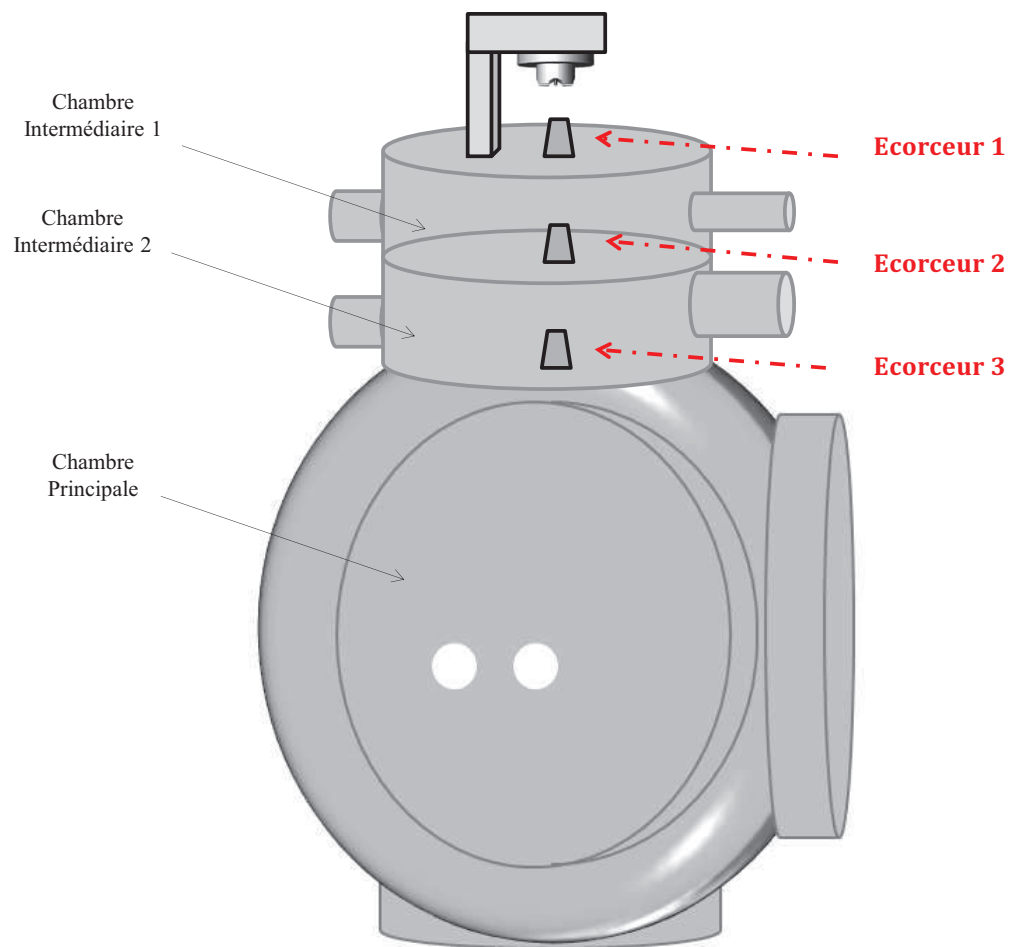


FIGURE 2.21 – Vue d’ensemble de la nouvelle source. Le dispenseur et l’écorceur 1 sont à pression atmosphérique.

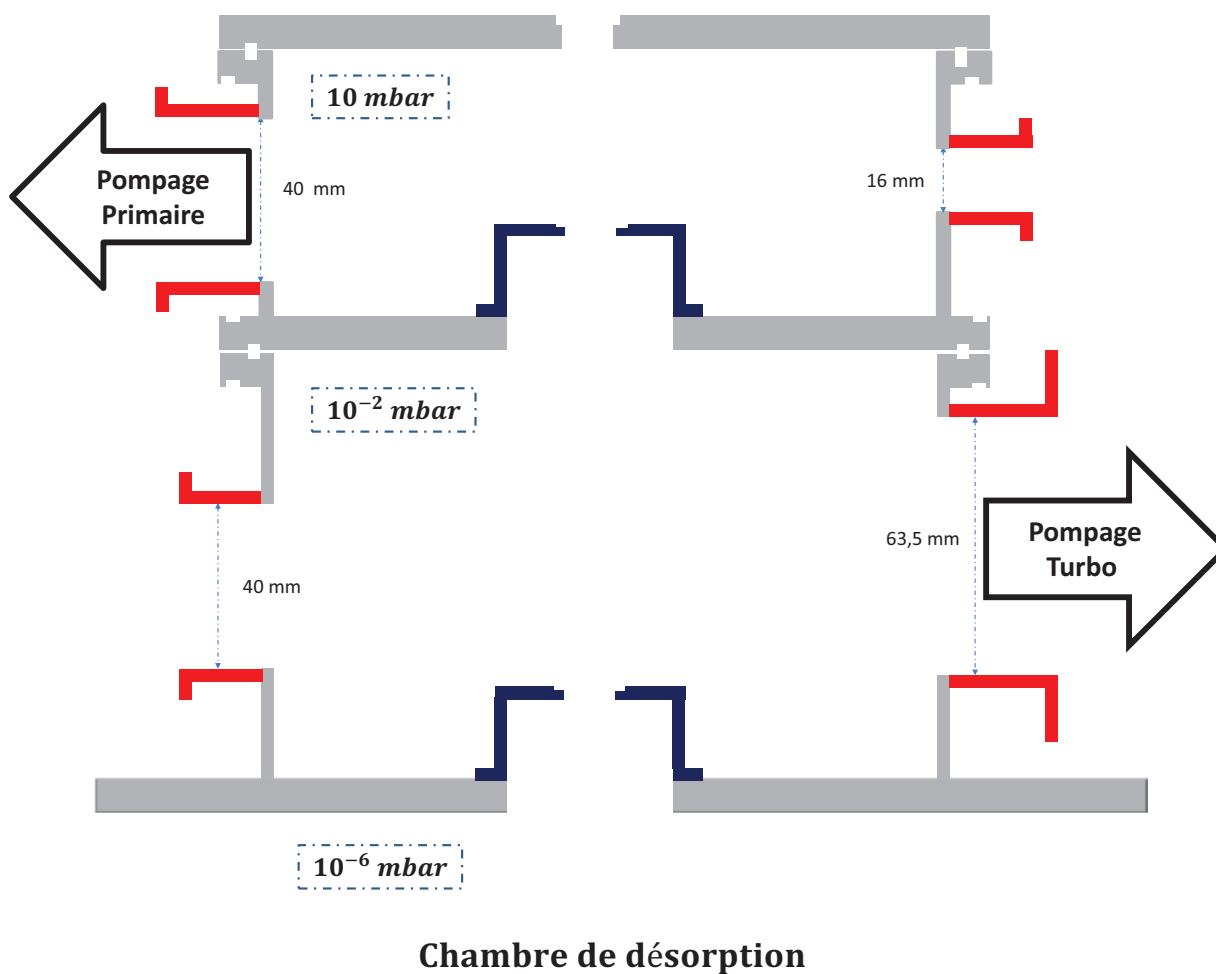


FIGURE 2.22 – Plan des enceintes servant au pompage différentiel de la future source.

2.2.6 Laser OPO

Pour réaliser la désorption des micro-gouttelettes à l'aide d'un laser, la densité de puissance surfacique requise est de l'ordre de 100 MW.cm^{-2} [63]. C'est pour cette raison que l'équipe a développé un laser OPO (Optical Parametric Oscillator) qui est accordable dans le domaine de l'IR autour de $3 \mu\text{m}$ et qui, grâce à son caractère impulsionnel, permet de délivrer de telles puissances. Il a été réalisé au laboratoire en quelques mois pendant la thèse de Jean-Christophe Pouilly. Les OPO ne fonctionnent pas comme les laser classiques, dans le sens où il n'y a pas d'inversion de population réalisée dans le milieu amplificateur, mais plutôt la conversion d'une fréquence en d'autres fréquences. Ce phénomène se produit dans des matériaux dits "non-linéaires". Ces matériaux sont constitués de molécules asymétriques dont les atomes présentent des densités électroniques différentes. Lorsqu'un électron d'un tel milieu est excité par une onde électromagnétique, il se déplace dans la direction des atomes de plus haute densité électronique. Le mouvement est distordu

et l'électron réémet des fréquences différentes de son excitation, tout en respectant la conservation de l'énergie. Avec un matériau de type non-linéaire du second ordre on provoque la scission d'une onde incidente en deux autres.

Dans notre cas, un cristal non-linéaire de Niobate de Lithium (LiNbO_3), qui possède des propriétés de transparence aux longueurs d'ondes utilisées, est pompé par un laser Nd :YAG (Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet) impulsif nanoseconde à une longueur d'onde de 1,064 μm . Deux miroirs de chaque côté du cristal forment une cavité afin d'amplifier la lumière produite par le processus non-linéaire d'amplification paramétrique (un schéma du laser est présenté sur la figure 2.23). Deux nouvelles fréquences sont produites. On a ainsi trois faisceaux : la pompe, le signal et le complémentaire (appelé aussi "idler"). Le processus non-linéaire doit obéir à l'équation suivante, qui n'est rien d'autre que la conservation de l'énergie :

$$w_p = w_s + w_c \quad (\text{Equation 2.3})$$

avec w_p , w_s , et w_c respectivement les pulsations de la pompe, du signal et du complémentaire. C'est w_c qui correspond au rayonnement IR qu'on cherche à optimiser. La conservation de l'énergie est une condition nécessaire mais pas suffisante pour produire un tel faisceau. En effet, il faut également satisfaire la conservation de la quantité de mouvement des photons. Par ailleurs, les trois faisceaux qui ont des longueurs d'ondes sensiblement différentes ne voient pas le même indice optique, et donc n'ont pas la même vitesse de groupe. Alors, lorsque les trois faisceaux sont en phase à l'entrée du cristal, au bout d'un certain trajet elles ne le sont plus. Ainsi, elles peuvent être en opposition de phase et produire le processus inverse : un photon avec une pulsation w_s et un autre avec une pulsation w_c donnent un photon w_p . Cette distance (longueur de cohérence) dépend du désaccord de phase :

$$\Delta \vec{k} = \vec{k}_p - \vec{k}_s - \vec{k}_c \quad (\text{Equation 2.4})$$

Sa norme est :

$$\Delta k = \frac{1}{c}(n_s w_s + n_c w_c - n_p w_p) \quad (\text{Equation 2.5})$$

L'expression du gain s'exprime comme suit :

$$G^2 = \frac{w_s w_c c^4}{n_s^2 n_c^2} K^2 \epsilon_p^2 \frac{(\sin(\Delta k \frac{l}{2}))^2}{(\Delta k \frac{l}{2})^2} \quad (\text{Equation 2.6})$$

Avec l 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.

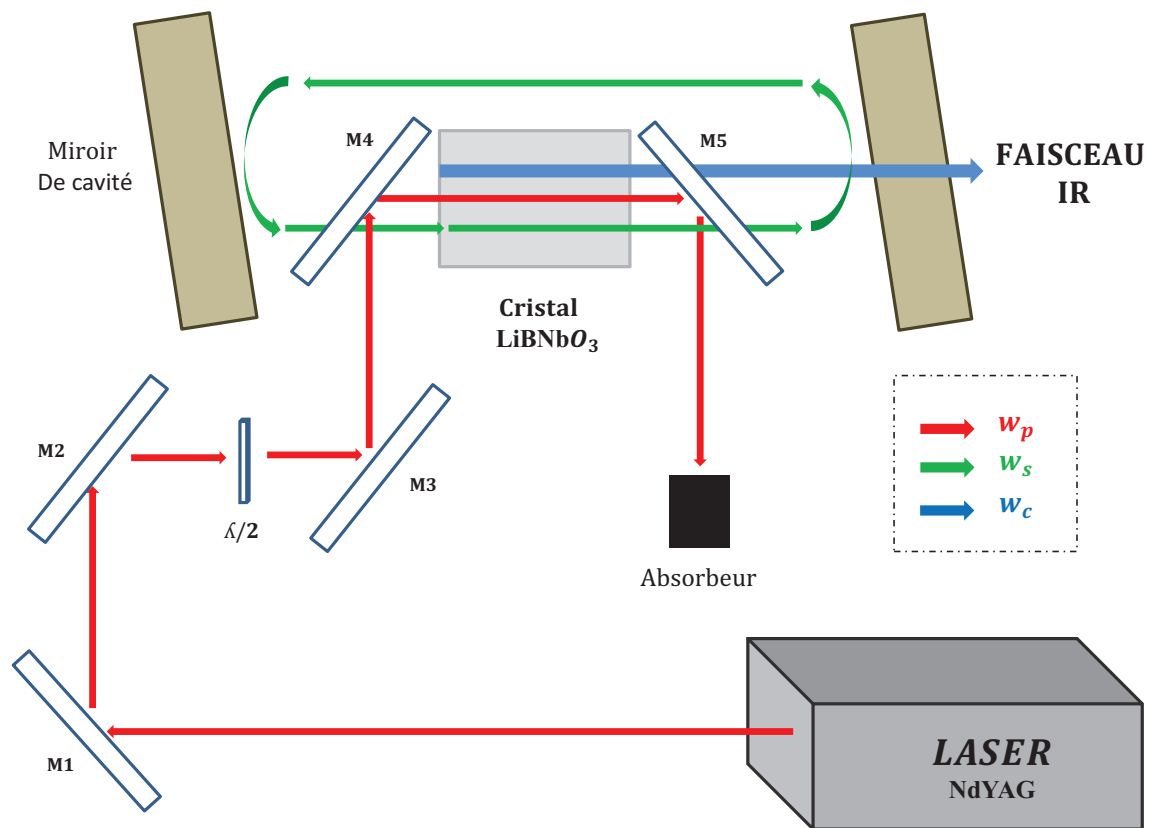


FIGURE 2.23 – Schéma du laser OPO réalisé. Le faisceau de pompe génère deux nouveaux faisceaux, avec les pulsations respectives w_c et w_s . C'est w_c qui constitue notre faisceau IR à $3 \mu\text{m}$.

On voit qu'il faut que $\Delta \vec{k}$ soit nulle afin de maximiser le gain. Pour annuler ce désaccord, on utilise des cristaux biréfringents dans lesquels on peut ajuster la valeur de l'indice optique vu par un faisceau en jouant sur son angle d'incidence et sur sa polarisation. En effet, ce type de cristal comporte deux axes particuliers, l'axe ordinaire et l'axe extraordinaire. Suivant le premier, pour une lumière polarisée linéairement, l'indice optique ne varie pas en fonction de l'angle d'incidence, alors que pour l'autre axe, la même lumière polarisée perpendiculairement à la première, verra son indice dépendre de l'angle. Donc pour obtenir un accord de phase, le cristal est fixé sur une monture de rotation pour le pencher par rapport à l'axe du faisceau de pompe. Pour que les trains d'ondes des trois faisceaux interagissent, on les superpose spatialement dans le cristal, comme on peut le voir sur la figure 2.24.

Il faut éviter que la réflexion du faisceau de pompe sur le cristal ne revienne sur lui-même. Cela peut endommager le laser de pompe. Le cristal est donc légèrement orienté pour voir le retour du faisceau de pompe sur le côté de l'orifice laser. Les miroirs, M1, M2, M3, M4 et M5 sont traités pour réfléchir la lumière à $1,06 \mu\text{m}$ avec des pertes de moins de 5 %. Les miroirs de cavités ont un coefficient de réflexion de 97 % pour les longueurs d'onde comprises entre $1,5$ et $1,9 \mu\text{m}$, mais sont transparents autour de $3 \mu\text{m}$. Pour que la condition d'accord de phase soit réalisée, il est nécessaire que le laser de

pompe est une polarisation verticale en amont du cristal. Pour cela, une lame $\lambda/2$ est positionnée en amont de la cavité.

Conservation de l'impulsion : $\vec{k}_p = \vec{k}_s + \vec{k}_c$ (si $\Delta_k = 0$)

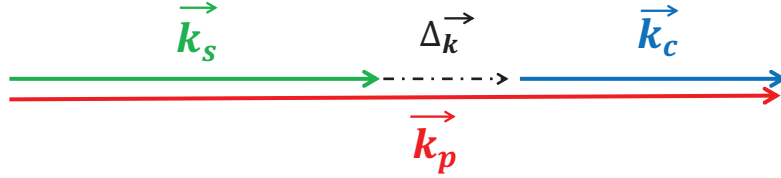


FIGURE 2.24 – Représentation des trois vecteurs d'onde illustrant le désaccord de phase. L'accord de phase est réalisé pour $\theta=0$.

D'après l'équation 2.3, il existe une infinité de couples de fréquences w_c , et w_s qui obéissent à la conservation de l'énergie, mais l'accordabilité finale de notre OPO sera déterminée par la condition d'accord de phase. Donc pour une pulsation désirée w_c , on doit choisir une valeur de l'indice optique en ajustant la position angulaire du cristal. Dans notre cas, on peut faire varier la longueur d'onde entre $2.5 \mu\text{m}$ et $4 \mu\text{m}$. Toutefois, il existe des photons avec des w_c et w_s légèrement différents de ceux désirés qui sont produits par le même processus non-linéaire, et avec suffisamment de gain pour que ce mode subsiste dans la cavité. Autrement dit, pour une position du cristal donnée, il existe une distribution en pulsation pour laquelle le désaccord n'est pas trop grand et conduit à un gain suffisant, on parle alors d'acceptance angulaire. Cela produit un élargissement spectral du faisceau de sortie, donc du complémentaire. On obtient un cône d'émission faisant un angle de 5 mrad avec la direction du faisceau de pompe. La largeur spectrale, estimée à 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.

Cette largeur spectrale médiocre par rapport aux spécifications des OPO commerciaux actuels ne représente pas un problème pour réaliser la désorption des micro-gouttelettes, puisque les bandes d'absorption dans un liquide sont très larges. De cette manière, la probabilité d'absorption est grande si le spectre du laser est comparable au spectre d'absorption du liquide.

2.2.7 Explosion des gouttelettes

Le faisceau laser IR produit est ensuite focalisé, par une lentille de 10 cm de focale placée à l'intérieur de la chambre principale. A 0.7 mJ (énergie mesurée en amont de la lentille de focalisation), on observe la vaporisation de la micro-gouttelette, mais ce n'est pas suffisant pour détecter des ions. Le laser est pulsé à 20 Hz , et l'énergie à chaque pulse est libérée pendant 5 ns . Une énergie de 0.7 mJ correspond donc à une puissance

de 0.14 MW. De même, la densité d'énergie surfacique peut être calculé en prenant en compte le waist obtenu après être passé à travers la lentille de 10 cm de focale. 0.14 MW correspond donc à 18 MW.cm^2 avec un waist de $100 \text{ }\mu\text{m}$ (la taille du waist est défini par $f.\theta$, où f est la focale et θ est la divergence en amont de la lentille avec une valeur de 1 mrad lorsque le faisceau est focalisé). Il faut augmenter l'énergie à 1.5 mJ (ce qui correspond à une densité d'énergie surfacique de 38.4 MW.cm^2) pour détecter un signal d'ions. Le fait que la lentille soit à l'intérieur de la chambre principale (10^{-6} mbar) nous empêche de contrôler parfaitement le pointé laser par rapport à la micro-gouttelette. En plus du problème du pointé laser, le profil spatial du faisceau est loin d'être gaussien. Cette inhomogénéité produit des "points chauds". En fonction de la longueur d'onde et du pointé, l'image de la vaporisation évolue, ce qui indique que différents mécanismes de vaporisation existent. De plus, à 4-5 mJ ($102\text{-}128 \text{ MW.cm}^2$), on observe un plasma très lumineux. Le signal d'ions est donc très dépendant de l'intensité, de la longueur d'onde du laser IR, et du pointé laser IR par rapport à la goutte. Les valeurs de densité d'énergie surfacique pour lesquelles nous obtenons un signal d'ions sont proches de celles trouvées dans la référence de Brutschy [63]. Pour de telles valeurs, les molécules possèdent après explosion des vitesses de l'ordre de 900 m.s^{-1} [58]. Dans le chapitre 3, nos simulations confrontées aux résultats expérimentaux permettront de discuter plus en détail de ces vitesses.

Pour pouvoir contrôler la position de la lentille de focalisation pendant une expérience, on a fait des tests avec une lentille convergente de focale 20 cm. De cette manière, la lentille est à l'extérieur de la chambre principale. Étant donné que la taille du waist d'un faisceau laser après focalisation par une lentille est proportionnel à la focale (voir équation 2.7), la densité d'énergie est plus faible avec la lentille de 20 cm, qu'avec celle de 10 cm pour une puissance donnée. Puisque nous ne pouvons pas gagner plus de puissance, nous n'avons pas réussi à faire exploser les micro-gouttelettes avec la focale de 20 cm. La seule manière d'obtenir un signal d'ions est donc d'utiliser la lentille de 10 cm de focale, qui se trouve à l'intérieur de la chambre principale. Dans le chapitre 4, une amélioration est apportée afin de pouvoir contrôler la position de la lentille de focalisation (et donc le pointé) en cours d'expérience. Cela est réalisé par des montures piézo-électriques, qui permettront de déplacer la lentille sous vide.

$$w_{0'} = \frac{\lambda f}{\pi w_0} \quad (\text{Equation 2.7})$$

Avec w_0 , la taille du waist avant la lentille, λ la longueur d'onde du laser, f la focale de la lentille convergente et $w_{0'}$, la taille du waist dans le plan focal image. Pour obtenir des impulsions très brèves (10 ns) à 20 Hz, on fait fonctionner le laser de pompe en mode Q-switch. Pour cela, une cellule de pockels, qui permet de faire varier le facteur de qualité Q, est placée dans le résonateur optique. Au début, la cellule impose un facteur de qualité faible pour qu'aucun retour dans la cavité ne soit réalisé pendant que le milieu amplificateur est pompé. Pendant ce temps, de l'énergie est stockée dans le milieu d'amplification jusqu'à atteindre une valeur maximale limitée par les pertes. Une fois cette valeur atteinte, la cellule de pockels s'ouvre pendant $20 \text{ }\mu\text{s}$ et le facteur de qualité augmente, ce qui permet les aller-retours de la lumière dans le résonateur. Puisque beaucoup d'énergie a été stockée, l'intensité de la lumière évolue rapidement jusqu'à sa

valeur maximale, et donc l'énergie stockée diminue aussi très rapidement. C'est ainsi qu'on obtient une impulsion très brève, et donc très puissante. On répète ce processus toutes les 50 ms (20 Hz).

La désorption d'une micro-gouttelette toutes les 40 ms nécessite un alignement parfait du faisceau laser sur la trajectoire de ces micro-gouttelettes et une synchronisation fine entre l'impulsion laser et le passage de ces micro-gouttelettes. Étant donné que la largeur temporelle de la diode stroboscopique est de quelques μs (on l'ajuste pour optimiser le contraste visuel de la micro-gouttelette), on peut observer l'évolution de la désorption en faisant varier le délai de la diode stroboscopique par rapport à l'impulsion laser (voir figure 2.25).

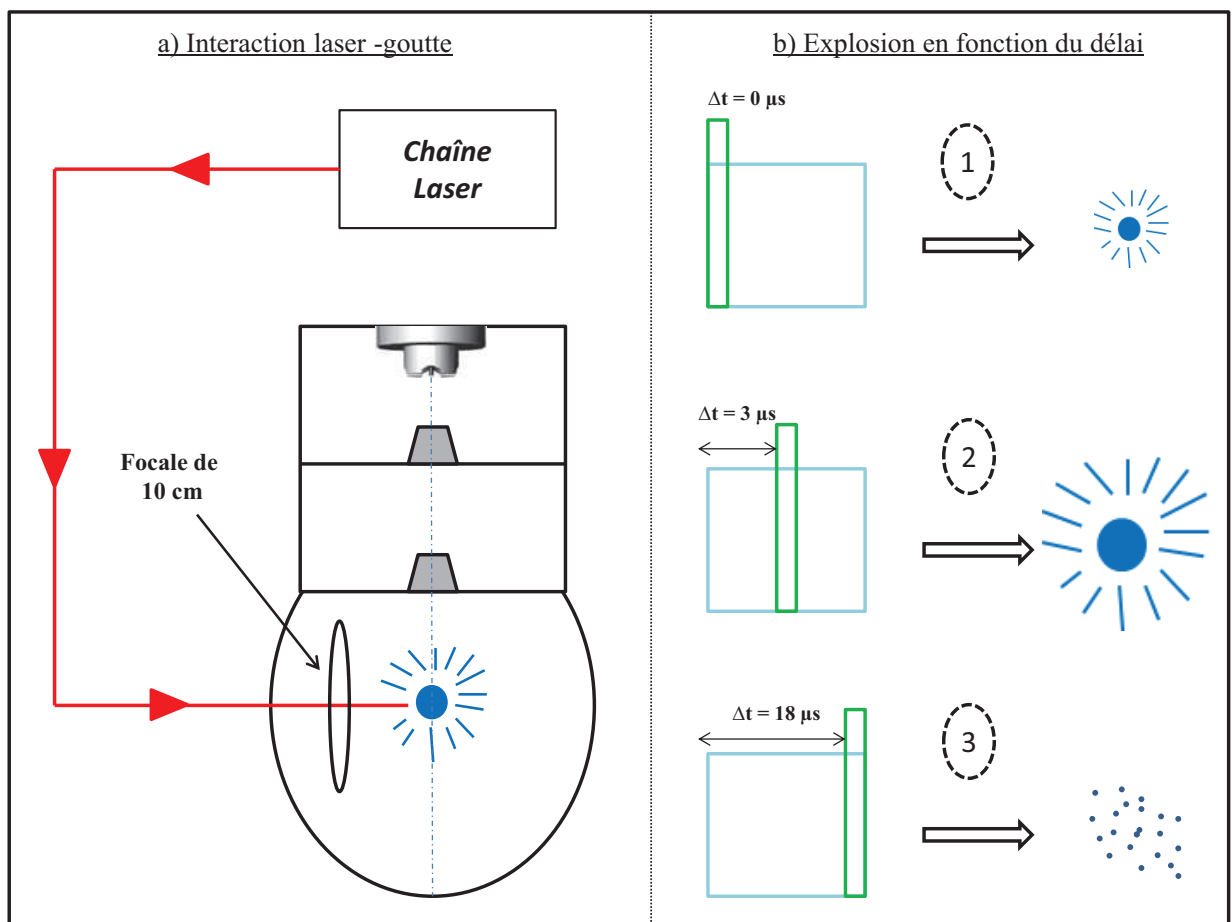


FIGURE 2.25 – Le spot laser a un diamètre deux fois plus grand que la micro-gouttelette. (a) L'alignement laser/goutte doit être précis pour exploser les micro-gouttelettes. (b) Synchronisation de l'impulsion laser et de la visualisation : la trace verte correspond à l'impulsion envoyée à la diode de visualisation de la chambre principale, tandis que la trace bleue correspond au Q-Switch du laser de pompe. Suivant le délai entre les deux, on visualise le début (cas 1), une phase de forte expansion (cas 2) ou la fin (cas 3) de l'explosion.

Dans le cas 1, on observe le début de l'interaction laser micro-gouttelette. Si on décale de 3 μs (cas 2) le délai de l'impulsion de la diode par rapport à l'impulsion laser, on observe une explosion intense de la micro-gouttelette. Généralement, notre système d'extraction des ions est déclenché à ce moment (voir chapitre 3). Si on envoie l'impulsion de la diode à la fin de l'impulsion laser, on n'observe plus rien : l'explosion est finie (cas 3).

En ce qui concerne le processus de désorption des ions, deux mécanismes toujours discutés jusqu'à présent, ont été proposés :

Premier mécanisme :

Le premier mécanisme, proposé par Brutschy, suggère que l'absorption du rayonnement IR induit une transition de phase rapide au delà du point supercritique du solvant, ce qui provoque sa vaporisation soudaine [69]. Pendant la vaporisation et au fur et à mesure que la densité du liquide diminue, la constante diélectrique chute jusqu'à atteindre la valeur de 1. Ainsi, les ions de polarités opposées vont se recombiner, ce qui n'est pas permis en présence de solvant, puisque le solvant écran les ions et les contre-ions. Seuls les ions ayant une énergie cinétique grande et qui se trouvent assez éloignés d'un contre-ion peuvent être détectés par spectrométrie de masse. Ce mécanisme repose donc sur un processus de recombinaison ionique échoué, et porte le nom de "*lucky survivor*".

Deuxième mécanisme :

Le second mécanisme, proposé par Abel et *al.* [70], est le suivant : l'énergie déposée par le laser est absorbée de manière non-homogène, en raison de points chauds dans le faisceau laser, ce qui a pour effet de donner naissance à une onde de choc, puis une explosion thermique. Le liquide est ainsi dispersé, et cette dispersion est tellement forte que les biomolécules sont quasiment désolvatées ou incorporées dans de très petites nano-gouttelettes chargées qui transfèrent leurs charges aux biomolécules. Enfin, les biomolécules sont libérées des nano-gouttelettes sous vide, car la tension de surface de la nano-gouttelette est trop faible pour contenir plusieurs charges.

2.2.8 Synthèse

Nous avons réussi à mettre des micro-gouttelettes, initialement produites à 300 mbar, dans une chambre où règne un vide de 10^{-6} mbar. Le pointé de la micro-gouttelette est stable à plus de 100 μm après un parcours de 10 cm, et 2 μs après 5 ms de vol. Cela permet d'exploser toutes les micro-gouttelettes. Nous avons développé des systèmes de visualisation dans les trois chambres. On peut ainsi, suivre les micro-gouttelettes sur tout leur trajet, afin de faciliter leur transfert dans la chambre principale. Un de nos objectifs, était de réaliser une désorption "ultra douce", afin de dénaturer le moins possible la structure native. Cet objectif est en partie atteint, comme on peut le constater sur le spectre de la figure 2.26. On observe sur ce spectre, un complexe non-covalent entre la vancomycine et un tri-peptide jouant le rôle d'un récepteur membranaire intact en phase gazeuse. La masse de la vancomycine est de 1449 Da, et le tri-peptide à une masse de 260 Da. Ce spectre prouve que notre processus de désorption est doux. J'y reviendrai plus en détail dans le

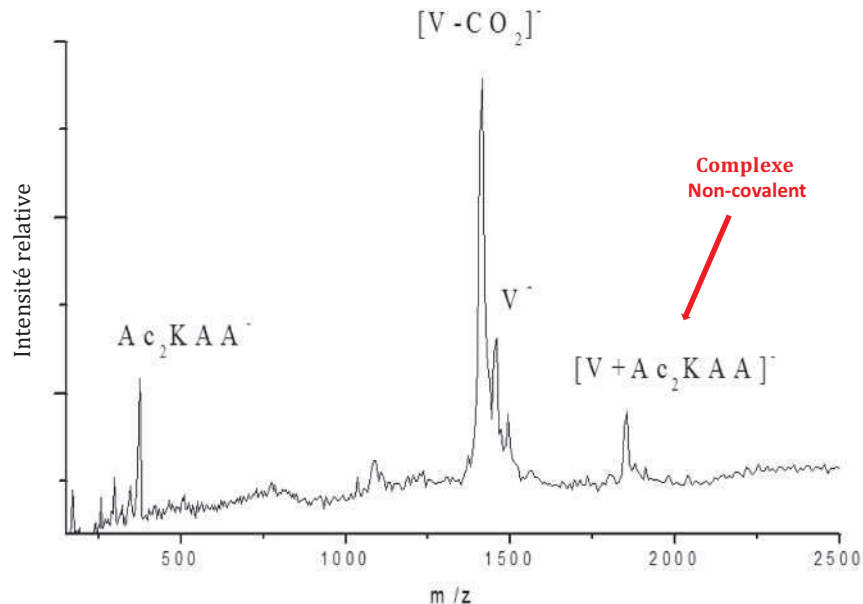


FIGURE 2.26 – Spectre de masse de la vancomycine et du complexe qu'elle forme avec un tri-peptide jouant le rôle de son récepteur membranaire (Lys-Ala-Ala).

Cette nouvelle source de désorption LILBID (Laser Induced Liquid Bead Ion Desorption) permet de garder les avantages de l'électrospray et du maldi, tout en s'affranchissant de leurs inconvénients. Voici les points importants de notre technique LILBIB :

1. Désorption laser ultra-douce (puisque c'est le solvant qui absorbe le rayonnement) directement sous vide (contrairement à l'ESI)
2. États de charge produits faibles (1 ou 2) (contrairement à l'ESI)
3. Études de systèmes biologiques fragiles, comme les complexes non-covalents, gardés intacts sous vide après la désorption
4. La cible est homogène et constamment renouvelée (contrairement au MALDI)
5. Consomme de très petites quantités de produit, 10000 micro-gouttelettes représentent moins d'1 μ l de solution
6. L'expérience fonctionne en régime pulsé, ce qui est bien adapté aux techniques très sensibles de spectrométrie de masse à temps de vol (comme en MALDI)
7. Prise en compte de l'environnement : les molécules d'intérêts biologiques sont initialement dissoutes dans de l'eau (contrairement au MALDI)
8. Tolérance par rapport à l'utilisation de sels destinés à solubiliser certaines molécules (contrairement à l'ESI).

Chapitre 3

Caractérisation de la source de micro-gouttelettes

CHAPITRE 3 : Caractérisation de la source de micro-gouttelettes

3.1 Technique d'analyse

Maintenant que notre méthode de mise en phase gazeuse a été présentée, et après un bref rappel historique et qualitatif sur la spectrométrie de masse, je décrirai dans ce nouveau chapitre notre spectromètre de masse par temps de vol qui a pour rôle de séparer les molécules produites en phase gazeuse en fonction de leur rapport masse sur charge. Ensuite, je présenterai les premiers spectres de masse obtenus avec notre source, ainsi que des simulations réalisées avec le logiciel SIMION qui permettront d'interpréter en détail ces résultats expérimentaux.

3.1.1 Aspects historique de la spectrométrie de masse

La naissance de la spectrométrie de masse remonte au début du XX^e siècle avec les travaux de J. Thomson en 1912, dans lesquels des spectres de masse de plusieurs composés gazeux : N_2 , O_2 , CO_2 , CO [71] ont été obtenus. Une année plus tard, il découvre les isotopes $A=20$ et $A=22$ du néon mis en évidence par un spectrographe à parabole. Malgré le fait que ces résultats étaient considérables, la sensibilité était médiocre à cette époque. Les innovations suivantes furent donc axées sur l'amélioration de la sensibilité du dispositif. A. Dempster, en 1918, développe un spectromètre à focalisation en direction [72]. En 1919, F. Aston introduit le tri des ions en fonction de leur vitesse [73] et, en 1936, F. Penning construit un dispositif pour piéger des ions en combinant un champ électrique et un champ magnétique [74].

La seconde guerre mondiale a également joué un rôle dans le développement de la spectrométrie de masse. En effet, puisque les tensions politiques s'intensifiaient, les américains décidèrent d'orienter leur recherches sur la création d'une arme nucléaire qui reposait sur la fission du noyau d'uranium (projet Manhattan). C'est A. Nier qui développa un spectromètre de masse capable de séparer les isotopes ^{235}U et ^{238}U . Grâce à ces expériences, il a pu confirmer que c'est ^{235}U qui peut conduire à une fission, alors que ^{238}U n'est pas fissile.

W. Paul, entre 1953 et 1960, développa également un piège, mais sans appliquer de champ magnétique. C'est le piège ionique quadripolaire. Il reçut le prix Nobel en 1989 pour ces travaux.

Parallèlement aux développements des analyseurs, les sources se développèrent également. J'ai déjà discuté de certaines d'entre elles dans le chapitre 2. Aujourd'hui, la spectrométrie de masse est devenu un outil indispensable en biologie. En effet, on la retrouve dans l'analyse protéomique (séquençage des protéines), dans les études structurales, dans la caractérisation de complexes convalents, et d'autres encore.

3.1.2 Spectrométrie de masse : aspects généraux

La spectrométrie de masse est une méthode analytique permettant d'identifier des molécules par mesure de leur rapport masse sur charge (m/z). On peut décrire un spectromètre de masse par un ensemble de trois blocs distinct (figure 3.1) :

1. la source d'ion
2. L'analyseur
3. Le détecteur

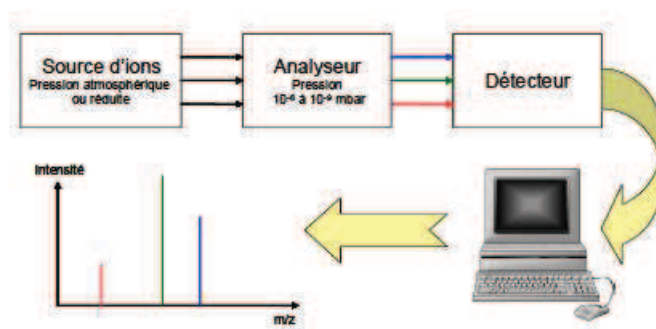


FIGURE 3.1 – Schéma d'un spectromètre de masse

1) La source d'ion :

La source d'ion permet d'ioniser la molécule à étudier et de la transférer en phase gazeuse. Il y a de nombreuses source d'ions qui diffèrent selon le type de molécule à étudier, dont certaines ont été décrites en détail dans le chapitre 2. Dans notre cas, nous utilisons une source de type LILBID, qui permet d'ioniser et de mettre en phase gazeuse des molécules d'intérêts biologiques. Lorsque ces dernières sont transférées en phase gazeuse, il faut séparer les espèces produites par la source d'ions en fonction de leur rapport masse sur charge. On réalise cette étape avec un analyseur.

2) L'analyseur :

L'analyseur est placé dans une enceinte où règne une très basse pression (10⁻⁶ à 10⁻⁹ mbar). Il permet de trier les ions en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). On dénombre plusieurs types d'analyseurs. Notamment, il y a ceux qui trient les ions par le biais d'une force magnétique et ceux basés sur l'utilisation d'une force électrique. Pour le dernier cas, on peut citer l'analyseur à temps de vol (TOF) où les ions sont triés en fonction du temps qu'ils mettent à traverser un tube de vol libre (sans champ électrique)

après avoir été accélérés dans une zone où règne un champ électrique. Ce temps au carré est proportionnel au rapport masse/charge (m/z), et permet ainsi d'identifier les molécules. C'est ce type d'analyseur que j'ai utilisé durant ma thèse et que je décris plus en détail dans la partie 3.1.3.

3) Le détecteur :

Enfin, les ions qui ont été séparés en fonction de leur rapport m/z par l'analyseur doivent être détectés afin de les transformer en un signal électrique exploitable. C'est le rôle du détecteur, qui amplifie le signal associé aux faibles courants d'ions incidents (de l'ordre de 10^{-9} A). On obtient alors un résultat sous la forme d'un spectre de masse, qui est un histogramme des intensités en fonction du temps, temps lié au rapport m/z . Il existe plusieurs types de détecteurs, mais ici je n'en détaillerai qu'un seul, celui utilisé pendant ma thèse : les galettes à micro-canaux. Ce détecteur est décrit dans la section 3.1.4.

3.1.3 Principe de la spectrométrie de masse par temps de vol

Le TOF décrit par W.C. Wiley et I. H. McLaren en 1955 [75], fait partie des analyseurs dont le principe de fonctionnement est le plus simple de tous. L'analyseur par temps de vol est constitué de deux zones : la zone d'accélération et la zone libre de champs. Tout d'abord, les ions issus de la source sont accélérés par une tension U sur une certaine distance (zone d'accélération). Ils vont acquérir une énergie cinétique Ec telle que :

$$Ec = \frac{1}{2}mV^2 = qU \quad (\text{Equation 3.1})$$

avec $q = ze$ et U la différence de potentiel appliquée.

Ensuite on les laisse se propager sur une distance L pendant un temps t dans un tube où règne un vide poussé afin d'éviter des collisions avec le gaz résiduel, sans appliquer de champ électrique (zone libre de champs). Cette zone correspond à une zone de vol libre, dans laquelle les ions passent un temps t (figure 3.2).

Comme :

$$t = \frac{L}{V} \quad (\text{Equation 3.2})$$

On déduit alors :

$$t = \frac{L}{\sqrt{2Ue}} \sqrt{\frac{m}{z}} \quad (\text{Equation 3.3})$$

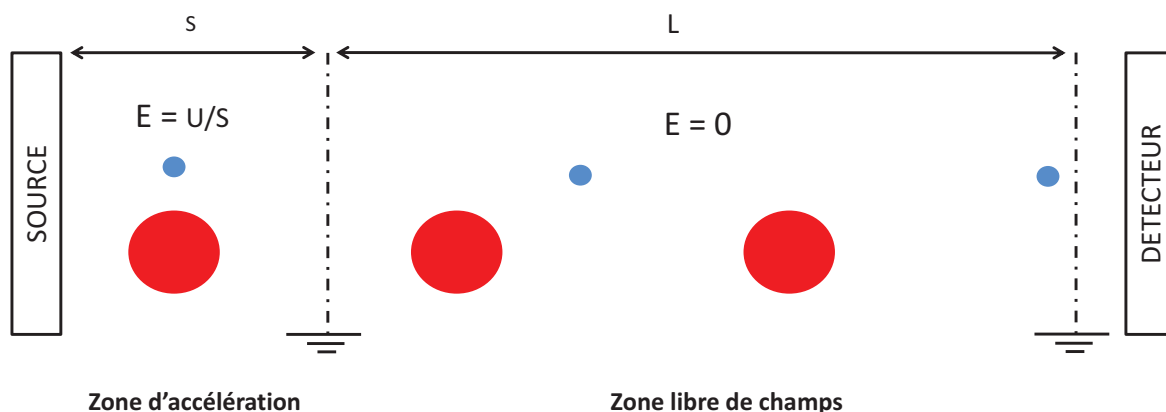


FIGURE 3.2 – Schéma du fonctionnement d'un spectromètre à temps de vol (TOF). La particule rouge a un rapport m/z plus grand que la particule bleue.

Cette dernière équation montre que deux ions avec des rapports masse sur charge différents auront des temps de vol différents s'ils sont accélérés au même moment et au même endroit. C'est de cette manière que les ions sont triés selon leur rapport m/z . On parle alors de mode linéaire. Généralement, l'étalonnage du spectromètre est obtenu grâce à un mélange de molécules dont les masses sont connues.

Malgré une grande sensibilité, cet analyseur utilisé en mode linéaire ne présente pas une grande résolution en masse. En effet, si deux molécules de même masse et de même charge ont des vitesses initiales différentes, elles n'auront pas le même temps de vol. C'est notamment le cas pour notre processus de mise en phase gazeuse puisqu'il transfère nos molécules en phase gazeuse en leur attribuant une large distribution de vitesse supersonique autour de 1000 m/s avec une vitesse à 100 m/s. Cette dispersion énergétique inhérente au processus de mise en phase gazeuse de notre source détériore la résolution. En plus de cette distribution énergétique, deux molécules identiques peuvent être produites à des endroits différents et/ou des temps différents dans la zone d'accélération. Ces distributions spatiales et temporelles ont également pour effet de diminuer la résolution en masse.

Pour pallier à ces problèmes de résolution, il aura fallu attendre les travaux de Mamyrin en 1973 sur le réflectron et les travaux de Wiley et McLaren en 1955 sur l'extraction retardée.

3.1.3.1 Réflectron

Le système réflectron a été introduit par Mamyrin en 1973 [76]. Ce système permet de corriger la distribution initiale en énergie des ions. C'est-à-dire, pour deux ions de même rapport masse sur charge ayant des énergies cinétiques différentes, le réflectron permet leur focalisation sur le plan temporel au niveau du détecteur. Il est composé d'une série d'électrodes annulaires portées à des potentiels croissants, ce qui génère un champ électrique opposé au parcours des ions provenant de la source. Ainsi, pour deux ions de même rapport masse

sur charge avec des énergies cinétique différentes, l'ion le plus énergétique pénètre plus profondément dans le réflectron jusqu'à atteindre une vitesse nulle et être réfléchi vers un détecteur. Alors que l'ion le moins énergétique atteindra également une vitesse nulle et sera réfléchi, mais pénétrera moins profondément dans le réflectron.

C'est ainsi que des ions de même rapport masse sur charge avec des énergies cinétiques différentes parviendront au même moment sur le détecteur (figure 3.3). Le réflectron permet donc d'obtenir une bonne résolution en masse, cependant il ne permet pas d'être large dans la gamme de masse. Cette faible gamme de masse est un problème pour nos études qui seront exploratoires.

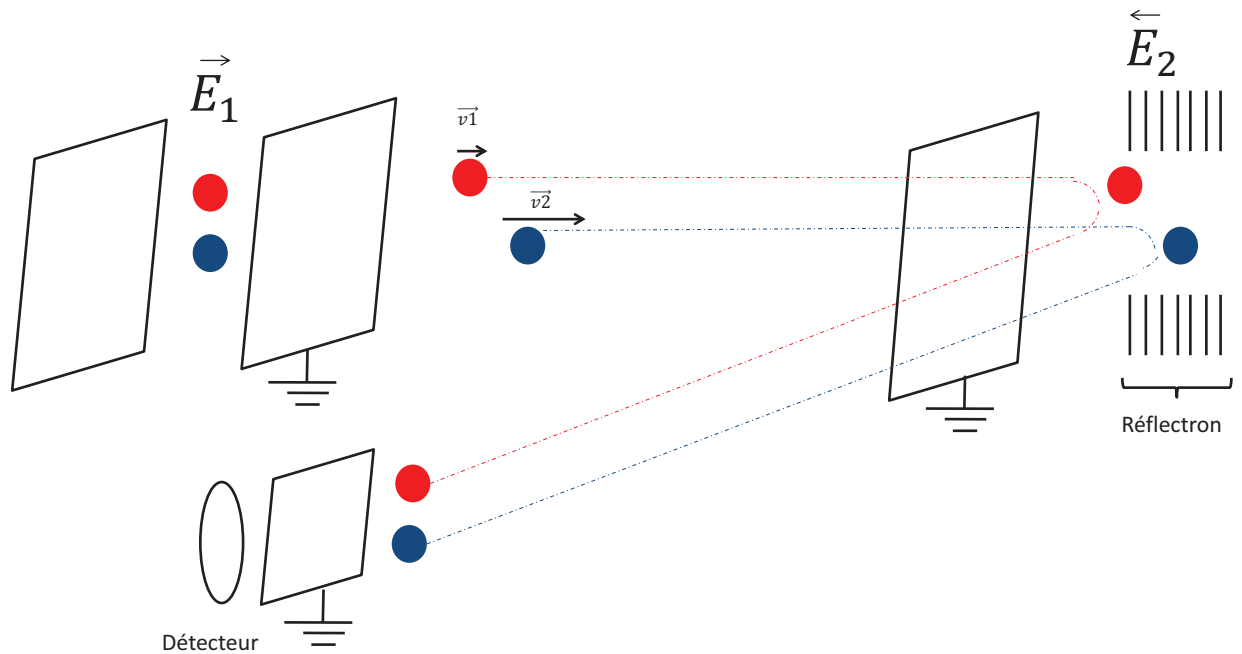


FIGURE 3.3 – Schéma du fonctionnement d'un réflectron. L'ion rouge a une vitesse initiale plus faible que l'ion bleu. Le réflectron permet aux ions de vitesses initiales différentes d'arriver en même temps au niveau du détecteur.

J'ai développé un TOF de type réflectron lors de ma première année de thèse, mais pour les tests de caractérisation générale de la source, puisque ce système a une trop faible gamme de masse, nous avons opté pour un autre type de TOF basé sur une extraction retardée.

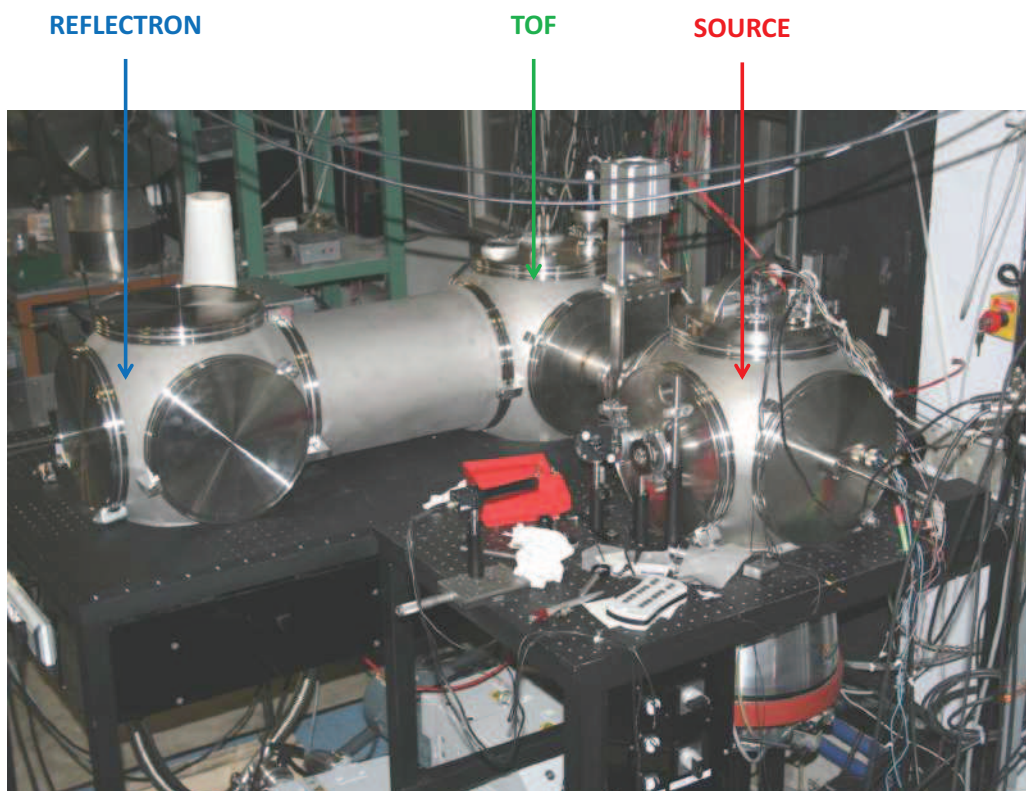


FIGURE 3.4 – Le réflectron se trouve au bout du cylindre. Une fois que les ions ont été réfléchis par le réflectron ils sont détectés par un détecteur à galettes de micro-canaux.

3.1.3.2 Extraction retardée

Comme j'en ai parlé précédemment lors de la mise en phase gazeuse il existe une distribution de vitesse souvent assez large des ions. C'est-à-dire que deux ions identiques donc de même rapport m/z ont des vitesses initiales différentes. Cette distribution conduit à un élargissement des pics de masse (voir figure 3.5). En effet, si deux ions de même rapport n'ont pas la même vitesse initiale, leur temps d'arrivée est différent. De plus, il se peut aussi que deux ions de même rapport m/z avec la même vitesse ne soient pas créés au même moment. Cela aussi conduit à un élargissement des pics. Plusieurs scénarios sont possibles. Pour les corriger, on peut appliquer une extraction retardée (time-lag energy focusing) développée en 1955 par Wiley et McLaren [77].

Cette technique est décrite dans le figure 3.6. Deux ions, un ion lent (en rouge) et un ion rapide (en bleu) de même rapport m/z sont créés avec des vitesses différentes dans la zone d'accélération. Ils sont poussés par une différence de potentiel de quelques centaines de volt dans la zone d'extraction retardée. Ensuite, une différence de potentiel est appliquée pendant quelques μs avec un certain délai, dans cette zone d'extraction retardée. L'ion ayant la vitesse initiale la plus grande reste moins longtemps dans la zone

d'extraction retardée et donc acquière moins d'énergie. L'ion ayant la vitesse initiale la plus faible passe plus de temps dans la zone d'extraction retardée. Ainsi, il ressent plus longtemps la différence de potentiel élevée dans cette zone et acquière plus d'énergie que l'ion initialement le plus rapide. On module cette différence d'énergie acquise entre les ions lents et les ions rapides en jouant sur le délai auquel on impose une différence de potentiel dans la zone d'extraction. Cette technique permet donc aux ions "retardataires" de rattraper les plus rapides afin d'arriver sur le détecteur au même moment. De cette façon on améliore la résolution en masse.

MODE LINEAIRE

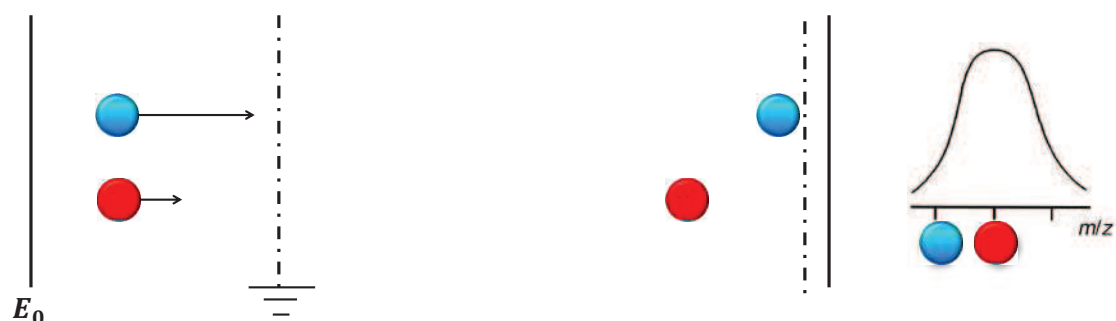


FIGURE 3.5 – Dans le mode linéaire deux ions de même rapport m/z avec des vitesses initiales différentes arrivent sur le détecteur à des temps différents.

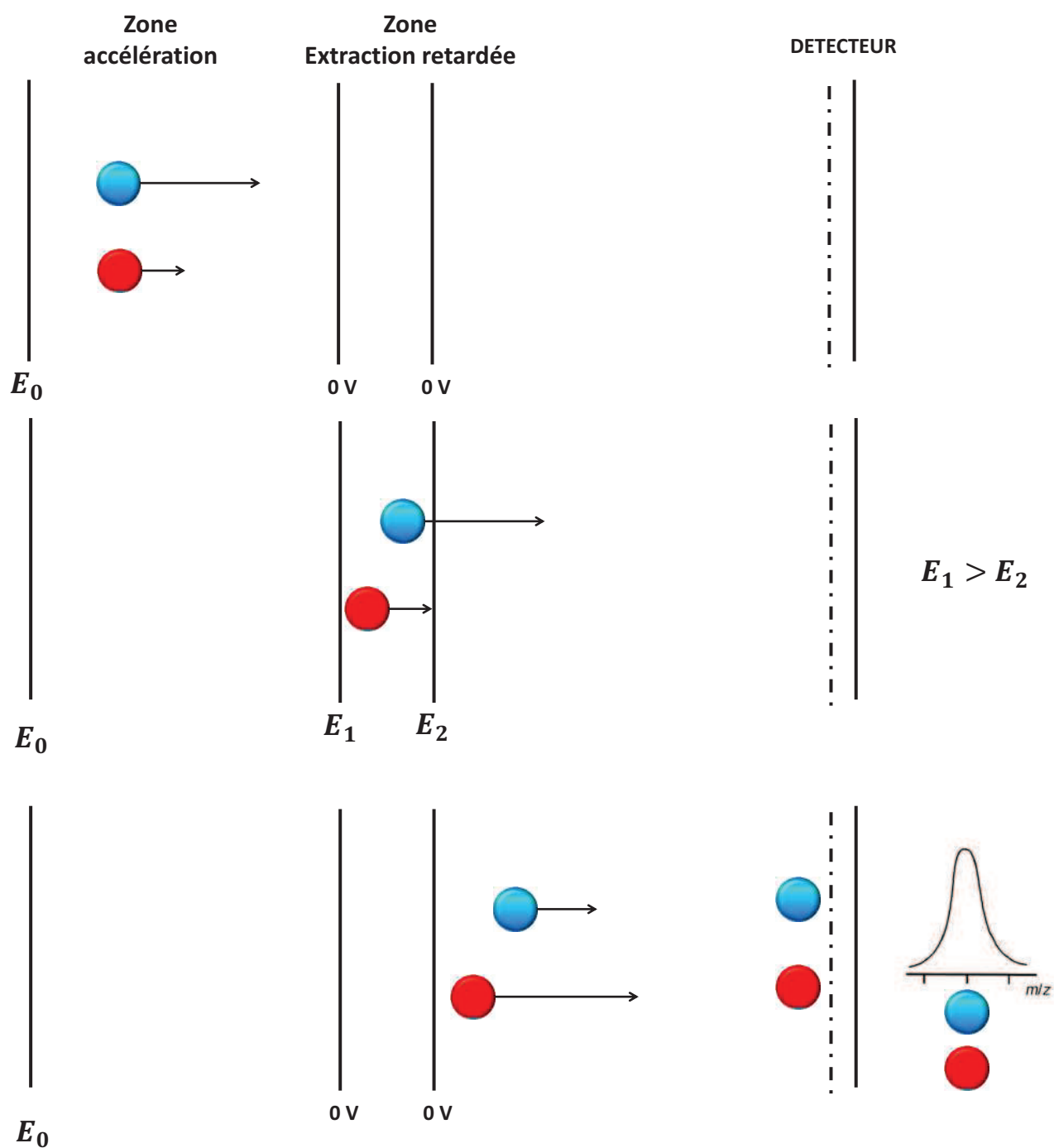


FIGURE 3.6 – En haut, deux ions de même rapport m/z ayant des vitesses différentes sont poussés dans la zone d'extraction retardée. Une fois les deux ions dans cette zone d'extraction retardée, on applique pendant quelques μs une différence de potentiel (figure du milieu). Au bout de quelques μs on coupe l'extraction retardée, autrement dit on annule la différence de potentiel dans la zone d'extraction retardée. Grâce à cette méthode les ions retardataires ont rattrapé les plus rapides.

3.1.3.3 TOF de notre dispositif expérimental

Je vais maintenant décrire en détail notre dispositif. Pour rappel, la première enceinte, où sont désorbés les ions, s'appelle la *source* et la seconde enceinte est appelée *zone vol libre* (voir chapitre 2 section 2.2 figure 2.7) dont un schéma du TOF est représenté figure 3.7.

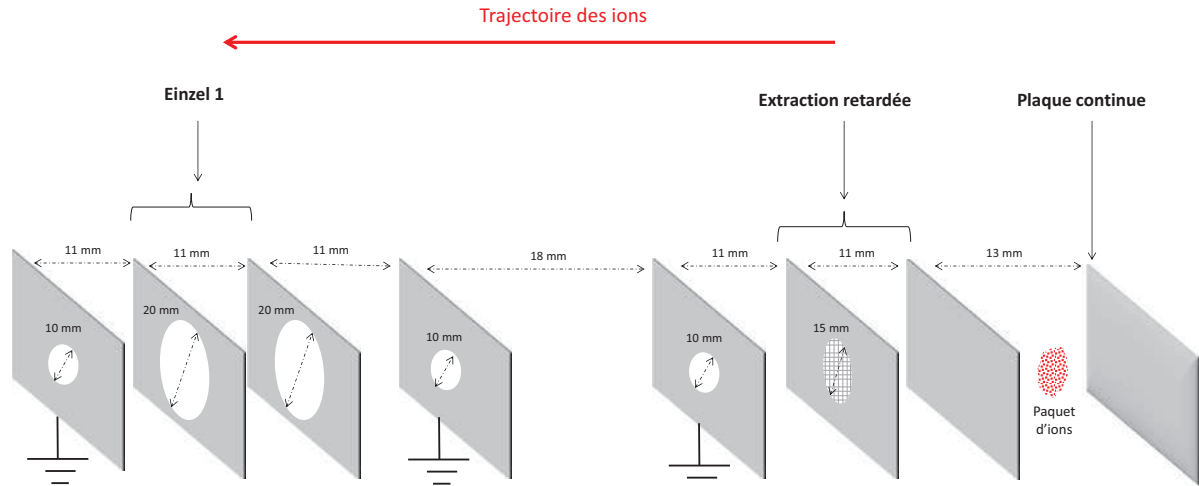


FIGURE 3.7 – Représentation schématique du temps de vol. Les dimensions des plaques sont 80x40 mm.

Sur cette figure, j'ai représenté les éléments présents dans la *source*. Les ions sont désorbés entre la plaque continue et la première plaque d'extraction retardée. La plaque continue est une plaque pleine alors que les plaques de l'extraction retardée ont une grille. Ensuite, les ions traversent la zone d'extraction retardée. Les deux plaques d'extraction retardée sont indépendantes d'un point de vue électrique et sont pulsées. La première lentille de Einzel est composée de 4 plaques : deux plaques centrales portées à un même potentiel, et deux plaques (une à chaque extrémité) à la masse. Cette lentille permet une focalisation du faisceau d'ions sans modification de l'énergie cinétique des ions.

Dans la partie *zone vol libre*, il y a une seconde lentille d'Einzel (plaque de 80 mm x 80 mm), qui permet de focaliser le faisceau d'ions sur le détecteur. Sur la figure suivante, deux photos ont été prises dont la première représente les plaques dans la *source* (Plaque continue, extraction retardée et Einzel 1) et la deuxième, les plaques dans la partie *zone vol libre* (Einzel 2).

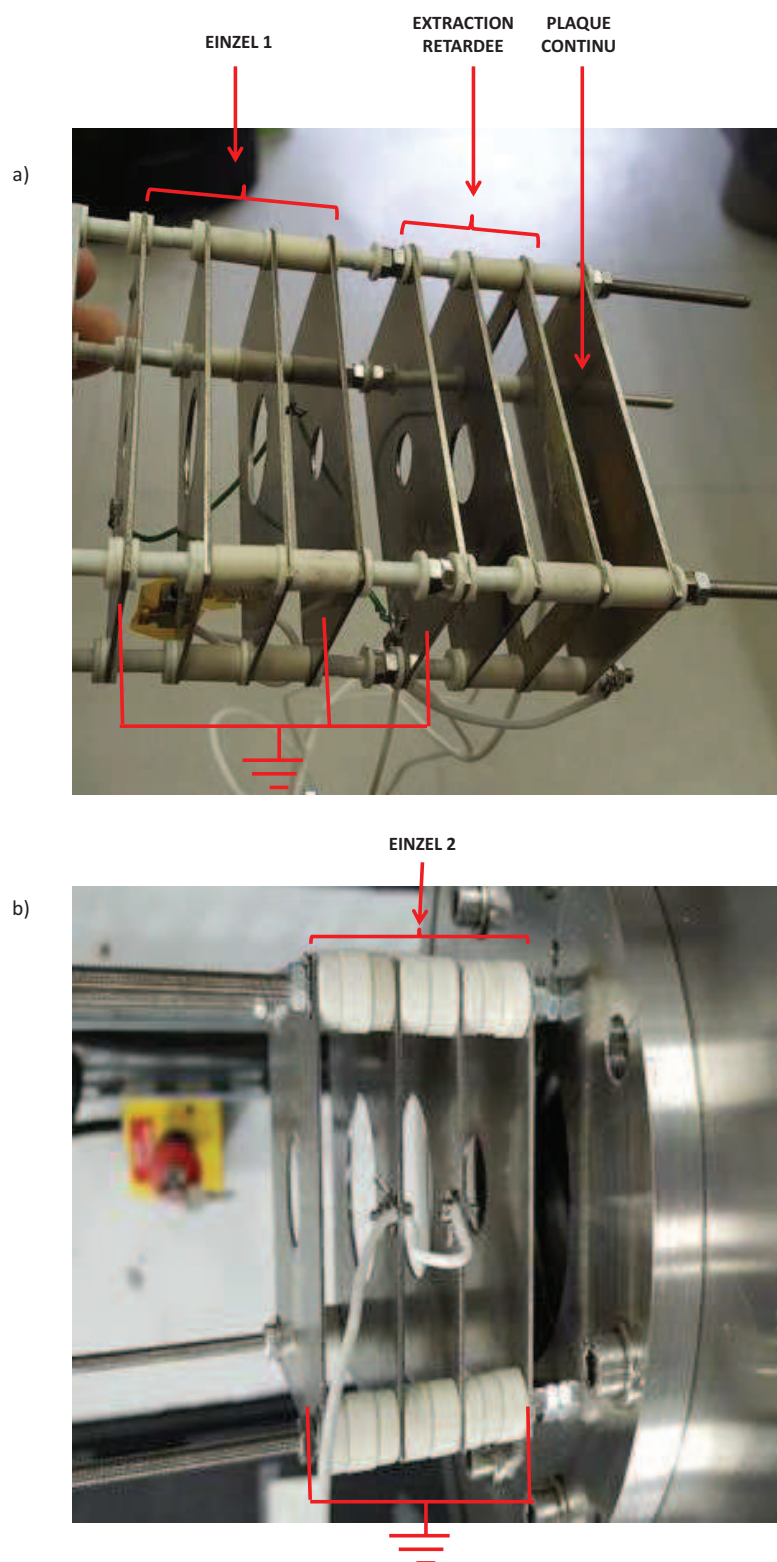


FIGURE 3.8 – a) Photographie du système d'extraction dans la *source*. b) Photographie de la seconde lentille d'Einzel situé en amont de la *zone vol libre*.

3.1.4 Détection : galette à microcanaux

Une galette à micro-canaux est un réseau composé de 10^4 à 10^7 canaux qui sont parallèles les uns par rapport aux autres (figure 3.9). Pour nos galettes, ces canaux ont un diamètre de $10\text{ }\mu\text{m}$ et une longueur de 3 mm . Les micro-canaux sont composés d'un alliage de chrome et de nickel. Le principe de détection repose sur l'application d'une tension électrique entre la face avant et la face arrière de la galette qui a pour effet de produire un champ électrique d'accélération continu. Un ion qui frappera l'entrée du détecteur, produira δ électrons secondaires, qui eux-mêmes produiront δ^2 électrons secondaires en cascade. Donc, on a un gain $G = \delta^n$, où δ est le coefficient d'émission et n le nombre d'impact. On estime que pour ce type de détecteur le gain varie entre 10^3 et 10^5 . Les micro-canaux sont inclinés de 8° par rapport à la surface de la galette pour que les ions puissent frapper les parois des micro-canaux dans le but de produire un maximum d'électrons secondaires.



FIGURE 3.9 – Schéma d'une galette à micro-canaux [78].

Pour augmenter le gain du détecteur, nous avons couplé deux galettes à micro-canaux assemblées en chevron. L'ensemble peut être considéré comme une seule galette où l'on distingue une face avant et une face arrière. De plus, une post-accélération des ions positifs en sortie de la zone de vol libre est effectuée en amont de la face avant par l'intermédiaire d'une grille mise à la masse. La figure 3.10 présente le schéma de notre détecteur.

En ce qui concerne les tensions, sur la face avant, nous appliquons -500 V et sur la face arrière, 2 kV . On a donc une différence de potentiel sur les 2 galettes de 2500 V . On ne dépasse jamais cette valeur, car au-delà on risque de générer des claquages électriques qui pourraient détériorer les galettes. Ce couple de tension permet de travailler avec des ions positifs ou des ions négatifs. En effet, dans le cas des ions positifs, une fois qu'ils ont traversé la grille, ils sont accélérés vers la face avant portée à -500 V . Ensuite,

des électrons secondaires sont produits et accélérés vers la face arrière portée à 2000 V. Pour les ions négatifs, après avoir traversé la première grille, ils sont ralentis par la face avant en raison du signe de cette dernière, mais pas assez pour ne pas produire d'électrons secondaires. Après, comme pour les ions positifs, les électrons secondaires sont accélérés vers la face arrière toujours portée à 2000 V. A priori, on devrait être moins efficace pour les ions négatifs que pour les ions positifs, mais les intensités des spectres obtenus expérimentalement étaient sensiblement les mêmes pour les cations et les anions.

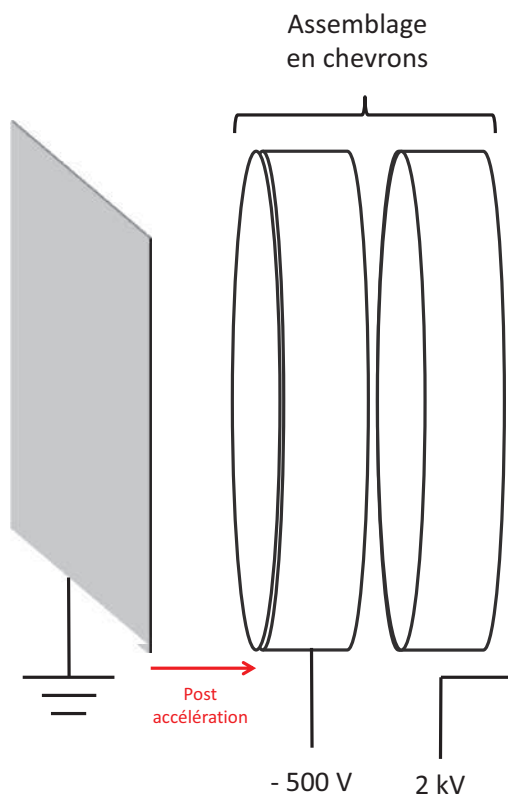


FIGURE 3.10 – Schéma du montage de deux galettes à micro-canaux assemblées en chevron. Sur la face avant, on applique -500 V, tandis que sur la face arrière, on applique 2000 V. Ce couple de tensions est appliquée pour les cations.

3.2 Résultats expérimentaux et simulations avec le logiciel SIMION

Dans cette partie, je présente mes résultats expérimentaux avec différentes molécules dont les masses sont variées et connues. Ces résultats, qui sont sous forme de spectre de masse, ont permis de caractériser notre source de mise en phase gazeuse. Pour

interpréter ces spectres expérimentaux, j'ai utilisé le logiciel SIMION 8.0. Il permet de simuler la trajectoire d'ions soumis à des potentiels électrostatiques. Ces simulations nous permettront d'étudier la résolution en masse et apporterait des informations sur le processus de désorption.

En premier lieu, je présente le fonctionnement du logiciel SIMION 8.0 d'une manière générale, la géométrie du temps de vol représenté sous SIMION et le programme que nous avons développé pour simuler une extraction retardée dans ce logiciel. Ensuite, je présente les spectres expérimentaux qui nous ont permis de caractériser notre source. Enfin, je présente des simulations qui ont pour but d'interpréter les résultats expérimentaux.

3.2.1 SIMION 8.0

SIMION 8.0 est un logiciel qui permet de simuler les trajectoires de particules chargées lorsqu'elles sont soumises à des champs électriques. Notamment, il résout les équations de Laplace pour des potentiels donnés, appliqués sur des électrodes, afin d'obtenir le potentiel et le champ électrique associé en tout point de l'espace.

Pour faire fonctionner le logiciel, il y a trois étapes à suivre : tout d'abord, on définit une zone (workbench) dans laquelle des électrodes sont créées avec la forme géométrique désirée. Ensuite vient le calcul du potentiel électrostatique par la résolution de l'équation de Laplace dans tout l'espace soumis aux potentiels électrostatiques appliqués sur les électrodes. Et finalement, le logiciel calcule les trajectoires des ions et permet leur visualisation. Pour le calcul du potentiel électrostatique en tout point de l'espace, le logiciel résout l'équation de Laplace par la méthode des différences finies qui repose sur un maillage du volume défini initialement. Plus le nombre de points dans ce maillage est important plus le calcul du potentiel électrostatique en tout point du volume sera précis. Néanmoins, le nombre de points est limité par la mémoire vive de l'ordinateur utilisé. Dans mon cas, pour avoir une représentation du dispositif expérimental au millimètre, j'ai eu besoin d'un volume de 364 suivant (Ox), 364 points suivant (Oy) et 1000 points suivant (Oz), ce qui correspond à $1.3 \cdot 10^8$ points. Or, un point nécessite 10 bytes de RAM. Donc, 1.32 Gbytes étaient nécessaires pour simuler la trajectoire des ions dans un tel volume.

De plus, on peut ajouter un programme qui permet entre autres, de donner des instructions aux électrodes comme le changement d'un potentiel appliqué sur une électrode au bout d'un certain temps défini préalablement. Plus loin, je détaillerai le programme utilisé pour notre extraction retardée. L'utilisation de ce logiciel permet de savoir quels potentiels il est nécessaire d'appliquer pour que les ions atteignent le détecteur avec une transmission et une résolution en masse optimales. On peut également faire le raisonnement inverse, c'est-à-dire, partir des potentiels utilisés pour un spectre expérimental donné, les injecter dans le logiciel SIMION et faire varier les conditions initiales des ions (vitesse, direction, etc) afin de trouver quels paramètres traduisent le spectre expérimental de la meilleure manière. La connaissance des conditions initiales des ions (après leur mise en phase en gazeuse) permet d'optimiser les potentiels à appliquer sur les électrodes, et apporte des informations sur les processus de désorption.

Dans la partie suivante, je présente la géométrie de la source dans son ensemble,

représentée sous SIMION 8.0 (figure 3.11).

3.2.2 Géométrie du spectromètre de masse sous SIMION

Avec SIMION, on peut choisir l'échelle sous laquelle on va définir notre géométrie. L'unité pour la distance est "unité de grille" ou bien "unit". L'échelle standard est 1 mm pour 1 unit. Si on prend l'échelle 0.5 mm pour 1 unit, les calculs seront plus précis mais plus coûteux en mémoire vive. Comme je l'ai dit plus haut, 1 unit utilise 10 bytes de RAM. Notre géométrie a les dimensions suivantes : 364 mm selon (Ox), 364 mm selon (Oy) et 1000 selon (Oz). Ces distances sont celles du dispositif grandeur nature. Donc j'ai utilisé l'échelle 1 mm = 1 unit car je ne disposais pas assez de mémoire vive pour utiliser l'échelle plus précise de 0.5 mm = 1 unit et que les calculs sont déjà suffisamment précis avec cette échelle pour l'utilisation que l'on souhaite en faire.

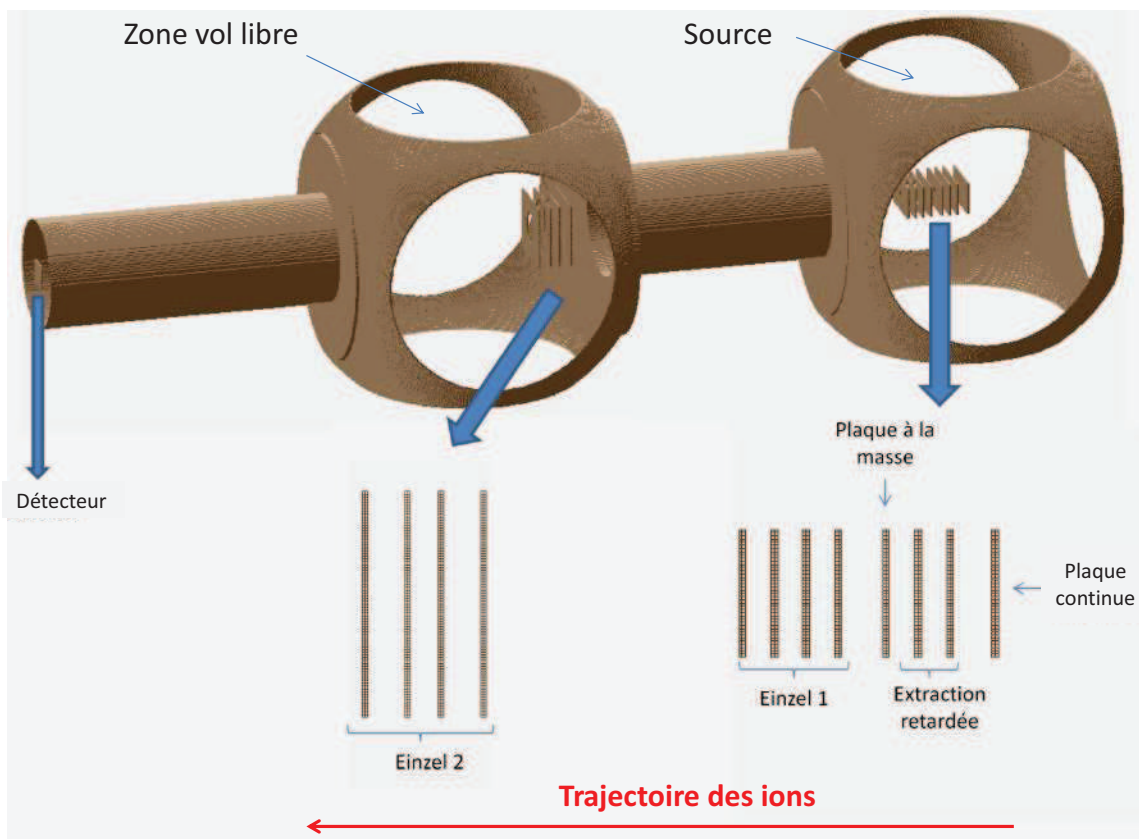


FIGURE 3.11 – Schéma du dispositif dans son ensemble représenté sous SIMION.

On retrouve toutes les électrodes définies sur la figure 3.7 dans la partie 3.1.3.3. Dans l'enceinte contenant la *source*, on trouve la plaque continue, l'extraction retardée et la première lentille de Einzel (Einzel 1). Un cylindre sépare cette enceinte (*zone vol libre*) de la suivante dans laquelle se trouve une deuxième lentille de Einzel (Einzel 2) et la

majeure partie de la zone de vol libre. Le détecteur se trouve au bout d'un dernier cylindre.

Maintenant que la géométrie a été présentée, je vais décrire le programme que nous utilisons dans SIMION.

3.2.3 Programme : extraction retardée

Ce programme a été écrit avec le langage PRG. Il permet de pulser les électrodes de l'extraction retardée pendant un certain temps (durée d'extraction), avec un certain délai (délai d'extraction) par rapport à l'instant auquel les ions sont créés (envoi du laser de désorption).

```
defa _E03      -2700. ; Deuxième plaque accélération (pulsé)
defa _E04      -2200. ; Troisième plaque accélération (pulsé)

defa _Extraction_duration      5.      ; Largeur du pulse d'extraction
defa _Extraction_delay         7.5     ; Délai d'extraction
defa _Extraction_ok            0.      ;

seg Fast_Adjust
rcl _Extraction_ok
x>0 goto Extraction_on
0
sto Adj_Elect03
sto Adj_Elect04
exit

lbl Extraction_on
rcl _E03
sto Adj_Elect03
rcl _E04
sto Adj_Elect04

;-----
seg Other_Actions

rcl _Extraction_delay
rcl ion_time_of_flight
x>=y goto duration_condition1 ; vrai si le temps de vol est supérieur au délai d'extraction
0 sto _Extraction_ok
exit

lbl duration_condition1
rcl _Extraction_duration
rcl _Extraction_delay +
rcl ion_time_of_flight
x<=y goto Extraction_ok ;vrai si le temps de vol est inférieur à (délai + durée du pulse)
0 sto _Extraction_ok
exit

lbl Extraction_ok
1 sto _Extraction_ok
```

FIGURE 3.12 – Programme permettant de pulser les électrodes de l'extraction retardée.

Sur la figure 3.12, les lignes de code définies dans la case grise permettent de définir les variables du programme. Ces variables peuvent être modifiées dans le logiciel. On a donc défini les potentiels des électrodes de l'extraction retardée (`_E03` et `_E04`), la durée de l'extraction retardée ("`_Extraction_duration`"), donc la durée du pulse pendant lequel ces électrodes sont portées à un potentiel non nul et le délai d'extraction ("`_Extraction_delay`") qui permet de fixer l'instant auquel on porte ces électrodes à un potentiel non nul, instant repéré par rapport à l'instant de création des ions. La variable "`_Extraction_ok`" permet d'imposer le pulse ou pas, en passant de l'état 1 à l'état 0.

Dans la case rouge, il y a une suite d'instructions que je détaille ici. Le programme commence par rappeler la variable "`_Extraction_ok`" définie ci-dessus par la commande "`rcl`". Ensuite, si $x > 0$, donc si "`_Extraction_ok`" > 0 alors on va au label "`Extraction_on`". Pour le moment ce n'est pas le cas, puisqu'on a donné par défaut la valeur de 0 à "`_Extraction_ok`". A la ligne suivante, il y a 0. Ce 0 sera le potentiel appliqué aux 2 électrodes de l'extraction retardée. Donc, tant que "`_Extraction_ok`" vaut 0, aucune tension n'est appliquée sur les électrodes de l'extraction retardée.

Ensuite le programme sort de cette partie (`exit`) et se dirige à la partie : `seg Other_actions`. Il commence par rappeler "`_Extraction_delay`" et "`ion_time_of_flight`". Cette dernière variable correspond au temps écoulé depuis l'instant de création des ions. Ensuite, si $x \geq y$, donc si "`ion_time_of_flight`" $\geq$ "`_Extraction_delay`", alors le programme va à "`duration_condition1`" (avec ce langage, une condition du type $x \geq y$, signifie que l'on compare la dernière valeur rappelée (x) à la première valeur (y)). Imaginons que le temps écoulé depuis l'instant de création des ions soit supérieur au délai d'extraction, donc que "`ion_time_of_flight`" $\geq$ "`_Extraction_delay`". Le programme, dans "`duration_condition1`", rappelle trois valeurs : il fait la somme de "`_Extraction_duration`" et de "`_Extraction_delay`" (somme stockée dans y) et compare cette somme à "`ion_time_of_flight`" (x). Si $x \leq y$, la variable "`_Extraction_ok`" bascule dans l'état 1, et le programme recommence la liste d'instructions depuis le début (`seg Fast_Adjust`). Cette valeur de "`_Extraction_ok`" conduit le programme à la partie "`Extraction_on`", et les potentiels stockés dans les variables `Elect03` et `Elect04` sont alors appliqués aux électrodes concernées. Ces potentiels restent appliqués tant que "`ion_time_of_flight`" reste inférieure à "`_Extraction_duration + _Extraction_delay`". Toutes ces instructions sont répétées avec un pas de temps de 0.05 μ s. Donc, toutes les 0.05 μ s, on incrémente "`ion_time_of_flight`" et on la compare avec "`_Extraction_delay`" + "`_Extraction_duration`" pour réaliser certaines tâches.

Donc, ce programme applique des potentiels non nuls sur les électrodes délimitant la zone d'extraction retardée si "`_Extraction_delay`" $<$ "`ion_time_of_flight`" $<$ "`_Extraction_delay + _Extraction_duration`". Sinon, un potentiel nul est appliqué sur ces deux électrodes.

Je présente deux figures (voir figure 3.13) qui illustrent le fonctionnement du programme dans un cas où l'ion franchit la zone d'extraction retardée (et atteint donc le détecteur), et dans un cas où l'ion ne franchit pas cette zone.

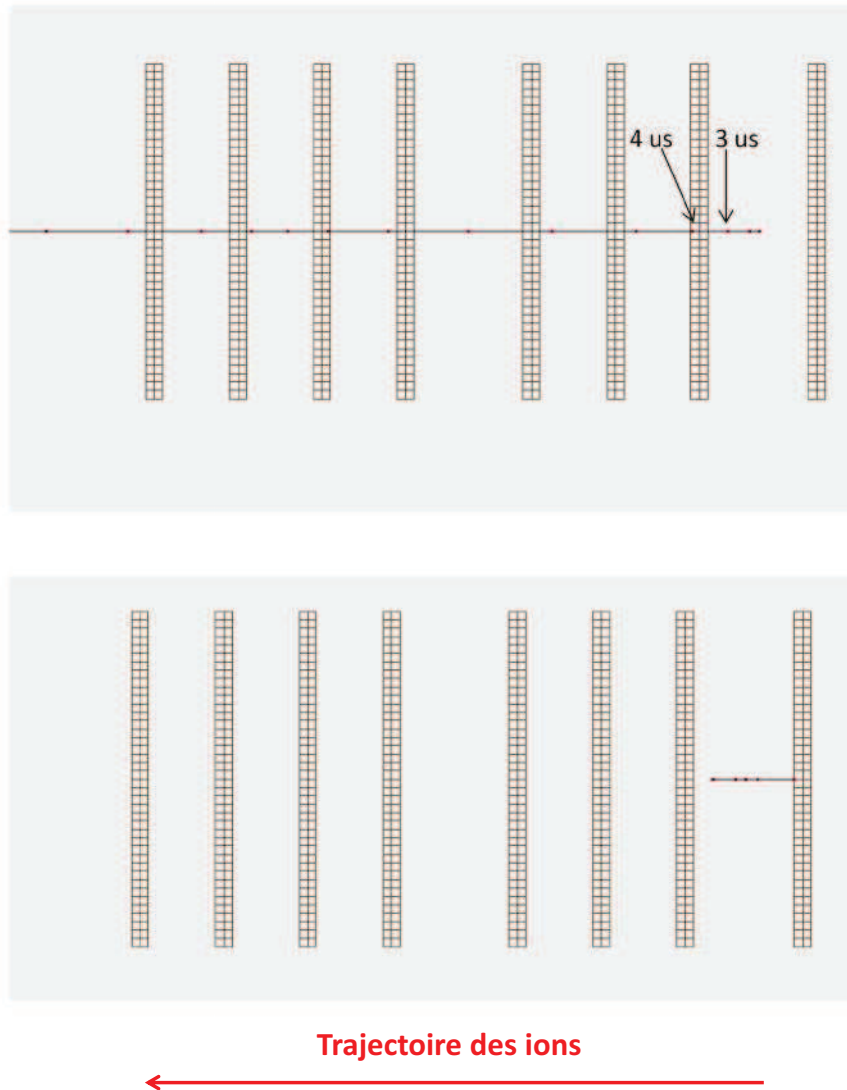


FIGURE 3.13 – Illustration du fonctionnement du programme. En haut, le délai est fixé à 4 μs , et les ions franchissent la zone d'extraction retardée. En bas, le délai est de 3 μs , et les ions sont repoussés par la première électrode de cette zone.

Les plaques que l'on voit sur la figure 3.13 sont (en partant de la droite) : la plaque continue, les deux plaques de l'extraction retardée, une grille à la masse et une lentille de Einzel composée de 4 plaques (dont les deux à l'extérieur sont à la masse). Je rappelle que la goutte explose entre la plaque continue et la première plaque de l'extraction retardée, donc les ions sont créés entre ces deux plaques. Les points rouges représentent la position de l'ion à chaque μs . Donc, pour le premier point (point le plus à droite) il s'est déjà écoulé 1 μs . On constate qu'au bout de 4 μs , l'ion est au niveau de la première plaque d'extraction. L'ion passe l'extraction retardée car dans le programme je déclenche l'extraction avec un délai de 4 μs pour la figure du haut. Puisque l'ion au bout de 4 μs est dans la zone d'extraction retardée, il peut franchir cette zone. Dans la figure du bas, j'ai

changé le délai qui vaut maintenant 3 μ s. L'ion au bout de 3 μ s, se trouve juste avant la première plaque de l'extraction retardée qui est portée à cet instant à 2900 V. L'ion n'a donc pas l'énergie suffisante pour franchir cette barrière de potentiel et rebrousse chemin.

En résumé, pour que l'ion puisse atteindre le détecteur, il est nécessaire qu'il ait franchi la première plaque de l'extraction retardée avant que celle-ci ne soit portée au potentiel d'extraction.

3.2.4 Spectres expérimentaux : vancomycine, bradykinine, complexe non-covalent, tryptophane zipper, nanoparticules d'or fonctionnalisées

Je présente ici une série de résultats sur des molécules déjà étudiées au sein de l'équipe (sauf les nanoparticules d'or fonctionnalisées) et qui possèdent des masses différentes afin de caractériser les possibilités et performances de notre source de gouttelettes. Plusieurs d'entre elles ont déjà été obtenues en phase gazeuse via électrospray, comme la vancomycine et la bradykinine. Le tryptophane Zipper a été utilisé dans la thèse de Nga Le Thi [79] au sein de notre équipe. Elle a 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. Seuls les nanoparticules d'or fonctionnalisées n'ont pas été auparavant étudiées dans notre équipe. Donc, hormis les nanoparticules d'or, nous connaissons ces molécules assez bien.

3.2.4.1 bradykinine et vancomycine

Le premier spectre que je présente est composé de la molécule de bradykinine (1060 u.m.a) et de la vancomycine (1449 u.m.a). La première est produite à partir d'une enzyme libérée par la sueur et a un effet vasodilatateur. C'est-à-dire qu'elle dilate les vaisseaux sanguins, ce qui a pour effet de baisser la pression artérielle pour que le sang circule plus facilement. Sa masse molaire est de 1060 g.mol⁻¹. La vancomycine quant à elle est un médicament qui appartient au groupe de médicaments appelés *antibiotiques* et est utilisée en dernier recours. Sa masse molaire est de 1449 g.mol⁻¹. Dans la figure 3.14, les structures de ces 2 molécules sont représentées.

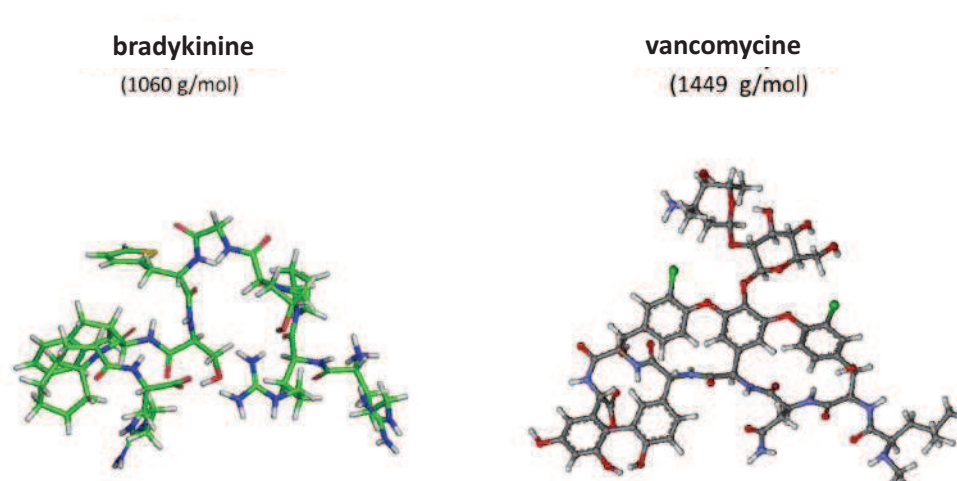


FIGURE 3.14 – Structures de la bradykinine et de la vancomycine.

La bradykinine et la vanomycine étaient dissoutes dans un mélange d'eau et de DMSO (75% et 25% respectivement) pour obtenir une concentration de 10^{-4}mol.L^{-1} . Si la concentration est plus grande que cette valeur alors le dispenseur finit par se boucher rapidement et si la concentration est plus petite aucun signal n'est observé. Ces deux molécules étaient produites facilement par notre méthode de mise en phase gazeuse et la calibration pour ces 2 molécules est assez simple. Donc, pour des conditions d'extraction similaires, ce spectre où les 2 molécules sont présentes servira de référence pour calibrer de futurs spectres de masse avec des molécules inconnues.

Pour ce spectre obtenu en mode négatif, les tensions appliquées sont les suivantes :

Plaque continue = - 222 V

Première plaque d'extraction retardée = -2900 V

Deuxième plaque d'extraction retardée = -2200 V

Première Einzel = -832 V

Deuxième Einzel = 0 V

Concernant l'extraction retardée, les 2 plaques étaient mises sous tension 7 μs après l'explosion de la micro-gouttelette pendant 1 μs .

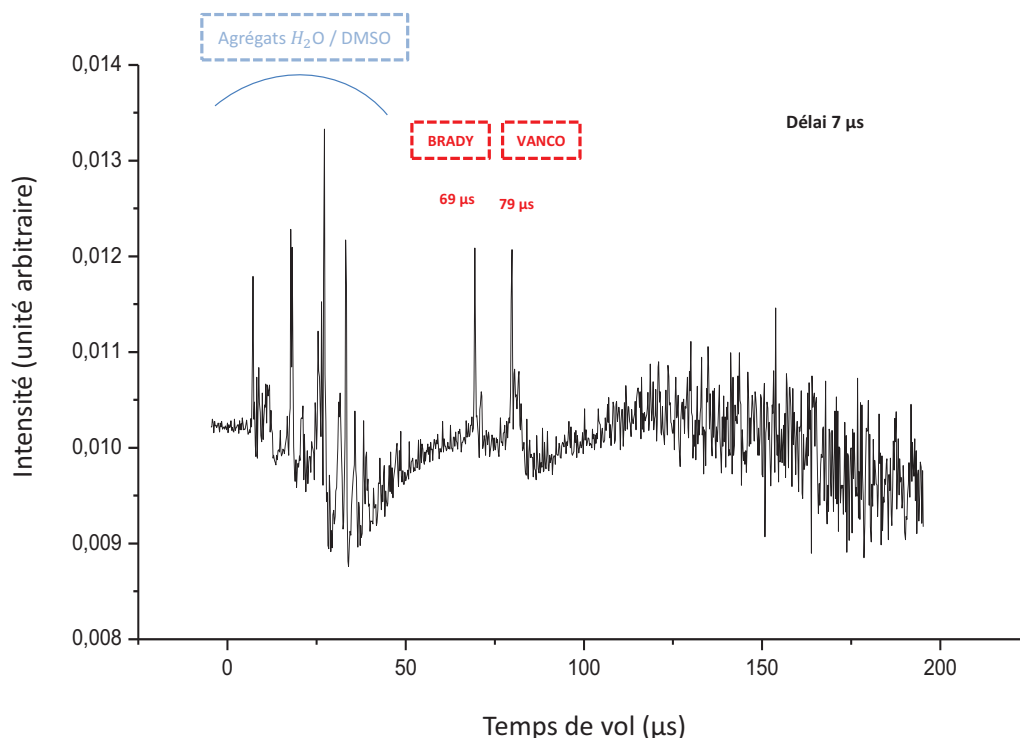


FIGURE 3.15 – Spectre de masse de la bradykinine et de la vancomycine. Ces 2 molécules sont dissoutes dans un mélange de solvant composé d’eau et de DMSO.

J’ai laissé ce spectre en μs afin de montrer comment évoluent les pics en fonction du délai d’extraction.

On observe pour des temps inférieurs à $50\ \mu\text{s}$, des agrégats de solvant composés d’eau et de DMSO. Pour des temps supérieurs à $50\ \mu\text{s}$, il y a 2 pics bien prononcés. Le premier à $69\ \mu\text{s}$ représente la bradykinine et celui à $79\ \mu\text{s}$ est la vancomycine. Le pic de vancomycine apparaît seulement à partir d’un délai d’extraction de $7\ \mu\text{s}$. En effet, à un délai inférieur à $7\ \mu\text{s}$, seuls des agrégats de solvant et le pic de bradykinine (avec une transmission bien plus faible qu’à $7\ \mu\text{s}$) sont observés, comme le montre le spectre de la figure 3.16. On peut expliquer ceci de manière intuitive. Pour une énergie cinétique donnée, la vitesse initiale de la vancomycine est inférieure à celle des molécules de solvant et de la bradykinine puisque ces dernières sont plus légères. Donc, les molécules de vancomycine doivent mettre plus de $6\ \mu\text{s}$ pour franchir la première plaque d’extraction.

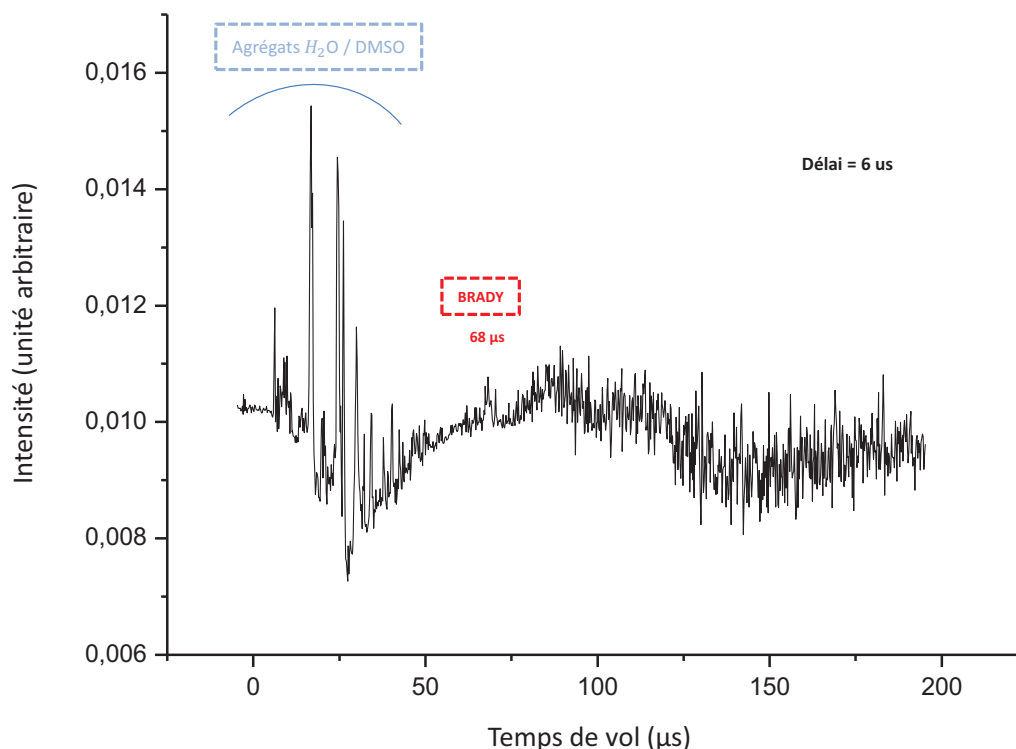


FIGURE 3.16 – Spectre en temps de vol de la bradykinine et de la vancomycine à un délai d'extraction de 6 μ s.

On constate que le pic de bradykinine du spectre ci-dessus est obtenu pour un temps de vol de 68 μ s, pour un délai d'extraction de 6 μ s, alors qu'il arrivait à 69 μ s pour un délai de 7 μ s. En effet, pour les mêmes tensions appliquées, si on diminue le délai d'une μ s, le TOF diminuera également d'une μ s. Ainsi, on est capable de calibrer différents spectres de masse. Par exemple, si un pic arrive à 100 μ s pour un délai de 9 μ s, puisqu'on sait que la bradykinine met 69 μ s pour délai de 7 μ s, alors on peut dire aisément que pour un délai de 9 μ s la bradykinine arriverait à 71 μ s. Donc, on a une référence quelque soit le délai d'extraction pour calibrer n'importe quel pic à partir du moment où on utilise les mêmes tensions que celles utilisées pour le spectre de la bradykinine. On peut faire la même chose avec la vancomycine.

Pour quantifier la résolution d'un spectre, on utilise la définition suivante :

$$R = \frac{M}{\Delta M} = \frac{t}{2\Delta t} \quad (\text{Equation 3.4})$$

La résolution en masse permet de donner la capacité d'un instrument à distinguer deux pics voisins. Par exemple, pour une résolution de 2000, on peut séparer des pics avec des m/z de 2000 et 2001, de 200 et 200.1 ou bien 20 et 20.01. Donc, plus la résolution est

grande, plus les pics sont fins. Dans notre cas, si on s'intéresse au spectre de la figure 3.15, le pic de bradykinine à une largeur temporelle de $0.3 \mu\text{s}$ (figure 3.17). Si on applique la formule ci-dessous, on obtient une résolution de 115 pour une gamme de masse de l'ordre du kDa. Cette valeur n'est pas suffisante concernant nos études d'endommagement de biomolécules puisque nous nécessitons une résolution de l'ordre de l'u.m.a pour des molécules de quelques kilodaltons.

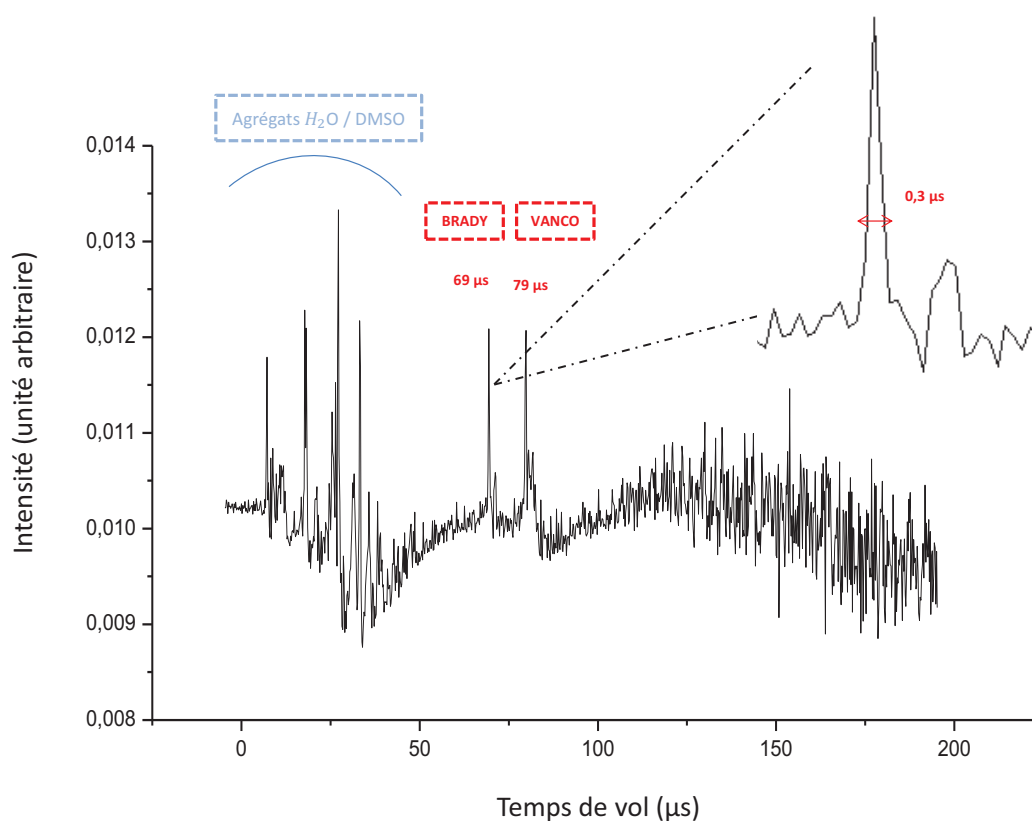


FIGURE 3.17 – Spectre en temps de vol de la bradykinine et de la vancomycine à un délai d'extraction de $7 \mu\text{s}$. En haut à droite, zoom sur le pic de bradykinine.

Puisque j'ai montré comment évoluent les pics en fonction du délai d'extraction, tous les spectres suivants seront maintenant représentés en fonction du rapport m/z et non plus en temps de vol. Dans la figure suivante, je présente le spectre de masse associé au spectre en temps de vol de la figure 3.15.

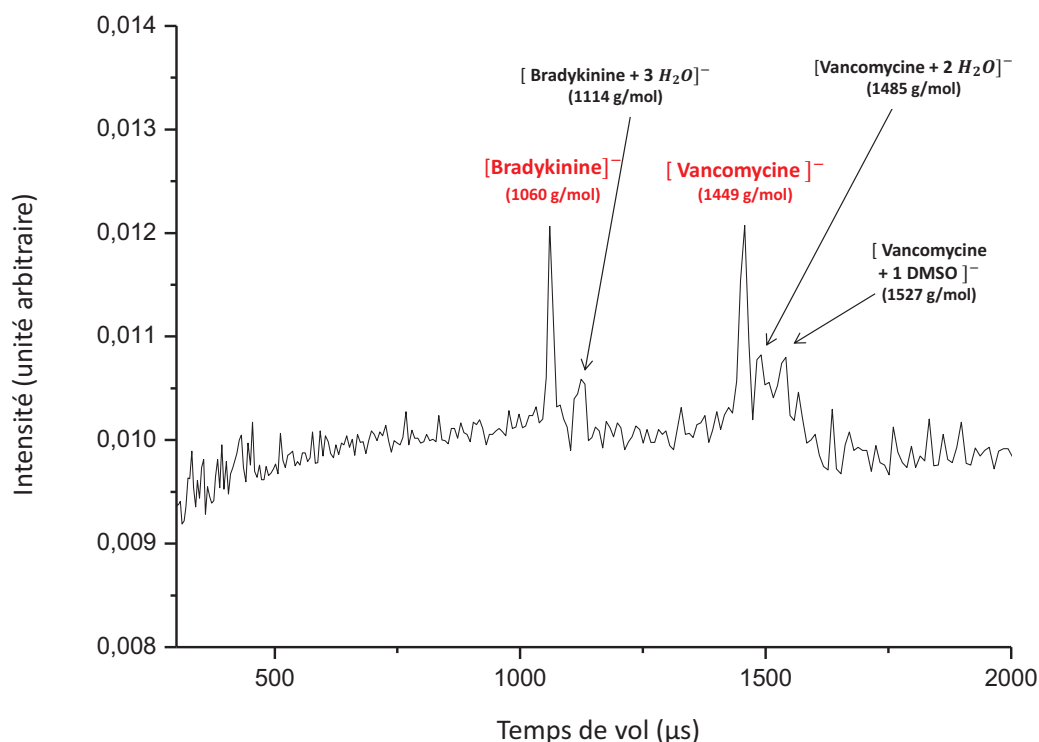


FIGURE 3.18 – Spectre de masse de la bradykinine et de le vancomycine à un délai d'extraction de 7 μs .

Pour calibrer le spectre ci-dessus, j'ai utilisé le pic à 69 μs comme étant la bradykinine (1060 g.mol^{-1}) et celui à 79 μs la vancomycine (1449 g.mol^{-1}).

Le pic à droite de la bradykinine donne la masse exacte d'un complexe formé entre la bradykinine déprotonée (détectée en mode négatif) et 3 molécules d' H_2O (1114 g.mol^{-1}). Il en est de même pour les pics proches de celui de la vancomycine. Le premier est un complexe entre la vancomycine déprotonée et 2 molécules d' H_2O (1485 g.mol^{-1}) et le second un complexe entre la vancomycine déprotonée et 1 molécule de DMSO (1527 g.mol^{-1}).

3.2.4.2 Complexe non-covalent

Dans le spectre suivant, nous nous sommes intéressés à un complexe non-covalent entre la vancomycine et un tripeptide modèle de son "récepteur membranaire" (AC_2KAA) d'une masse de 372 u.m.a. Le principal intérêt d'étudier un complexe non-covalent est de nous permettre de valider la "douceur" de notre méthode de mise en phase gazeuse. En effet, puisque nous voulons le moins possible perturber la structure native (la structure adoptée en solution), il est nécessaire de vérifier si des molécules fragiles telles que des complexes non-covalents restent intact lors de leur transfert vers la phase gazeuse avec

notre méthode de désorption.

En appliquant les mêmes tensions que pour le spectre de la figure 3.15, mais avec un délai de 9 μ s, nous observons le complexe non-covalent avec 2 molécules d'eau. Nous constatons également la présence du tripeptide et la vancomycine (voir figure 3.19).

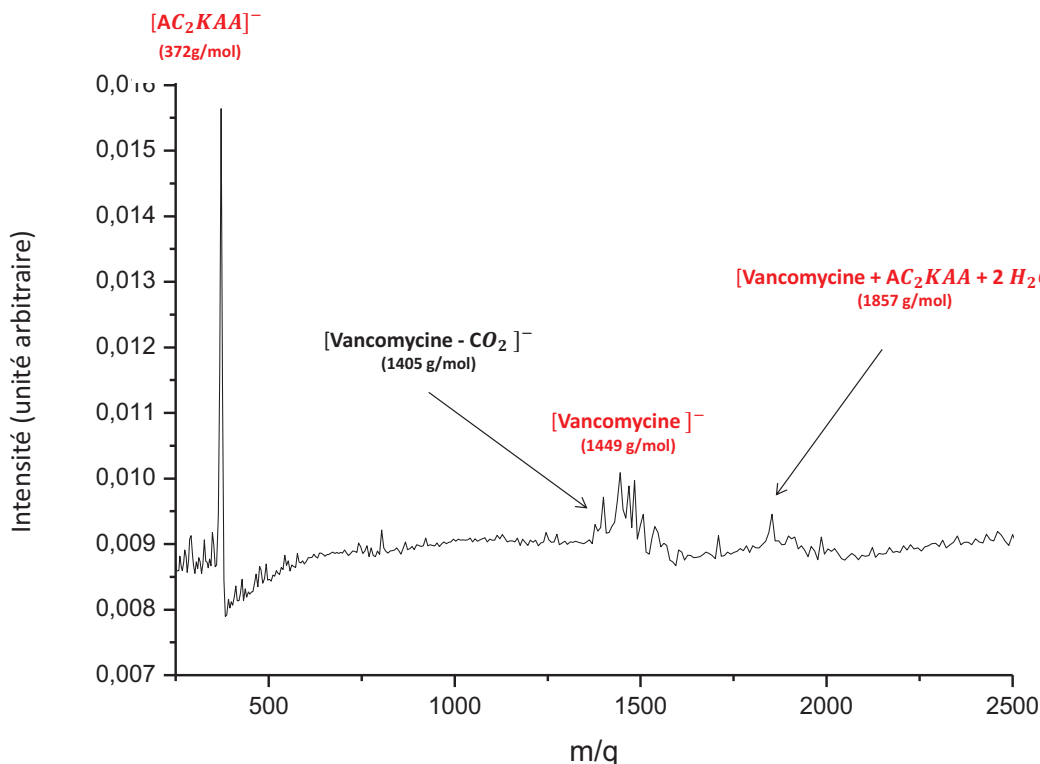


FIGURE 3.19 – Spectre de masse de la vancomycine et son "récepteur membranaire" (AC_2KAA) à un délai d'extraction de 9 μ s.

Nous constatons donc la présence d'un complexe non-covalent (formé en solution) resté intact après désorption. Cependant, nous observons aussi un fragment de la vancomycine qui apparaît seulement à un seuil d'intensité laser de 1.5 mJ (voir figure 3.20). A 2 mJ, les signaux de la vancomycine et de son fragment augmentent et à 3 mJ, le signal de la vancomycine cesse d'augmenter tandis que le fragment lui continue à voir son intensité augmenter. Donc, pour conserver le mieux possible la structure "native" (celle adoptée en solution), nous devons travailler avec une puissance laser la plus faible possible qui permet de transférer les molécules en phase gazeuse sans les fragmenter.

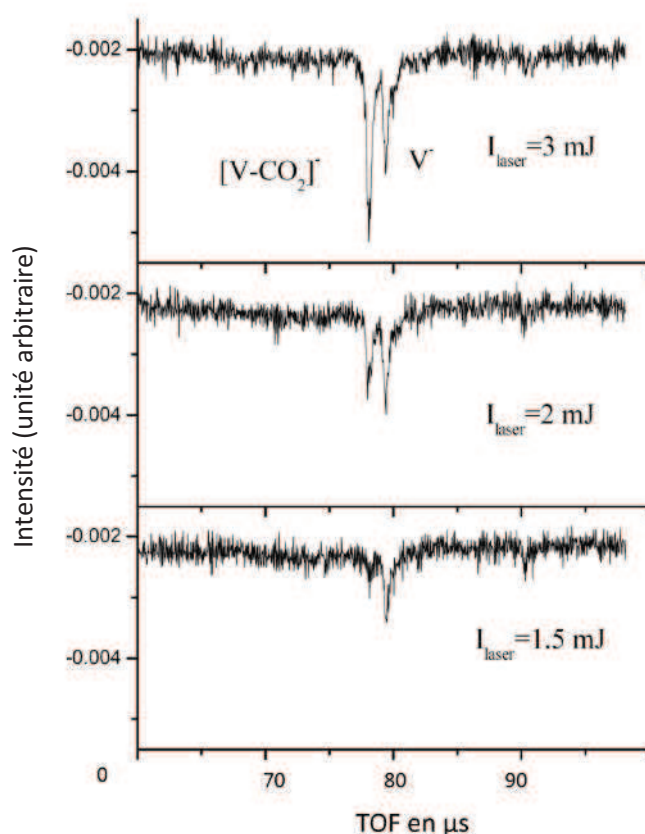


FIGURE 3.20 – Spectre en temps de vol de la vancomycine et d'un de ses fragments en fonction de l'intensité du laser de désorption.

3.2.4.3 Tryptophane zipper

Le tryptophane zipper (TZ4) a une masse de 2012 u.m.a. Cette molécule a été étudiée dans la thèse de la doctorante qui m'a précédée. Elle a étudié la structure adoptée en phase gazeuse de cette molécule par trois techniques expérimentales complémentaires : la spectroscopie IRMPD, la mobilité ionique et la fragmentation ECD. Ici, nous l'utilisons car sa masse molaire est plus élevée que celle de la bradykinine et de la vancomycine.

Dans notre solution, nous avons dissous le TZ4 à une concentration de 10^{-4} mol.L $^{-1}$ dans un mélange composé d'eau et de DMSO. Comme référence de masse, nous avons utilisé la bradykinine à la même concentration que le TZ4.

Les tensions appliquées sur le temps de vol sont les mêmes que celles qui ont permis d'obtenir le spectre de la figure 3.15. A un délai de 7 μ s, on observe des agrégats de solvants ainsi que la bradykinine à 70 μ s. C'est avec un délai de 8 μ s qu'on observe l'apparition d'un pic à 100.6 μ s (voir figure 3.21). En calibrant avec la bradykinine, on ne tombe pas sur la masse du TZ4 mais plutôt sur un complexe entre le TZ4 et plusieurs

molécules de DMSO. Jusqu'à maintenant, nous n'avons trouvé aucune raison qui explique pourquoi on détecte le TZ4 avec 5 molécules de DMSO et non pas avec 4 ou un autre nombre de molécules de DMSO.

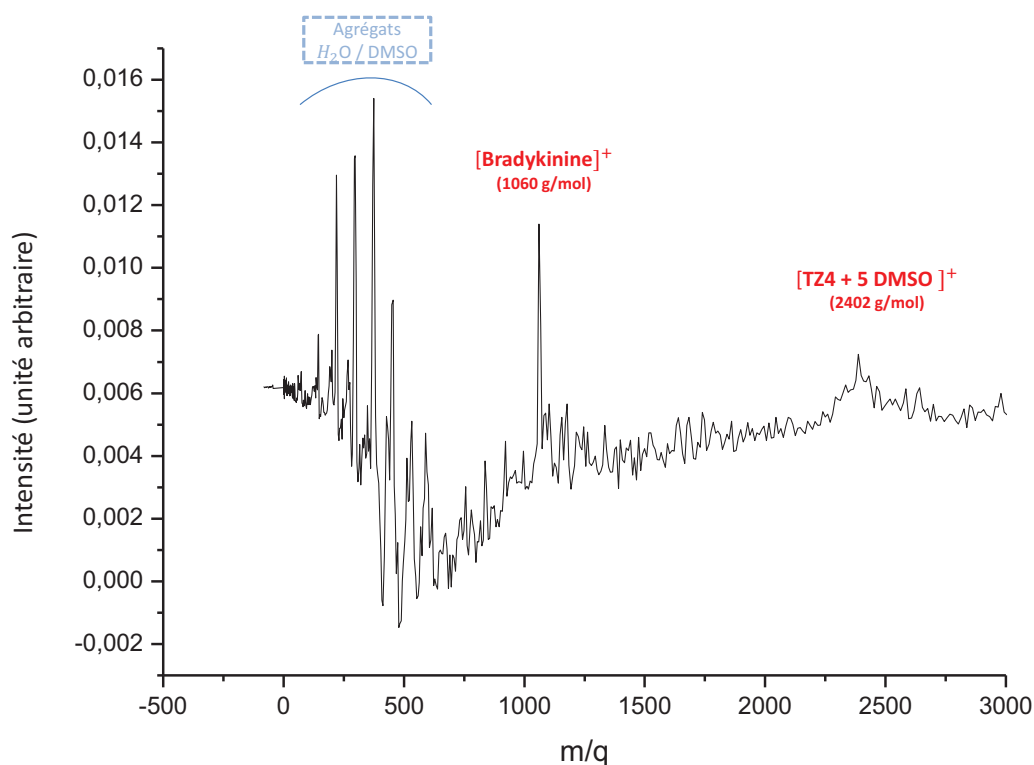


FIGURE 3.21 – Spectre de masse du TZ4 et de la bradykinine pour un délai d'extraction de 8 μ s.

A un délai de 9 μ s, un nouveau pic apparaît à un temps plus long que celui du TZ4 (figure 3.22). En calibrant, on constate qu'il s'agit d'un dimère de TZ4 complexé à une molécule d' H_2O et une molécule de DMSO (4120 g/mol). En effet, plus le délai de l'extraction est important plus on va favoriser des molécules de masses élevée. Le spectre de la figure 3.22 est celui avec la molécule la plus lourde détecté jusqu'à maintenant sur notre dispositif. Cette limite provient des molécules testées et non pas des possibilités de l'expérience.

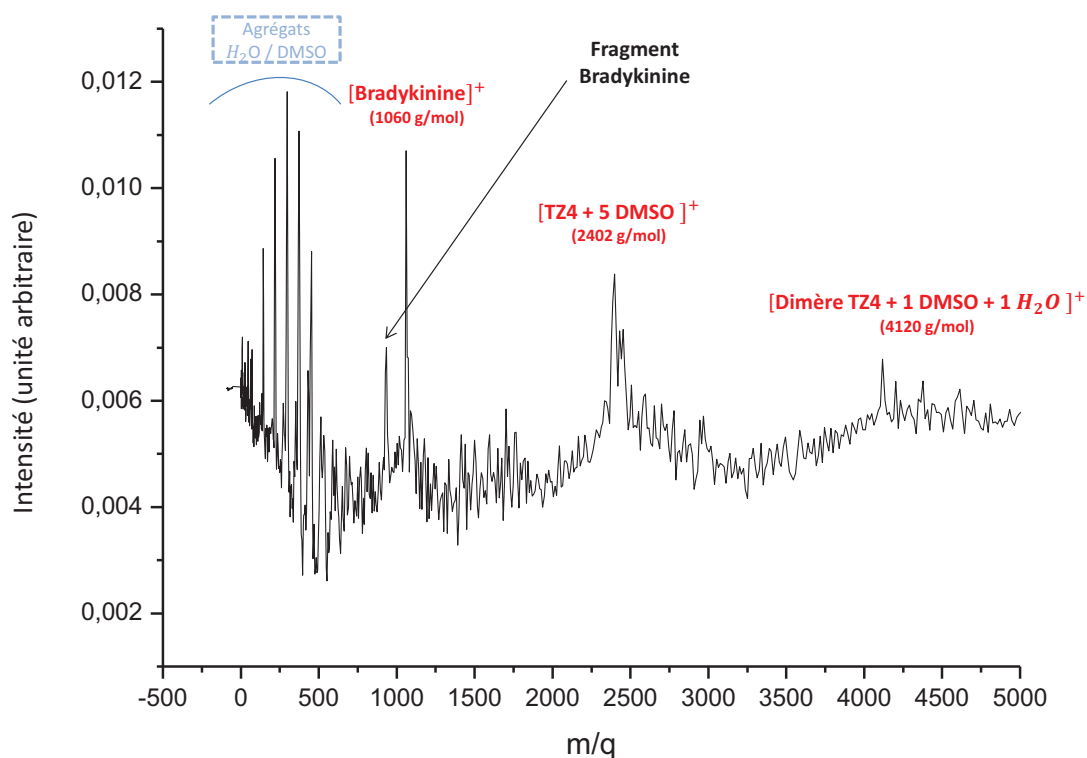


FIGURE 3.22 – Spectre de masse du TZ4 et de la bradykinine pour un délai d'extraction de 9 μ s.

3.2.4.4 Nanoparticules d'or fonctionnalisées

Pour les futures études d'endommagement, les nanoparticules d'or fonctionnalisées sont intéressantes puisqu'elles permettent d'augmenter l'efficacité d'endommagement. En effet, grâce à la fonction attachée en surface de la nanoparticule d'or, elles vont se connecter de manière préférentielle à des cellules cancéreuses et ainsi les nanoparticules d'or une fois irradiées vont libérer un nombre important d'électrons secondaires susceptibles de produire des dégâts plus importants sur les molécules d'ADN. Donc, l'intérêt majeur de ces nanoparticules est de détruire plus efficacement les cellules cancéreuses sans augmenter l'intensité du rayonnement.

Nous avons dissous ces nanoparticules d'or fonctionnalisées avec notre mélange habituel composé d'eau et de DMSO. Dans le spectre de la figure 3.23, nous avons observé la fonction associée aux nanoparticules d'or détectée en mode positif. Cette fonction est un polymère pégylé (HMBP-SO₂-PEG₄₅-COOH) avec une masse de 2378 u.m.a. Elle est notamment utilisé en chimiothérapie.

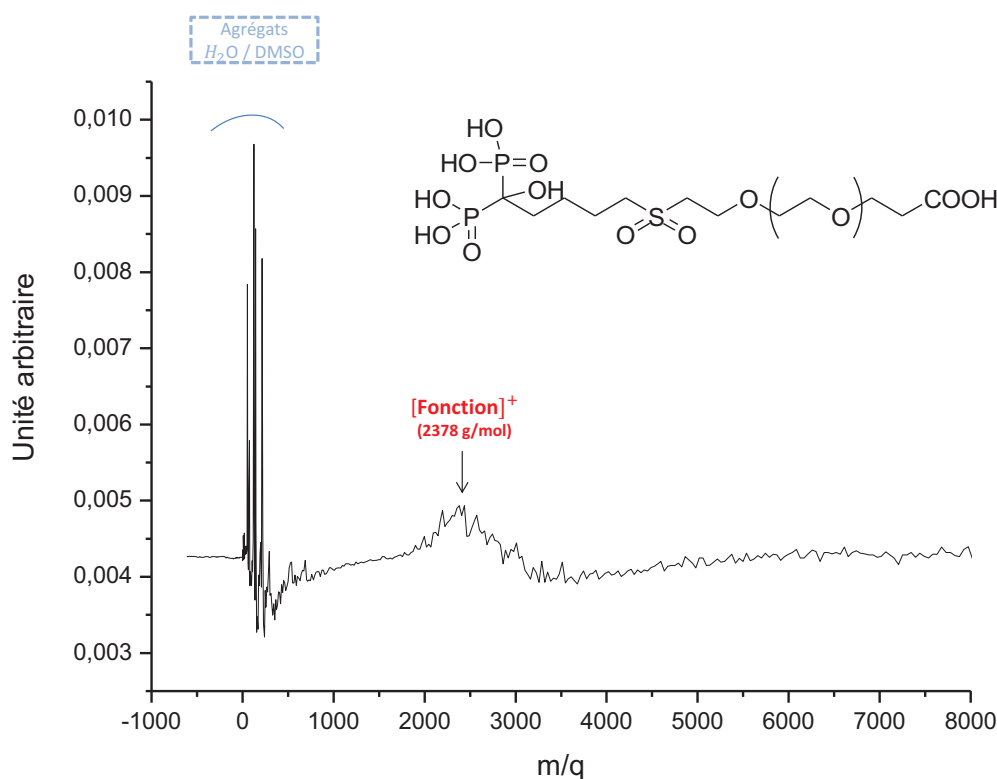


FIGURE 3.23 – Spectre de masse de nanoparticules d’or fonctionnalisées, pour un délai d’extraction de 5 μ s. La molécule représentée correspond à la fonction attachée aux nanoparticules d’or.

La calibration effectuée permet de centrer un pic sur la masse de la fonction. Cependant, le pic est très large. Ceci est lié au fait que pour arracher la fonction, il faut une plus grande distribution en énergie. Alors, le pic est plus élargi que pour celui de la bradykinine ou la vancomycine du spectre de la figure 3.18.

3.2.5 Simulation

Pour interpréter la résolution et la transmission de notre dispositif, je me suis intéressé au spectre de la vancomycine et du tripeptide modélisant son récepteur membranaire (figure 3.19). Dans ce spectre, trois pics apparaissent clairement. Le premier concerne le "récepteur membranaire" (372 g.mol^{-1}) qui met 46 μ s pour atteindre le détecteur, le second est la vancomycine (1449 g.mol^{-1}) qui arrive à 83 μ s sur le détecteur, et enfin le complexe formé entre la vancomycine, son "récepteur membranaire" et deux molécules d’eau. Ce dernier met 93 μ s pour atteindre le détecteur. Dans mes simulations je vais donc simuler les temps d’arrivée de ces trois pics pour différentes conditions initiales (énergie cinétique et direction des ions).

Pour comparer facilement les résultats des simulations à ceux de l’expérience, j’ai

représenté dans la figure suivante, le spectre de la figure 3.19 en version temps de vol.

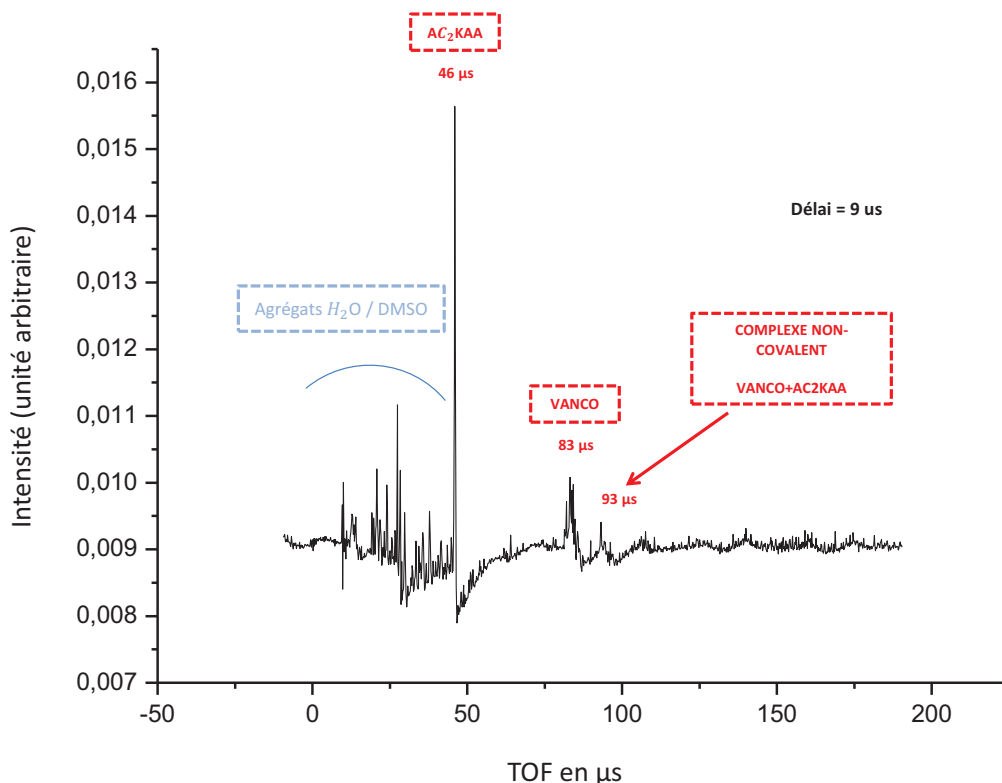


FIGURE 3.24 – Spectre en temps de vol à un délai d’extraction de 9 μ s.

Dans la simulation je mets exactement les mêmes tensions que celles appliquées pour le spectre de la figure 3.19, c’est-à-dire :

Plaque continu = - 222 V
 Première plaque extraction retardée = - 2900 V
 Deuxième plaque extraction retardée = - 2200 V
 Einzel 1 = - 832 V
 Einzel 2 = - 0 V

Les plaques de l’extraction sont mises sous tension au bout de 9 μ s pendant 1 μ s. Dans SIMION, on peut définir plusieurs paramètres pour les ions. Notamment, la masse, la charge, l’énergie cinétique, la direction des ions, la position, etc. Dans mon cas, afin d’être le plus large possible, j’ai choisi de faire partir les molécules dans toutes les directions avec une énergie cinétique qui varie de 0 à 100 eV étant donné que nous ne connaissons pas la distribution en énergie des ions après avoir subi une désorption laser (voir figure 3.25). Pour les 3 pics que je souhaite simuler, j’utilise 100 000 particules pour chaque molécule afin de bien remplir l’ensemble des directions avec les différentes énergies.

How are particles defined?

☐ Individually (.ION)
 ☒ Grouped (.FLY2)
 ☐ Old Grouped (.FLY)

☐ Edit as Text

Coordinates relative to: Work Bench's Origin (mm)

Particle groups:

- Group 1
- Group 2
- Group 3

Add
Delete
Move
Delete All
Import

Selected particle group:

Use:

Num particles: ☒ 1E+5

Mass: single value 372 u

Charge: single value 1 e

Source position: single vector { x: 182 y: 182 z: 178 } mm or gu

Velocity format: direction+KE

Direction: cone direction distribution

Axis vector: { x: 0 y: 0 z: 0 } unitless

Half angle (deg): 160 ☒ Fill

KE: arithmetic sequence

First: 1 Step: 1 eV

Last: 100 100

TOB: single value 0 usec

CWF: single value 1 unitless

Color: single value 0 index

FIGURE 3.25 – Interface pour paramétrer les conditions initiales des ions. Les groupe 2 et 3 concernent respectivement la vancomycine et le complexe entre la vancomycine, son "récepteur membranaire" et deux molécules d'eau. Les 3 groupes ont les mêmes paramètres.

Dans la figure suivante, j'ai représenté l'histogramme des temps de vol des 3 espèces.

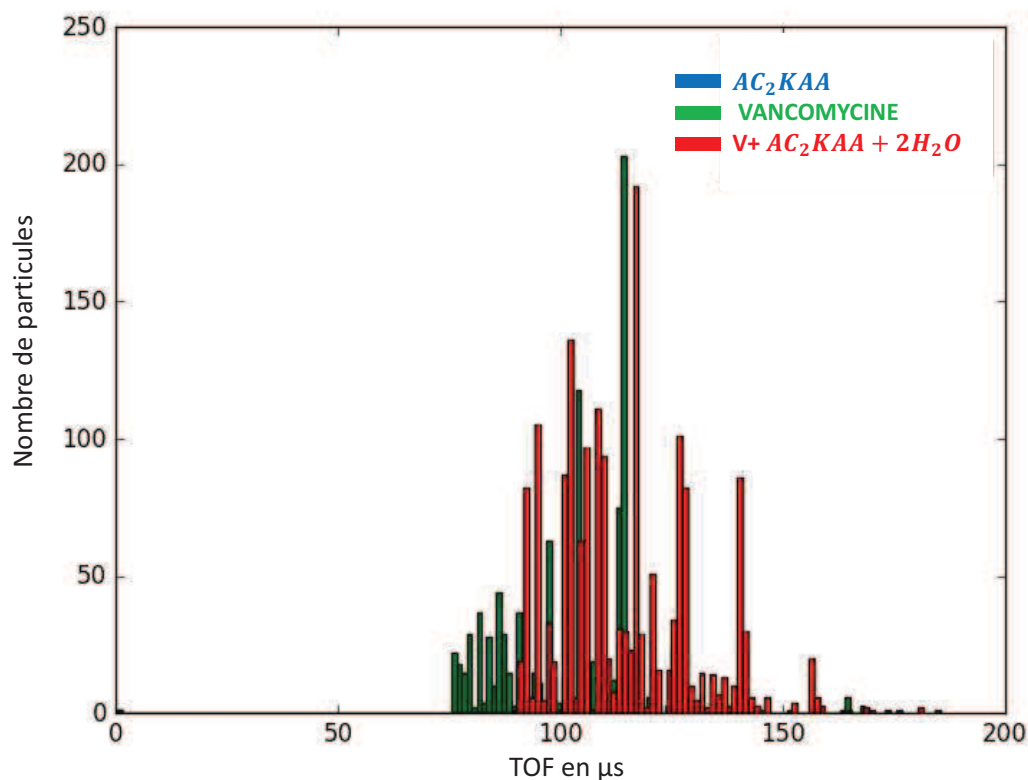


FIGURE 3.26 – Histogramme pour les molécules : AC_2KAA , vancomycine et le complexe $[V + AC_2KAA + 2 H_2O]$.

On constate que pour un délai d'extraction de 8 μs , le tripeptide ne parvient pas jusqu'au détecteur. De plus, puisque pour chaque molécule je fais varier l'énergie cinétique initiale de 0 à 100 eV, les temps de vol sont très larges. Donc, dans un souci de clarté je représente sur les figures 3.27 et 3.28 un histogramme pour chacune des 2 molécules qui sont détectés, c'est-à-dire la vancomycine seule et le complexe $[V + AC_2KAA + 2 H_2O]$.

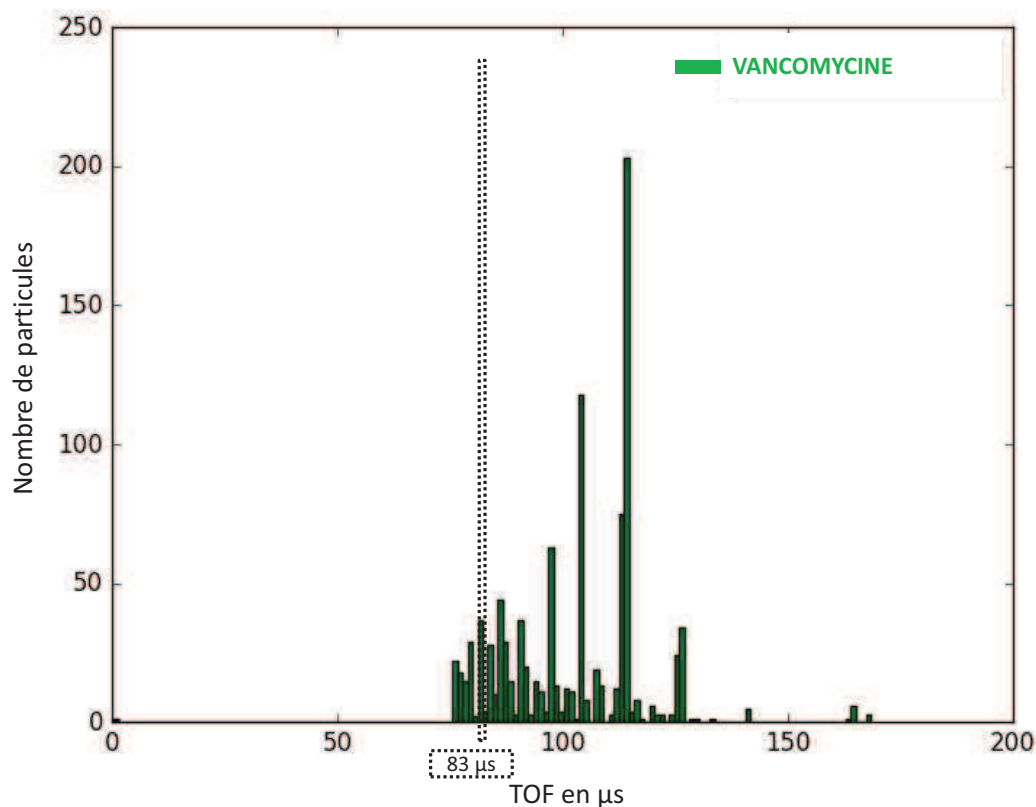


FIGURE 3.27 – Histogramme pour les molécules de vancomycine. En pointillé, j’ai représenté le pic expérimental pour un délai d’extraction de $8\mu\text{s}$.

On observe que les temps de vol sont très larges comme je l’ai dit précédemment en raison de la large distribution en énergie (0 à 100 eV). En effet, une particule avec une énergie cinétique initiale nulle ne passera pas le même temps dans la zone d’extraction retardée qu’une particule avec 100 eV (dirigée vers le détecteur) et donc leurs temps d’arrivée au niveau du détecteur seront très différents. Notamment, les dernières arrivées au niveau du détecteur (supérieur à 150 μs) sont celles qui ont passées le moins de temps dans la zone d’extraction retardée lorsque celle-ci est mise sous tension, et les premières arrivées sont celles qui ont profité le plus longtemps de l’accélération dans la zone d’extraction retardée.

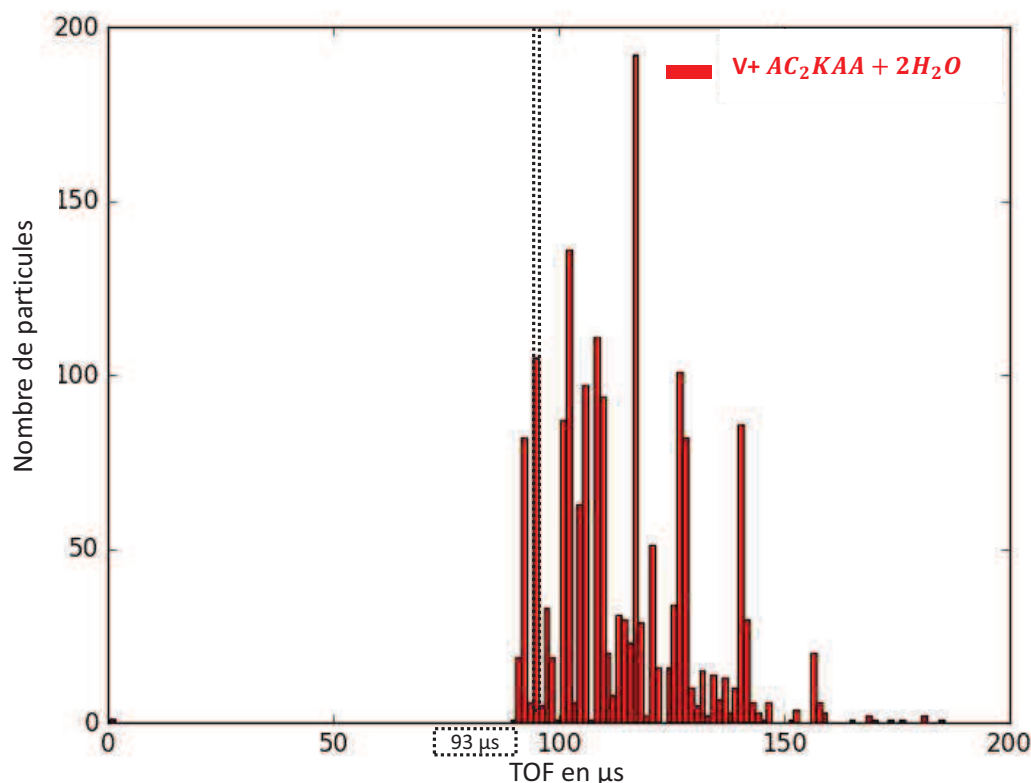


FIGURE 3.28 – **Histogramme pour le complexe $[V + AC_2KAA + 2 H_2O]$. En pointillé, j'ai représenté le pic expérimental pour un délai d'extraction de $8 \mu s$.**

C'est la même explication pour le complexe. Les temps de vol sont très larges à cause de la grande distribution en énergie choisie initialement.

Pour les molécules de tripeptide, je n'ai pas pu représenté d'histogramme puisque quelque soit leur énergie cinétique initiale et leur direction, aucune ne parvient jusqu'au détecteur, pour un délai d'extraction de $8 \mu s$, alors qu'elles sont bien présentes expérimentalement.

Ces molécules qui sont les plus légères sont donc les plus rapides (pour une énergie donnée) par rapport à la vancomycine et le complexe. Donc, ce sont les premières à franchir l'extraction avant qu'elle soit mise sous tension. Cependant, puisqu'elles arrivent avant la vancomycine et le complexe, elles profitent moins longtemps de l'extraction retardée voire pas du tout et donc elles acquièrent moins d'énergie cinétique de la part de l'extraction retardée. De plus, le potentiel de l'Einzel 1 porté à 832 V établit un seuil énergétique en amont de celle-ci. En effet, si l'énergie cinétique acquise via l'extraction retardée n'est pas supérieure à 432 eV, alors les molécules ne franchissent pas l'Einzel 1. C'est exactement ce qui se passe pour la molécule AC_2KAA , et ce quelque soit leur énergie cinétique et direction initiale. Pour démontrer ceci, j'ai relevé pour le cas de la molécule AC_2KAA (372 u.m.a) l'énergie cinétique acquise à l'entrée de l'Einzel 1 en fonction de l'énergie cinétique initiale que j'attribue dans les paramètres de la particule

et cette énergie reste inférieure à 432 eV. C'est donc l'énergie acquise via l'extraction retardée qui va conditionner le franchissement de la première lentille de Einzel par la molécule.

Sur la figure 3.29, on voit le parcours de l'ion (AC_2KAA) partant avec une énergie cinétique initiale nulle. Le point rouge représente un marqueur à une position de 222 mm sur l'axe Z qui est juste avant l'entrée dans l'Einzel 1. A cette position je relève l'énergie cinétique et le temps écoulé. L'ion avec une énergie cinétique initiale nulle met 6.1 μs pour atteindre cette position et a une énergie cinétique de 113 eV (cette énergie cinétique provient du potentiel ressenti par la plaque continue porté à 222 V). Cette énergie n'est pas suffisante pour franchir l'Einzel 1 qui lorsqu'elle est portée à 832 V établit un seuil énergétique de 432 eV en amont de celle-ci.

Puisque je fais varier les particules de 0 à 100 eV dans les simulations précédentes, j'ai relevé également les mêmes informations pour ion avec une énergie de 100 eV dirigé dans le sens du détecteur, donc dans le sens des Z positifs. L'ion met cette fois-ci 4.1 μs pour atteindre la position $Z = 222$ mm. Il met moins de temps pour arriver à cette position puisque son énergie cinétique initiale est plus grande. L'énergie acquise à $Z = 222$ mm est de 213 eV. Cette énergie est plus importante que celle de l'ion qui part avec une énergie nulle car il combine son énergie cinétique initiale et également le potentiel ressenti de la plaque continu porté à 222 V. Cependant, cette énergie n'est toujours pas suffisante pour franchir l'Einzel 1.

J'ai fait de même avec un ion qui partirait dans le sens des Z négatifs afin de traiter tous les cas extrêmes. A 100 eV, l'ion se cogne sur la plaque continue. A 50 eV, la particule rebrousse chemin et met 6.9 μs pour atteindre la position $Z = 222$ mm. Son énergie à cette position est 163 eV, ce qui n'est toujours pas suffisant pour franchir l'Einzel 1. Donc, quelque soit l'énergie cinétique initiale et la direction, l'ion n'a aucune chance d'atteindre le détecteur.

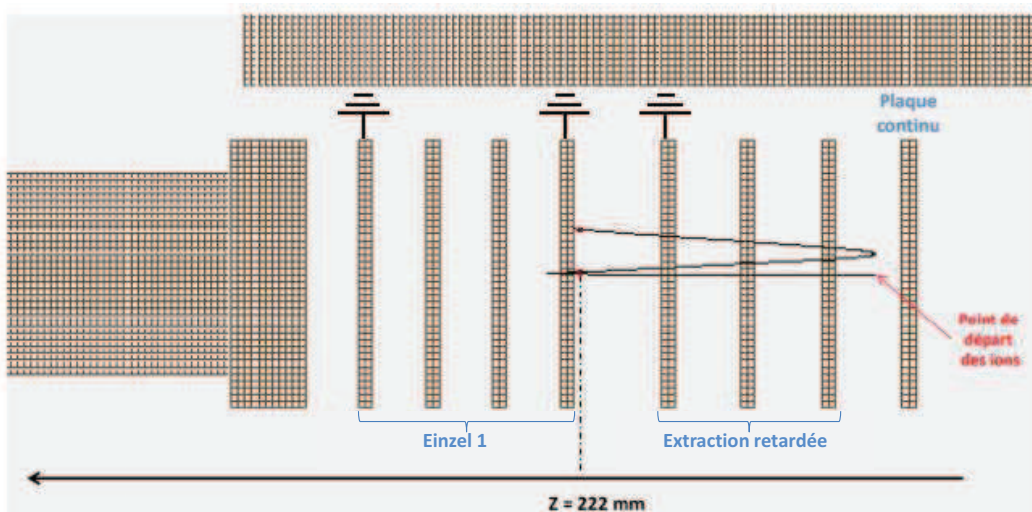


FIGURE 3.29 – Trajectoire de l'ion (AC_2KAA) avec une énergie cinétique nulle. L'ion rebrousse chemin au niveau de l'Einzel 1.

On peut donc en conclure que notre manière de simuler n'est pas assez réaliste. En effet, le fait de ne pas observer les molécules de AC₂KAA dans les simulations ne permet pas de reproduire correctement l'expérience. Notamment, pour ces molécules, il faudrait qu'elles arrivent plus tard dans l'extraction retardée, donc qu'elles passent plus de temps dans la zone où elles sont produites. Pour obtenir ceci, nous avons ajouté un programme qui permet de simuler des collisions avec un gaz à l'endroit où les ions sont produits (le milieu entre la plaque continue et la première plaque d'extraction). Ces collisions devraient faire passer plus de temps aux molécules de AC₂KAA dans la zone de désorption et donc les faire arriver plus tard dans l'extraction retardée, dans l'espoir qu'elles obtiennent une énergie cinétique (en sortie de l'extraction retardée) plus grande que celles obtenues sans gaz.

Lors de la désorption, la pression locale n'est plus celle qui règne dans la chambre sous vide. Il faut prendre en compte des molécules d'eau en périphérie de nos ions d'intérêts biologiques. Ces molécules d'eau entrent en collision avec nos ions et les ralentissent. J'ai donc ajouté une cellule (cube) de collision dont la longueur (dans les 3 dimensions : x, y et z) est de 5 fois le diamètre de la goutte car les photographies de la désorption montrent un diamètre qui est à peu près 5 fois celui de la goutte avant explosion (pour rappel, le diamètre de la goutte est de 50 μm). De plus, ce sont des collisions élastiques, il n'y a donc pas d'activation. Ceci permet de simuler un modèle de désorption dite "douce".

Avec ce programme on peut choisir le libre parcours moyen, la masse des molécules qui composent le gaz de collision et la température. J'ai pris comme température 298 K (aucun refroidissement a été réalisé), pour la masse des molécules du gaz j'ai utilisé la masse de l'eau et comme libre parcours moyen, 10^{-2} mm ce qui est équivalent à une pression de 100 mbar. Si la valeur de la pression est plus faible, les ions ne subissent pas assez de collisions pour qu'il y ait une nette différence, et si la valeur est plus grande, le nombre de collisions est trop grand et de fait, les ions parviennent n'ont pas encore franchit la zone d'extraction retardée que celle-ci est déjà mise sous tension et donc repoussent les ions vers la plaque continue. J'ai donc refait les mêmes simulations (mêmes conditions initiales des molécules, mêmes tensions appliquées et même délai et durée d'extraction) que précédemment, mais en y ajoutant donc, la cellule de collision.

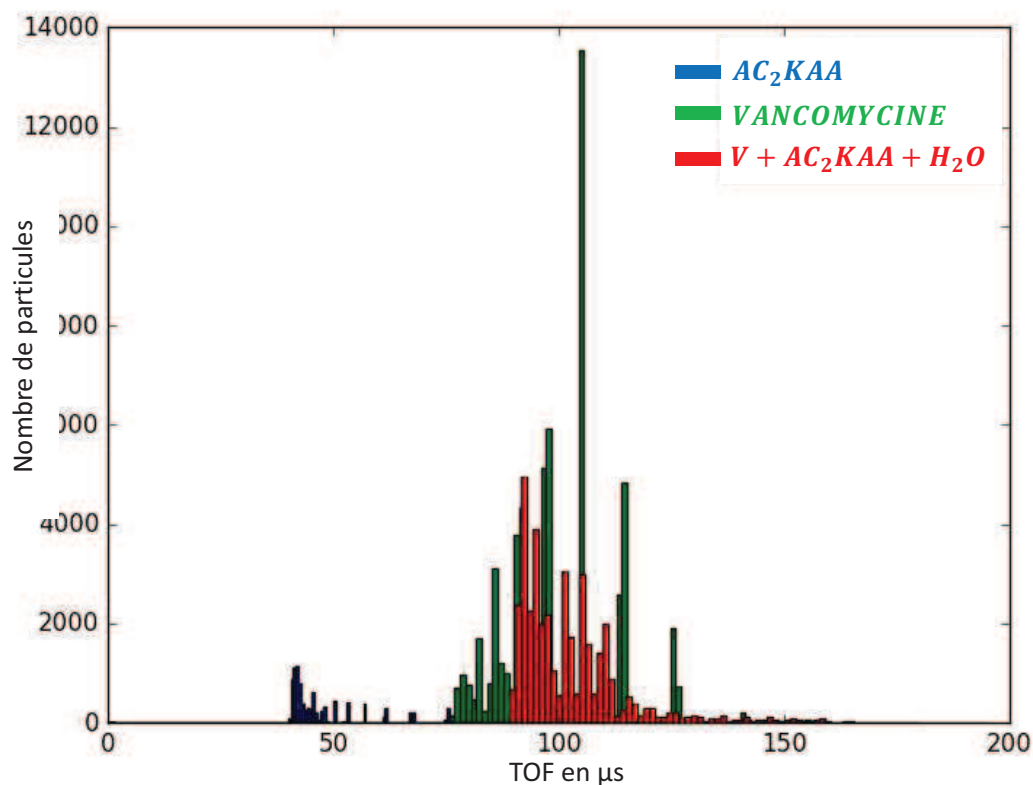


FIGURE 3.30 – **Histogramme (avec gaz) pour les molécules : AC_2KAA , vancomycine et le complexe.**

Cette fois-ci, toutes les molécules atteignent le détecteur (figure 3.30). Donc, l'effet de la cellule de collision réalise bien ce qu'on attendait. Les molécules de AC_2KAA sont retardées dans la zone de désorption et arrivent plus tard dans la zone d'extraction retardée. Elles passent donc plus de temps dans cette zone et acquièrent une énergie cinétique suffisante pour franchir l'Einzel 1.

Puisque les temps de vol se recouvrent, je représente les histogrammes pour chaque molécule plutôt qu'un histogramme pour les 3 molécules sur la figure 3.31.

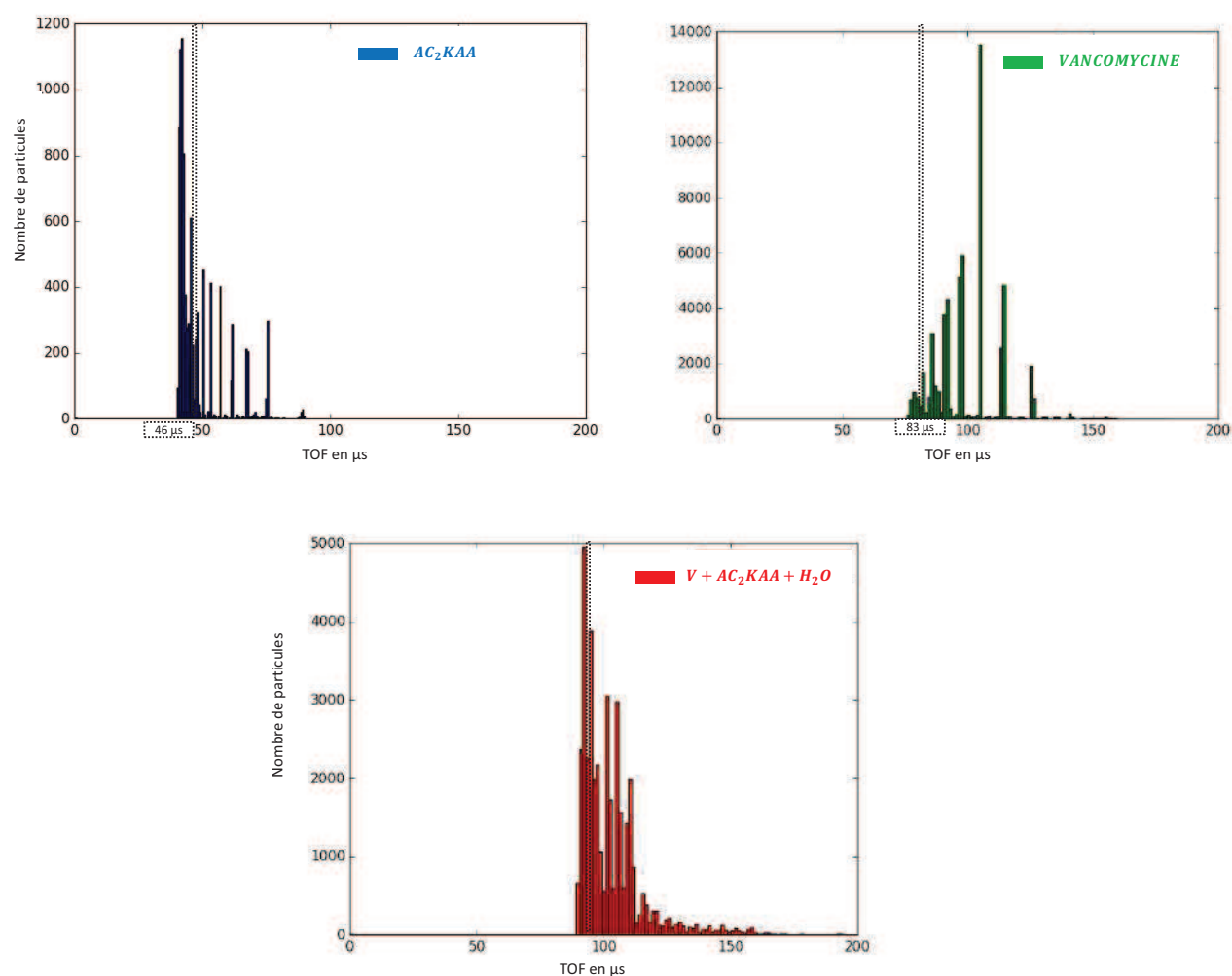


FIGURE 3.31 – Histogramme pour les molécules de AC_2KAA , vancomycine et $[V + AC_2KAA + 2 H_2O]$. En pointillé, j’ai représenté le pic expérimental de chaque molécule pour un délai d’extraction de 8 μs .

L’ajout de la cellule de collision n’a pas pour effet de réduire la largeur temporelle pour chaque molécule. Notamment, pour les molécules de AC_2KAA , les temps de vol s’étendent de 40 μs jusqu’à 90 μs . Or, le pic de AC_2KAA a une largeur expérimentale à mi-hauteur qui ne dépasse pas les 1 μs sur le spectre de la figure 3.24. Si on a l’énergie des ions lorsqu’ils arrivent au niveau du détecteur : ceux arrivant au bout de 90 μs ont une énergie de 460 eV, alors que ceux arrivant au bout de 46 μs (plus rapide) ont une énergie de 2000 eV (voir figure 3.32). Donc, ceux ayant la plus grande énergie sont ceux qui sont restés le plus longtemps dans la zone d’extraction retardée lorsque celle-ci est mise sous tension. Et c’est le raisonnement inverse pour les moins énergétiques.

Pour les histogrammes concernant la vancomycine et le complexe, c’est la même chose. L’énergie cinétique à 83 μs pour la vancomycine (c’est le temps expérimental) est de 1970 eV au niveau du détecteur. Pour le complexe, à 93 μs , l’énergie cinétique est de 1950 eV. On constate que pour les trois temps de vols expérimentaux, les énergies

cinétiques au niveau du détecteur sont assez proches les unes des autres. En effet, pour le AC₂KAA à 46 μ s son énergie est de 2000 eV, pour la vancomycine à 83 μ s on a 1970 eV et pour le complexe à 93 μ s, l'énergie est de 1950 eV.

Ceci nous incite à conclure que notre détecteur réalise un filtre en énergie puisqu'expérimentalement nous n'observons pas de pics avec des énergies en-deçà de 1950 eV. En effet, les détecteurs MCP ont des efficacités de détection qui dépendent de l'énergie cinétique des ions et également de leur masse. Plus l'énergie cinétique pour une masse donnée est grande, plus l'efficacité est élevée. Et pour une énergie cinétique donnée, plus la masse est faible plus l'efficacité est grande.

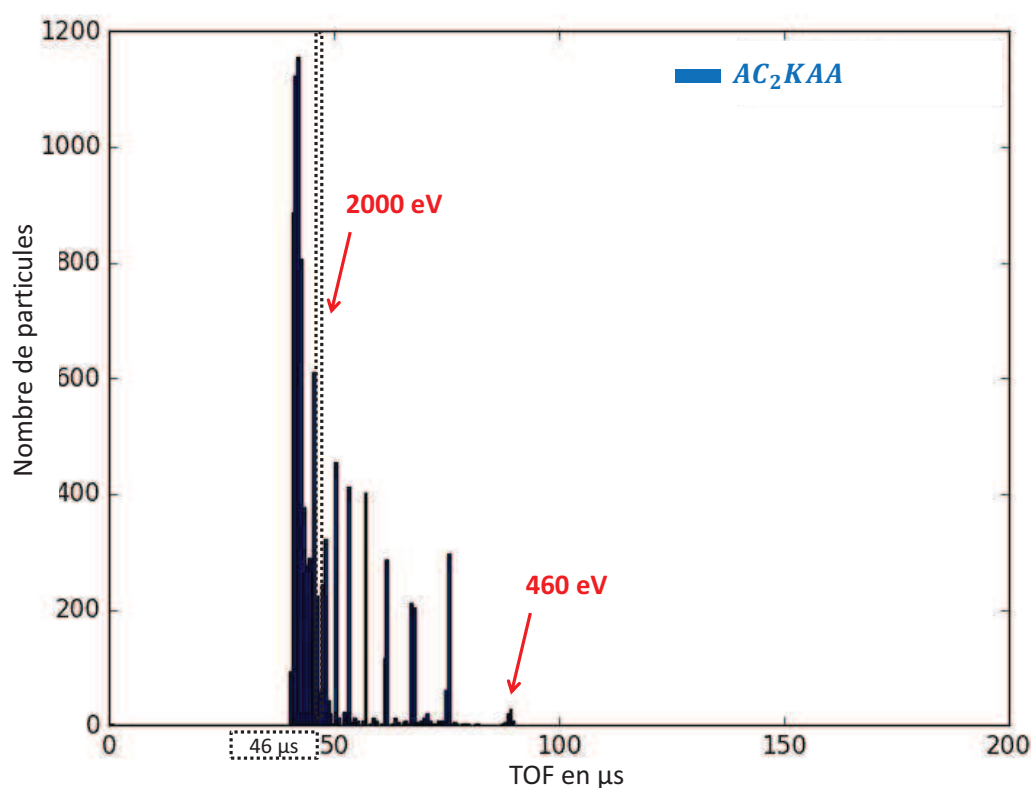


FIGURE 3.32 – Histogramme pour les molécules de AC₂KAA. Les valeurs en rouge représentent les énergies cinétiques juste avant qu'elles tapent le détecteur pour les temps de vol de 46 μ s et 90 μ s.

Sur la figure 3.33 a) et b), je montre la trajectoire d'un ion AC₂KAA⁻ rapide (proche de 42 μ s) et d'un ion lent (proche de 92 μ s), respectivement. L'ion rapide se trouve, au bout de 8 μ s (lorsque l'extraction retardée est mise sous tension) au début de la deuxième plaque d'extraction retardée. Puisqu'elle est portée à 2200 V et que la plaque qui suit est à la masse, l'ion ressent une différence de potentiel de 2200 V. L'ion qui est alors à l'entrée de la deuxième plaque d'extraction au moment où celle-ci s'allume bénéficie de la meilleure position pour ressentir la différence de potentiel de 2200 V le plus longtemps possible.

Pour l'ion lent, il se trouve au bout de 8 μs déjà très proche de la grille à la masse (voir figure 3.33 b)). Donc, il bénéficie moins longtemps de la différence de potentiel de 2200 V que l'ion rapide. Son énergie cinétique sera alors moins importante que l'ion rapide et son temps de vol sera plus important.

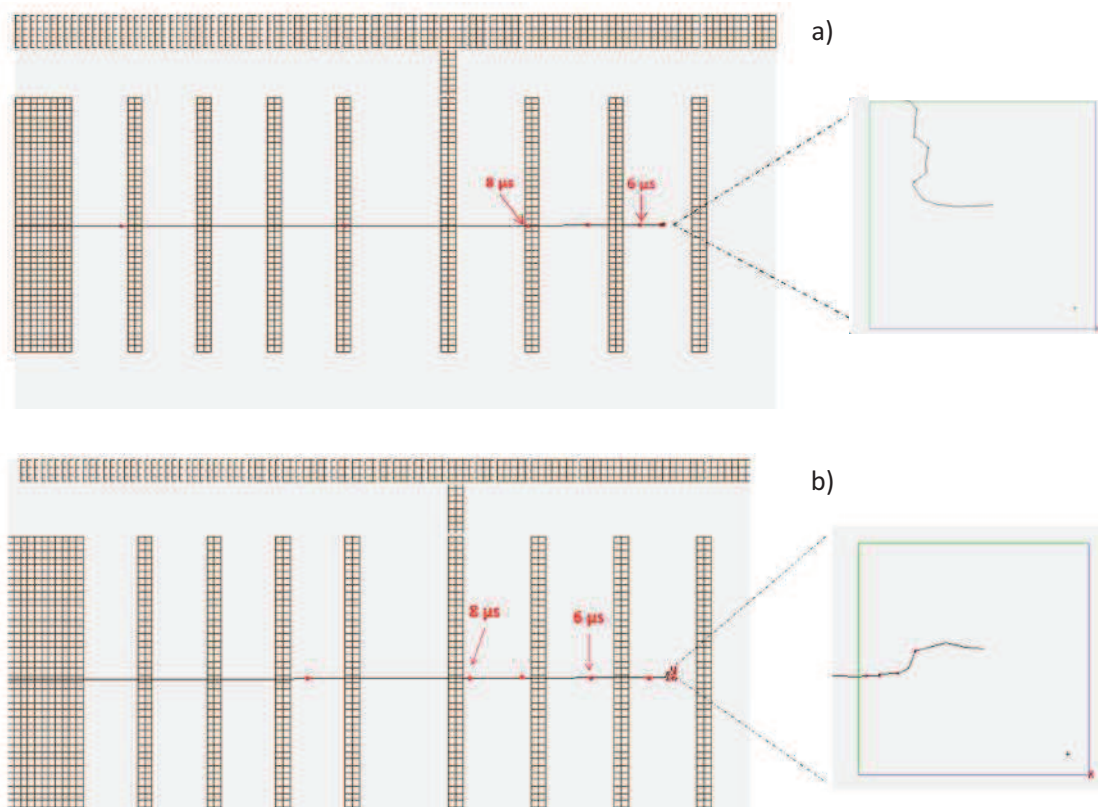


FIGURE 3.33 – a) Trajectoire d'un ion AC_2KAA^- qui met 43 μs pour atteindre le détecteur. Son énergie finale est 2300 eV. A droite, c'est un zoom dans la cellule de collision. b) Trajectoire d'un ion qui met 92 μs pour atteindre le détecteur. Son énergie finale est 460 eV. A droite, c'est un zoom dans la cellule de collision

J'ai donc ajouté un filtre sur la détection à partir de 1950 eV. Donc, toutes les particules avec une énergie cinétique inférieure à 1950 eV au niveau du détecteur ne sont pas comptabilisées.

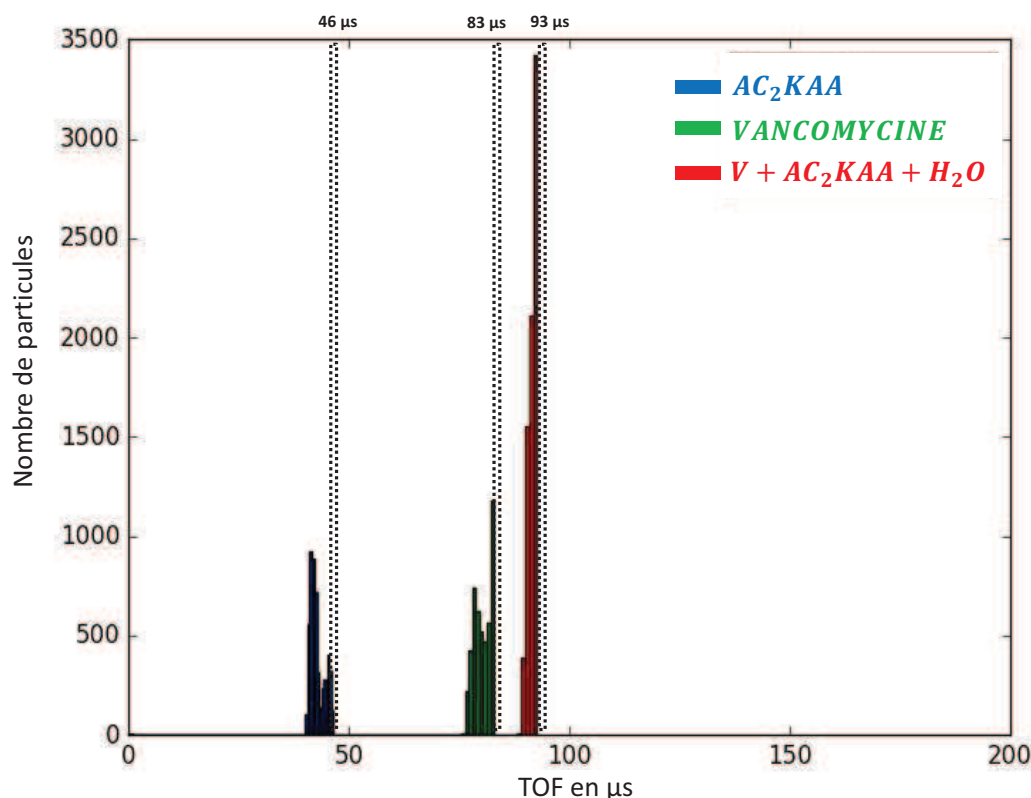


FIGURE 3.34 – Histogramme (avec gaz et filtre sur la détection) pour les molécules : AC_2KAA , Vancomycine et $[V + AC_2KAA + 2 H_2O]$.

Avec ce filtre sur la détection (figure 3.34), on se rapproche du spectre expérimental de la figure 3.24. Cependant, la largeur des pics simulés est plus grande que celles des pics expérimentaux. Notamment, pour le pic expérimental concernant la molécule de vancomycine, la largeur à mi-hauteur est de 1 μs alors que sur le spectre simulé la largeur est de 4 μs . La simulation a été faite en prenant des particules chargées avec des énergies cinétiques initiales qui varient de 0 à 100 eV et allant dans toutes les directions de l'espace. On pourrait penser alors que pour réduire la largeur des pics simulés, il suffirait de diminuer la largeur de la distribution d'énergie cinétique initiale, et de restreindre également la distribution des directions initiales. Sur la figure 3.35, j'ai donc simulé des particules chargées avec une seule énergie initial (1 eV) et 1 seule direction initiale (particules allant vers le détecteur). Cette simulation a été faite uniquement pour la vancomycine car elle aurait le même effet sur les autres molécules.

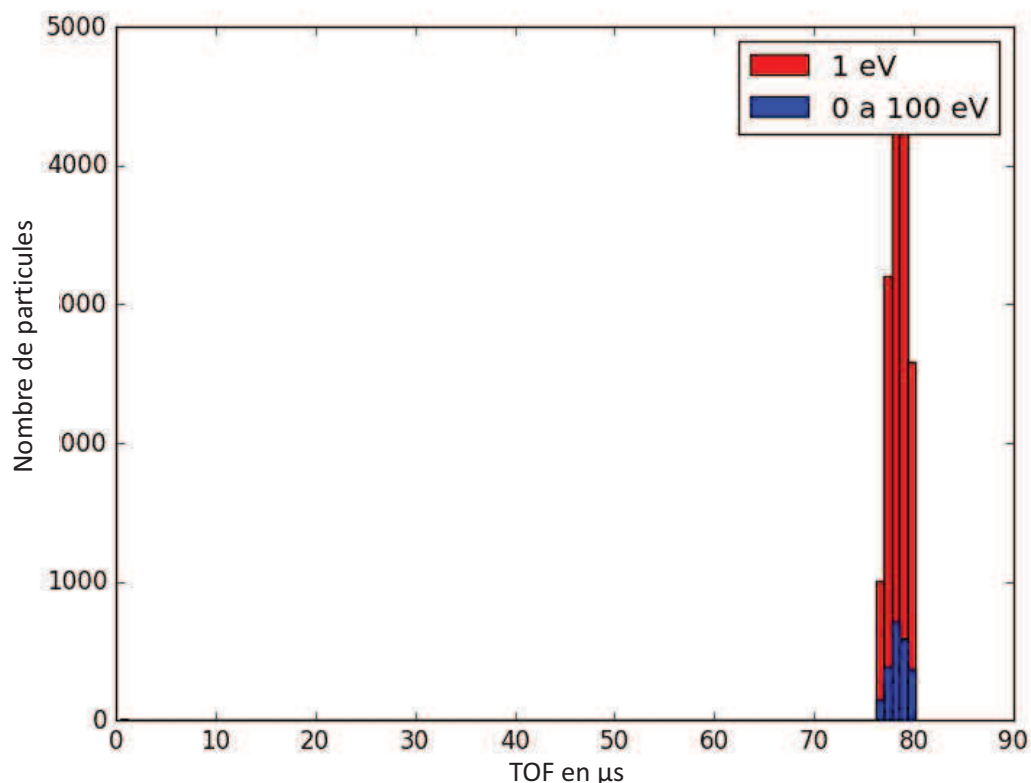


FIGURE 3.35 – **Histogramme pour la vancomycine.** En rouge, les particules ont une énergie cinétique initiale de 1 eV et elles partent dans l’axe du détecteur. En bleu, les particules ont une distribution de vitesse qui varie de 0 à 100 eV et elles partent dans toutes les directions de l’espace.

On constate que la largeur du pic est exactement la même que celle obtenue avec des particules dont l’énergie initiale varie de 0 à 100 eV et allant dans toutes les directions de l’espace. En effet, pour des ions qui ont la même énergie et la même direction initiale, le nombre de collisions dans la cellule n’est pas le même pour chacun car le nombre de collisions est aléatoire. Ceci conduit à des temps de vol qui sont très différents. Nous sommes donc incapable avec ces simulations de remonter aux conditions initiales des ions, telles que l’énergie cinétique et la direction des ions.

J’ai également fait varier le libre parcours moyen dans la cellule de collision et cela n’influe pas sur la largeur des pics simulés. Néanmoins, il y a un moyen de diminuer la largeur des pics indépendamment de leur énergie ou de leur direction. Il s’agit de la durée du pulse d’extraction. En effet, dans nos expériences, la durée du pulse est de 1 µs. Or, lorsque les tensions sont envoyées, elles n’atteignent pas immédiatement la tension qu’on souhaite appliquer. Il faut prendre en compte le front montant et descendant du pulse. J’ai donc effectué la même simulation qui a permis d’obtenir le spectre de la figure 3.35 mais avec une durée du pulse d’extraction de 0.9 µs.

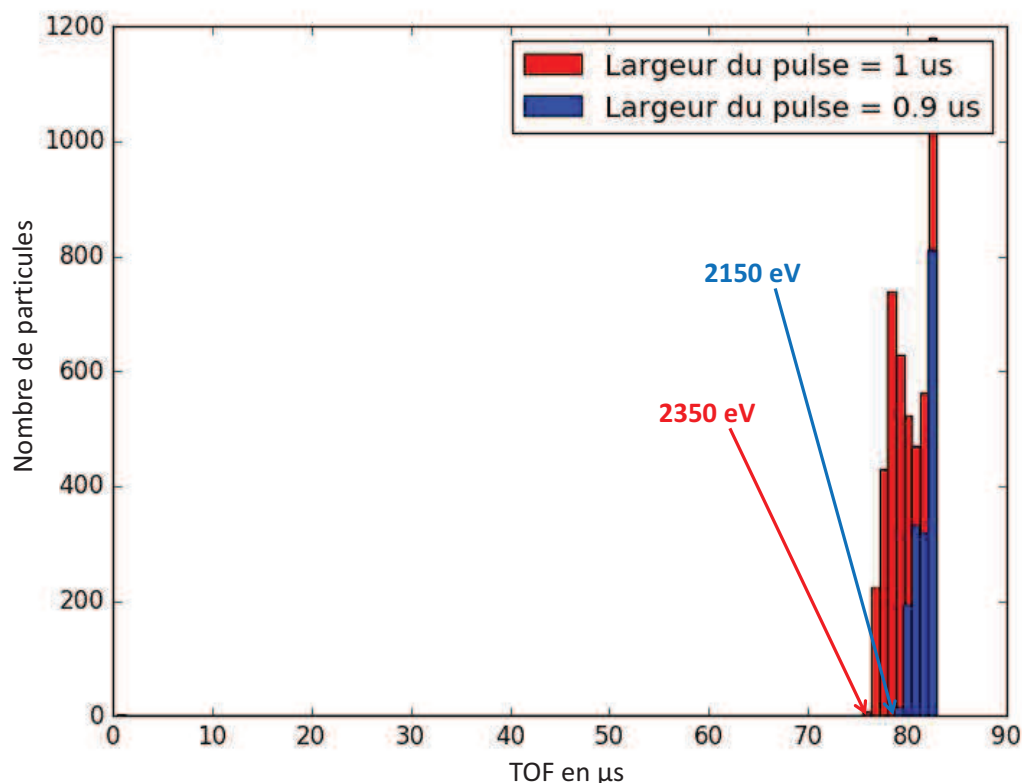


FIGURE 3.36 – **Histogramme pour la vancomycine. En rouge, la largeur du pulse est 1 μ s et en bleu, la largeur du pulse est 0.9 μ s**

On constate que lorsqu'on diminue la durée du pulse, on diminue la largeur des pics simulés. En effet, pour une durée du pulse de 1 μ s les ions les plus rapides ont une énergie cinétique au niveau du détecteur de 2350 eV. Donc, ces derniers sont ceux qui ont profité de l'extraction retardée pendant 1 μ s. Si on diminue la durée du pulse à 0.9 μ s, on filtre les plus rapides à 2350 eV. Pour cette durée du pulse, ceux qui passent 0.9 μ s dans l'extraction retardée, ont une énergie maximale de 2150 eV.

La même comparaison a été faite pour le complexe. A 0.9 μ s, il n'y a pas de particules chargées qui arrivent sur le détecteur avec une énergie cinétique supérieure à 1950 eV. Cette valeur est l'énergie seuil du détecteur que j'ai estimée plus haut. Puisque le pic du complexe est présent expérimentalement mais absent pour la simulation, alors diminuer la largeur du pulse d'extraction pour diminuer la largeur des pics ne peut pas être le chemin à suivre.

En conclusion, on ne peut pas avec ces simulations remonter à l'énergie cinétique des ions ou à leur direction initiale, puisque quelle que soit leur valeurs, la largeur des pics reste la même. De plus, on a montré que l'extraction retardée ne nous permet pas d'améliorer la résolution en masse. En effet, si le détecteur n'a pas de seuil en énergie, les temps de vol, pour une masse donnée et une énergie donnée, sont très larges. De plus, indépendamment des simulations, on peut ajouter que la résolution en masse de nos

spectres de masse (présentée dans la section 3.2.4), qui reste suffisante pour déterminer la masse d'un soluté donné, est loin de suffire pour étudier des processus de fragmentation induits par irradiation. Donc, pour toutes ces raisons, nous avons décidé de remplacer la zone d'extraction retardée par un piège de Paul, dans le but d'améliorer la résolution en masse et également la transmission.

Dans la suite, je présente le piège de Paul de manière générale, les résultats expérimentaux obtenus avec ce piège et enfin, je termine par des simulations.

3.3 Piège de Paul

Nous avons choisi de remplacer par un piège de Paul l'extraction retardée puisque celle-ci ne permettait pas d'obtenir une résolution en masse suffisante pour nos études. Le piège de Paul permet de redéfinir un point source au centre du piège après y avoir transféré les molécules en phase gazeuse. Le fait de redéfinir un point source permet de réduire fortement la large distribution de vitesse inhérente au processus de mise en phase gazeuse. Ainsi on améliore considérablement la résolution en masse. De plus, le piège devrait nous permettre de gagner en intensité de signal. En effet, avec une optique de guidage adéquate en amont du piège, on pourrait stocker un nombre d'ions plus important qu'avec l'extraction retardée. Dans la suite, je décris le fonctionnement d'un tel piège et je présente un exemple de spectre de masse obtenu grâce à ce piège.

3.3.1 Généralités sur le fonctionnement du piège

Les pièges de Paul sont tri-dimensionnel contrairement aux piège dit linéaires qui sont 2D. Ils ont été développés par W.Paul dans les années 1950 [80] et ont une géométrie particulière. En effet, un piège de Paul est composé de trois électrodes : deux électrodes "chapeau" (end cap electrodes) et une électrode annulaire (ring electrode) (figure 3.37). Les électrodes "chapeau" sont percées au centre afin de laisser entrer les ions d'un côté et sortir de l'autre. La distance entre le centre du piège et l'électrode annulaire est notée R_0 et la distance entre le centre du piège et les électrodes chapeau est Z_0 . Ces 2 valeurs sont reliées par la relation suivante :

$$Z_0 = \frac{R_0}{\sqrt{2}} \quad (\text{Equation 3.4})$$

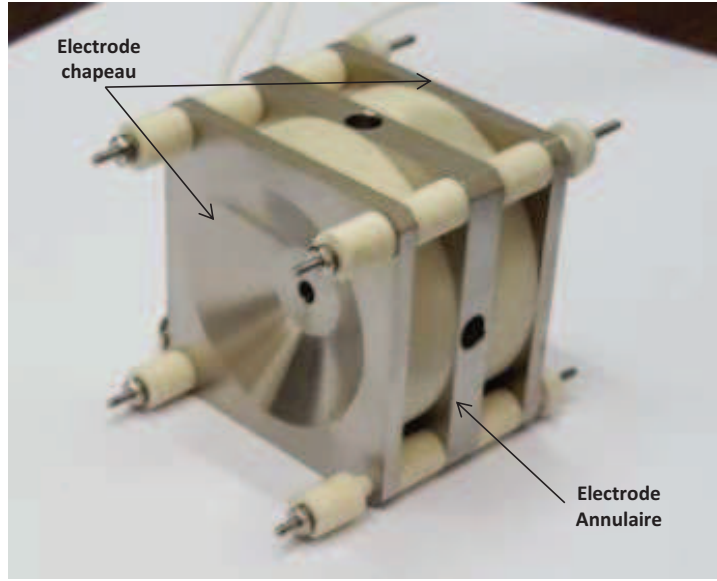


FIGURE 3.37 – Photographie de notre piège de Paul.

Pour piéger des particules chargées au centre du piège, il faut qu'une force de rappel électromagnétique dont l'intensité croît linéairement avec la distance les ramènent au centre du piège. On peut réaliser ceci avec un potentiel quadratique à trois dimensions qui a l'expression suivante :

$$\phi(x, y, z) = A(ax^2 + by^2 + cz^2) \quad (\text{Equation 3.5})$$

En l'absence de charges, le potentiel doit satisfaire l'équation de Laplace :

$$\nabla^2 \phi(x, y, z) = 0 \Rightarrow a + b + c = 0 \quad (\text{Equation 3.6})$$

On peut résoudre l'équation précédente de deux manières : soit $a = -b$ et $c = 0$, ce qui conduit à un potentiel 2D tel que :

$$\phi_{2D}(x, y) = A(x^2 - y^2) \quad (\text{Equation 3.7})$$

ou bien, $a = b = 1$ et $c = -2$, ce qui mène à un potentiel trois 3D tel que :

$$\phi_{3D}(x, y, z) = A(x^2 + y^2 - 2z^2) \quad (\text{Equation 3.8})$$

On remarque que quelque soit la forme du potentiel, aucun d'entre eux ne permet de piéger dans les trois directions. Notamment, pour le potentiel 3D, il existe une direction de fuite suivant l'axe z . Cependant, on peut piéger suivant l'axe z en changeant la polarité à une

fréquence bien choisie. Par contre, si on piège suivant l'axe z , on ne piège plus dans le plan x, y . Il faut donc changer la polarité du potentiel à la bonne fréquence pour que lorsqu'on ne piège plus suivant une direction on change suffisamment rapidement le potentiel pour ramener l'ion au centre du piège. De manière alternative l'axe de piégeage devient l'axe de fuite et inversement : on parle alors de pseudo puits de potentiel. Ainsi, des ions peuvent être piégés au centre du piège. L'analogie mécanique serait de piéger une boule au creux d'une selle de cheval qu'on ferait tourner à une certaine fréquence.

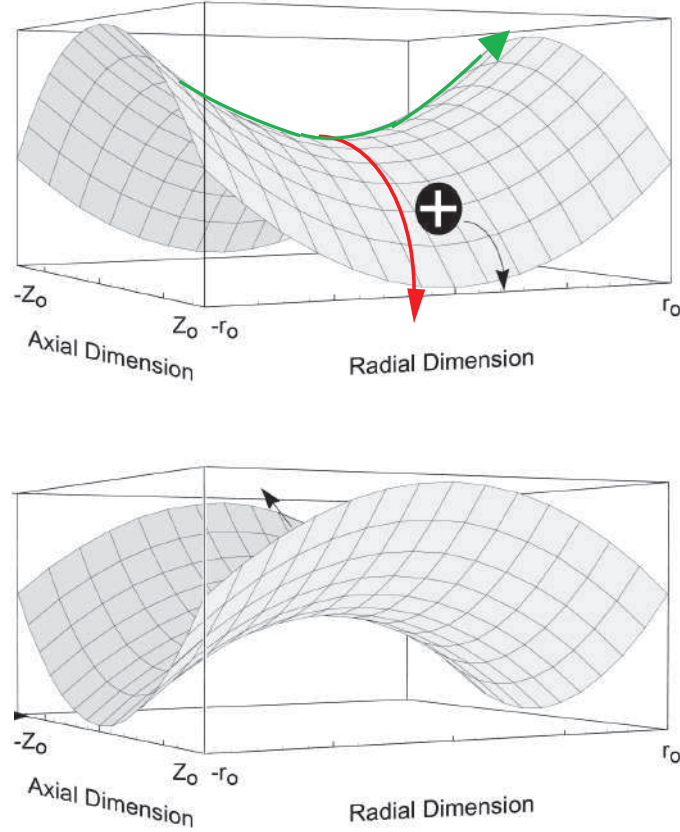


FIGURE 3.38 – La flèche verte indique l'axe de piégeage et la flèche rouge l'axe de fuite. Lorsqu'on change de signe le potentiel l'axe de piégeage devient l'axe de fuite.

Dans la figure 3.38, $r = \sqrt{x^2 + y^2}$ et représente la direction radiale. Si on applique à l'électrode annulaire une différence de potentiel tel que $A = U + V \cos w_{rf} t$ avec U une tension continue et V une tension sinusoïdale de pulsation w_{rf} alors le potentiel 3D devient :

$$\phi_{3D} = \frac{U + V \cos w_{rf} t}{2r_o^2} (r^2 - 2z^2) \quad (\text{Equation 3.9})$$

En appliquant la relation fondamentale de la dynamique on obtient les équations du mouvement suivantes :

$$\frac{d^2u}{dt^2} = \frac{-e}{m} \frac{d\phi}{du} \quad (\text{Equation 3.10})$$

Avec $u = x, y, z$ et e la charge de l'ion. On peut écrire autrement ces équations sous la forme suivante dite des équations de Mathieu [81] :

$$\frac{d^2u}{d\tau^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\tau)u \quad (\text{Equation 3.11})$$

avec :

$$\tau = \frac{w_{rf}t}{2} \quad (\text{Equation 3.12})$$

et

$$a_{x,y} = -\frac{a_z}{2} = \frac{4eU}{mr_0^2 w_{rf}^2} \quad (\text{Equation 3.13})$$

$$q_{x,y} = +\frac{q_z}{2} = \frac{2eV}{mr_0^2 w_{rf}^2} \quad (\text{Equation 3.14})$$

a et q sont sans dimensions. Grâce à ces paramètres, des diagrammes de stabilité radiale et axiale sont définis afin de savoir si un ion est piégé ou non. Notamment, un ion est piégé si sa trajectoire est stable à la fois dans le plan radial (r) et dans le plan axial (z). Autrement dit, il faut des valeurs a_u et q_u pour lesquelles les trajectoires des ions soient inférieurs à r_0 et z_0 . Les diagrammes de stabilité radiale et axiale n'ont pas la même forme mais ils ont des zones communes, c'est-à-dire des zones qui se recouvrent, comme on peut le voir dans la figure 3.39.

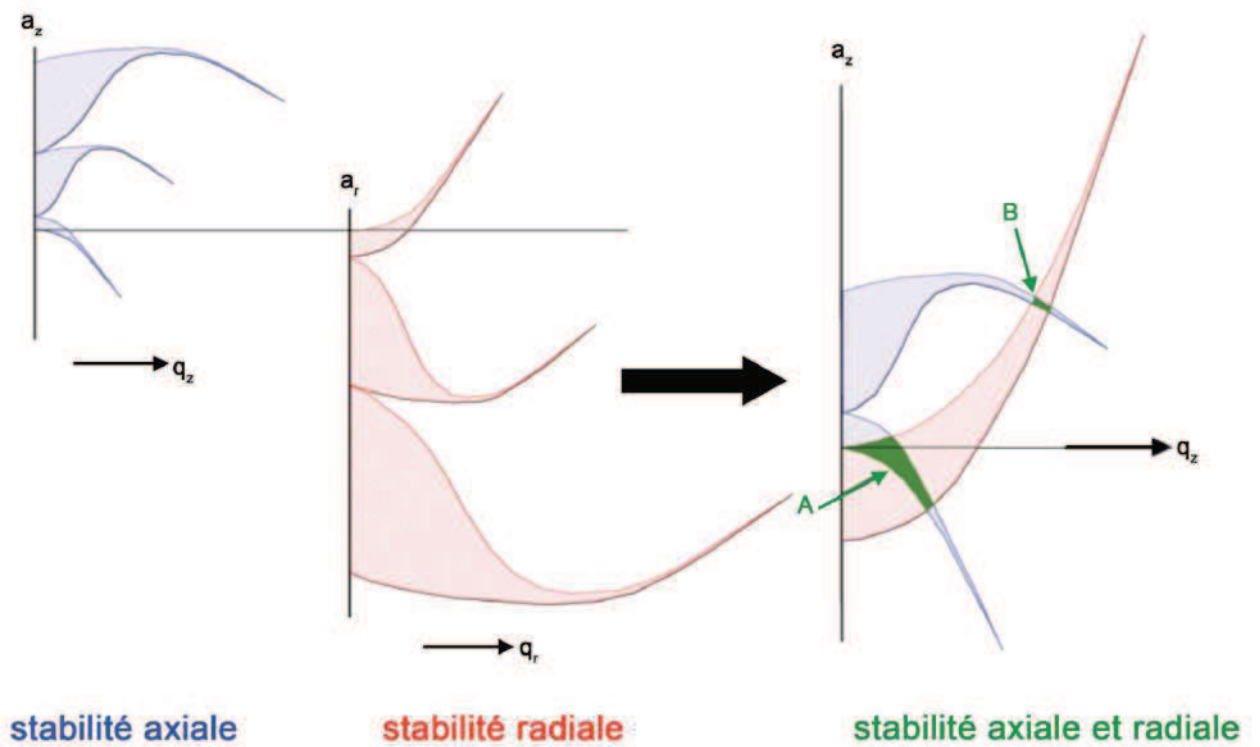


FIGURE 3.39 – Diagrammes de stabilité radiale et axiale. En les superposant on retrouve des zones communes telles que A et B [82]

Les ions piégés ont une trajectoire en forme de huit (courbe de Lissajous) comme on peut le voir sur la figure 3.40. On peut piéger un grand nombre d'ions, cependant plus le nombre d'ions augmente plus les ions se repoussent et donc le rayon de leur trajectoire augmente. Pour ramener les ions au centre du piège de l'hélium est envoyé. Ce gaz permet donc d'améliorer l'efficacité de piégeage et également de diminuer l'énergie cinétique des ions entrant dans le piège. Une fois les ions piégés il faut les éjecter du piège.

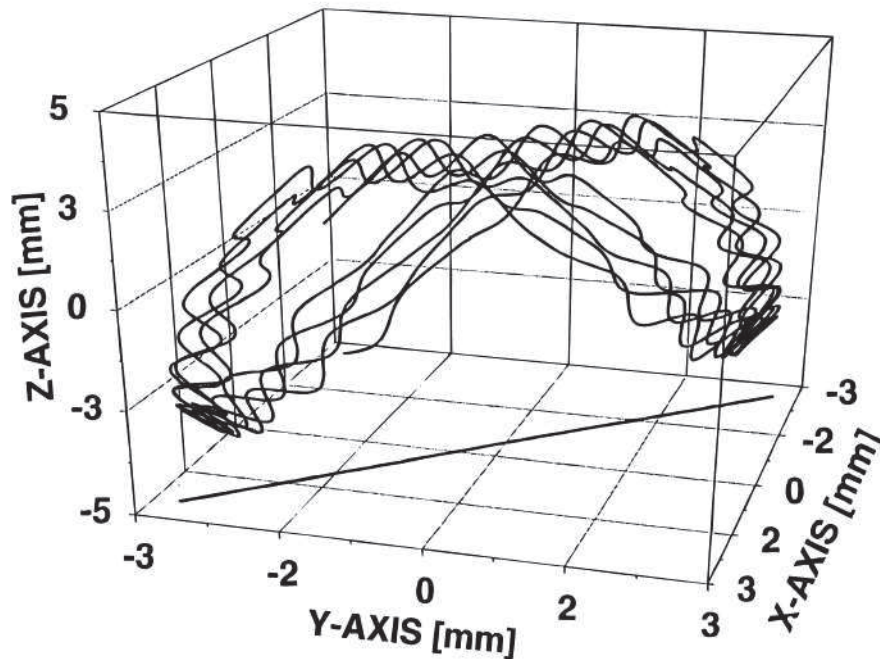


FIGURE 3.40 – Un ion avec un m/z de 105 est piégé et effectue une trajectoire en forme de huit [82].

Pour éjecter les ions piégés trois méthodes existent. La première consiste à augmenter l'amplitude de la radiofréquence. Pour maximiser la gamme de masse, on garde U nul. On se trouve alors sur l'axe horizontale du diagramme de stabilité. Tous les ions qui ont un q_z inférieur à 0.908 sont piégés. En réalisant un balayage croissant de V , on éjecte les ions piégés selon les m/z croissants. En effet, puisque m/z est proportionnel à V/q_z , on constate que plus m/z est grand plus q_z est faible pour une valeur donnée de V . Comme analogie, on peut imaginer un verre d'alcool dont la densité du liquide croît. Donc, plus l'alcool est dense plus il se trouve au fond du verre. Alors, pour vider le verre, on peut incliner ce dernier. Si on incline peu le verre, seulement la partie la moins dense quittera le verre, c'est-à-dire celle qui se trouve à la surface du verre. Plus on incline le verre plus on vide les parties de plus en plus dense. L'inclinaison du verre correspond à la tension V qu'on augmente au fur et à mesure afin d'éjecter les ions selon les m/z croissants (voir figure 3.41).

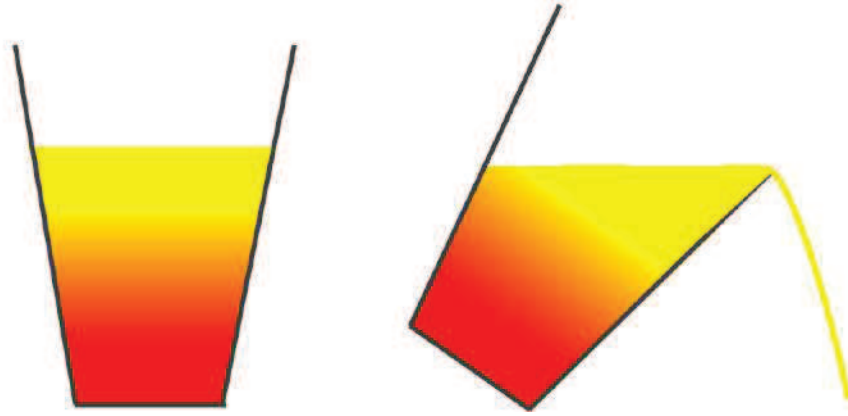


FIGURE 3.41 – La densité du liquide augmente du jaune vers le rouge. L'inclinaison du verre permet d'évacuer tout d'abord la partie du liquide la moins dense à l'instar de la tension V qui éjecte en premier les ions de m/z les plus faibles.

Prenons l'exemple de trois ions avec des m/z de 500, 1000 et 1500. On voit sur la figure 3.42 que lorsque la tension V appliqué sur l'électrode annulaire est de 1000 V, tous les ions sont piégés. Il en est de même avec $V = 3000$ V. C'est seulement à partir de 6000 V, que l'ion avec le m/z le plus petit, donc 500, est expulsé.

A chaque tension on peut savoir quel serait le m/z le plus petit piégé en calculant la valeur de q_z . Par exemple, pour l'ion avec un m/z de 500 (avec $r_0 = 1$ cm, $w_{rf} = 1.05$ MHz et $V = 1000$ V), la valeur de q_z est de 0.162. Grâce à cette valeur, on peut calculer quelle serait la plus petite masse piégée (low-mass cut-off ou LMCO), en appliquant la règle de trois suivante :

$$\text{LMCO} \times 0.908 = m/z \text{ 500} \times 0.162 \quad (\text{Equation 3.15})$$

Donc la plus petite masse piégée est de 89 m/z . tous les ions avec des masses supérieures seront piégés (avec évidemment une masse supérieure limite qu'on peut également calculé) et tous les ions avec une masse inférieure ne le seront pas.

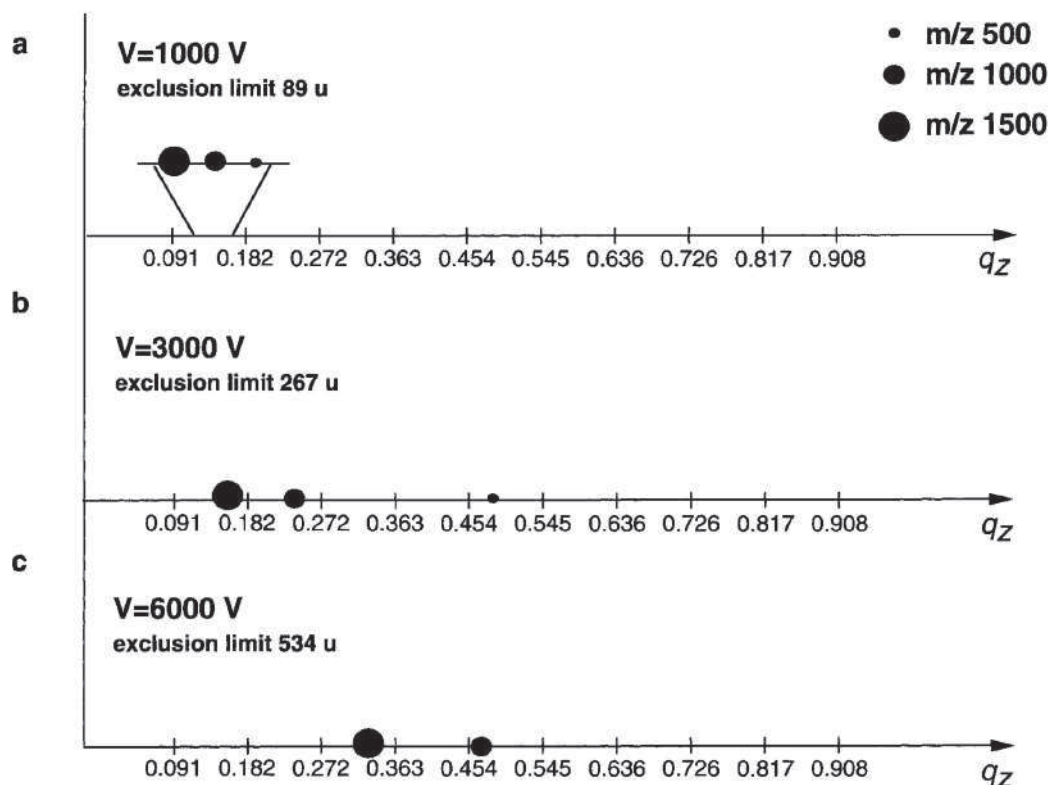


FIGURE 3.42 – A 1000 V et 3000 V les trois ions sont piégés. Au-dessus de 6000 V, l'ion avec le m/z le plus petit est éjecté [83].

La deuxième méthode consiste à appliquer une tension alternative sur les électrodes chapeaux. On déstabilise les ions suivant l'axe z . Un balayage croissant de la fréquence permet d'éjecter les ions selon les m/z croissants.

La troisième méthode consiste à couper la tension V appliquée sur l'électrode annulaire, puis de diminuer la tension de l'électrode chapeau de sortie afin de créer une différence de potentiel entre l'électrode chapeau d'entrée et de sortie. Ainsi, les ions sont tous éjectés du piège en même temps quelque que soit leur rapport m/z . C'est cette méthode que nous avons utilisé pour obtenir le spectre de la figure 3.45.

3.3.2 Mesure de la nouvelle résolution en masse

Nous avons installé le piège de Paul (acheté chez JORDAN TOF INSTRUMENTS) à la place de l'extraction retardée. Donc, la plaque continue et l'Einzel 1 sont toujours présentes (voir figure 3.43). Les gouttes désorbent entre la plaque continue et l'End cap d'entrée du piège. La distance entre ces deux éléments est de 5 mm. Concernant l'alimentation du piège, l'électrode annulaire est connectée à une alimentation haute tension radiofréquence, fournie avec le piège, capable de monter jusqu'à 5000 V avec une fréquence de 1.1 MHz.

L'End cap d'entrée et de sortie sont connectées à une seconde alimentation continue via un pulseur. Ce dernier permet d'envoyer un signal de déclenchement sur l'End cap 2 (voir figure 3.44) pour faire chuter la tension de quelques centaines de volt afin d'extraire les ions du piège. Dans la figure 3.44, je présente le schéma du câblage du piège.

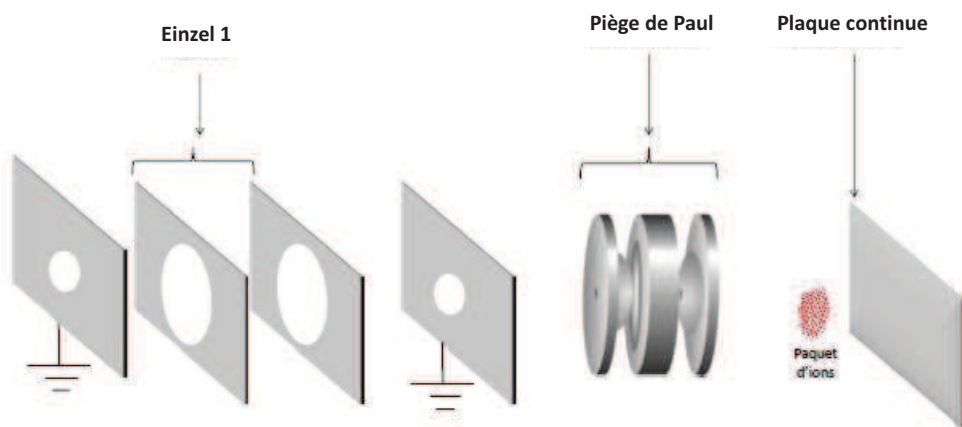


FIGURE 3.43 – Schéma de la nouvelle extraction. L'extraction retardée est remplacée par un piège de Paul.

Une tension provenant d'une alimentation continue passe par l'alimentation générale du piège (BIAS IN). Cette tension est envoyée sur l'End cap 1 via la sortie BIAS OUT. Pour l'électrode annulaire (ring electrode), c'est l'alimentation du piège qui produit une tension RF avec une valeur maximale de 5000 V. Concernant l'End cap 2, on envoie la même tension que pour l'End cap 1 (PULSE BIAS), avec en plus un signal de déclenchement qui permet de faire chuter la tension jusqu'à 400 V. Par exemple, si on envoie 1600 V initialement, la tension sur l'End cap 2 chute à 1200 V pendant une certaine durée qu'il est possible de faire varier entre 200 ns et quelques μ s. Au moment où le signal de déclenchement est envoyé, la tension sur l'électrode annulaire s'annule pendant la durée du signal. Ainsi, les ions ne sont plus piégés par la RF et sont accélérés par une différence de potentiel qu'on peut régler jusqu'à 400 V.

De cette manière, nous avons réussi à piéger des molécules de bradykinine (1060 u.m.a) pendant quelques centaines de μ s (figure 3.45). Tout d'abord, on appliquait sur les End cap une tension de 2015 V. Ensuite pour faire entrer les ions dans le piège, il était nécessaire d'appliquer sur la plaque continue une tension légèrement supérieur à celle de l'End cap 1. En effet, une tension de 2019 V devait être appliquer sur la plaque continue, donc seulement 4 V de plus par rapport à l'End cap 1. Si on appliquait une différence plus grande que 4 V, il était impossible de piéger car les ions arrivaient trop vite pour être piégés. Sur l'électrode annulaire, une tension radiofréquence de 2500 V était produite afin de piéger les ions. Ensuite, le signal de déclenchement était envoyé sur l'End cap 2 au bout de 7.5 μ s pendant 4 μ s avec une amplitude de 400 V. Donc, l'End cap 2 passait de 2015 V à 1615 V pendant 4 μ s après que la RF a chuté à 0 V. De plus, pour piéger efficacement, de l'hélium était envoyé dans le piège sous forme de pulse à une fréquence de 20 Hz (fréquence du laser de désorption). L'ouverture de la vanne pulsée

est déclenchée avant l'arrivée des ions dans le piège pour s'assurer de la présence de gaz tampon au moment du piégeage. La durée d'ouverture de la vanne pulsée pour le spectre de la figure 3.46 était de $190\ \mu\text{s}$. Ainsi, la pression dans la chambre sous vide passait de 6.10^{-6} à 8.10^{-6} mbar.

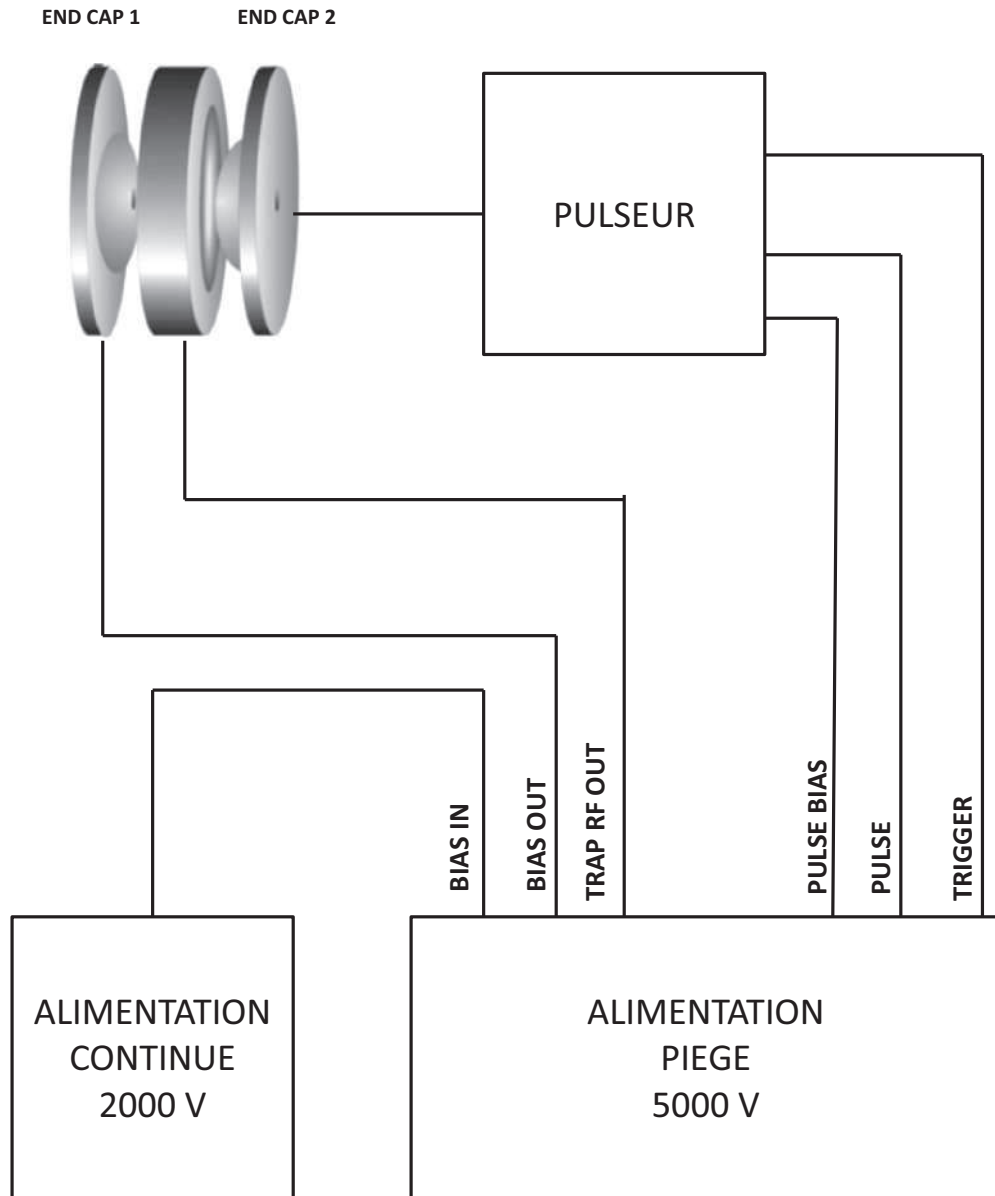


FIGURE 3.44 – Schéma de câblage du piège de Paul.

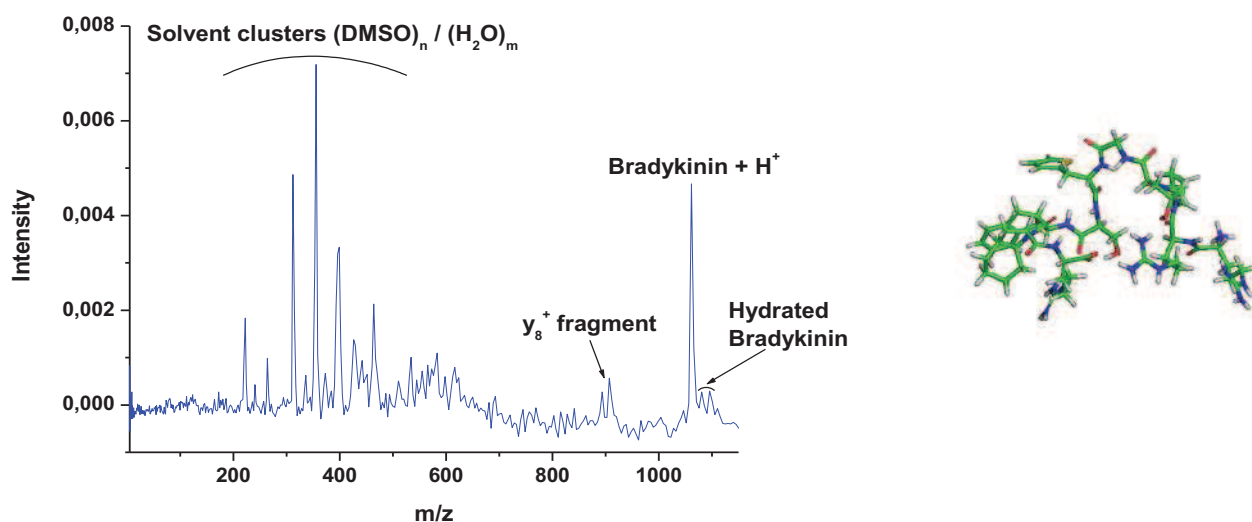


FIGURE 3.45 – Spectre de masse de la bradykinine obtenu avec le piège de Paul.

Sur ce spectre de la figure 3.45, on observe vers les faibles masses, des agrégats d'eau et de DMSO. Le pic de bradykinine chargée une fois apparaît très clairement avec une résolution en masse de 500. Si on compare au spectre de bradykinine obtenu avec l'extraction retardée (voir figure 3.17), on gagne un facteur 5 sur la résolution en masse avec le piège. La résolution en masse devrait être encore améliorée puisque les paramètres du piège tels que les tensions appliquées, la durée de piégeage et la pression ne sont pas complètement optimisés pour le spectre de la figure 3.45.

3.3.3 Vérification du fonctionnement du piège par simulation SIMION

Pour interpréter les expériences effectuées avec le piège, j'ai réalisé des simulations avec le logiciel SIMION. D'une part, j'ai caractérisé la transmission des ions qui entrent dans le piège en fonction des potentiels appliqués sur la plaque continue et les électrodes du piège. D'autre part, j'ai mesuré les temps de vol à partir du centre du piège afin de pouvoir confirmer l'attribution du pic de bradykinine du spectre de la figure 3.45 et de trouver quelle serait la masse de l'espèce liée au fragment (y_8^+) qui se trouve juste avant le pic de bradykinine. Le Y du fragment signifie qu'il porte l'extrémité C-terminale et le chiffre 8 traduit que notre fragment comporte 8 acides aminés parmi les 9 de la molécule de bradykinine. Notre fragment correspond à la perte de l'arginine (174 g/mol). Sur la figure 3.46, j'ai représenté la séquence d'acide aminé de la bradykinine ainsi que la séquence du fragment y_8^+ .

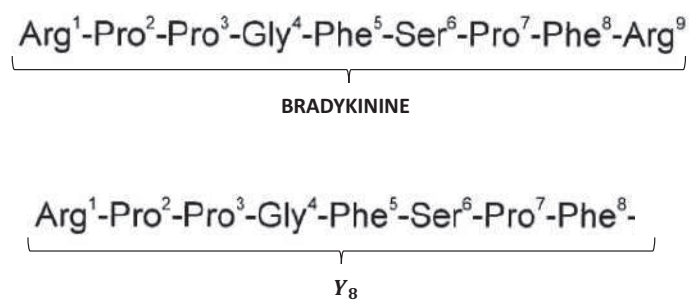


FIGURE 3.46 – En haut : Séquence d'acides aminés de la bradykinine. En bas : séquence d'acides aminés du fragment y_8^+ .

La figure 3.47 représente la géométrie du TOF de notre dispositif sous SIMION. Il y a une plaque de potentiel continu, le piège de Paul, une plaque à la masse, deux Einzel et un détecteur. J'ai donc uniquement remplacé l'extraction retardée présente dans la géométrie de la figure 3.12 par un piège de Paul.

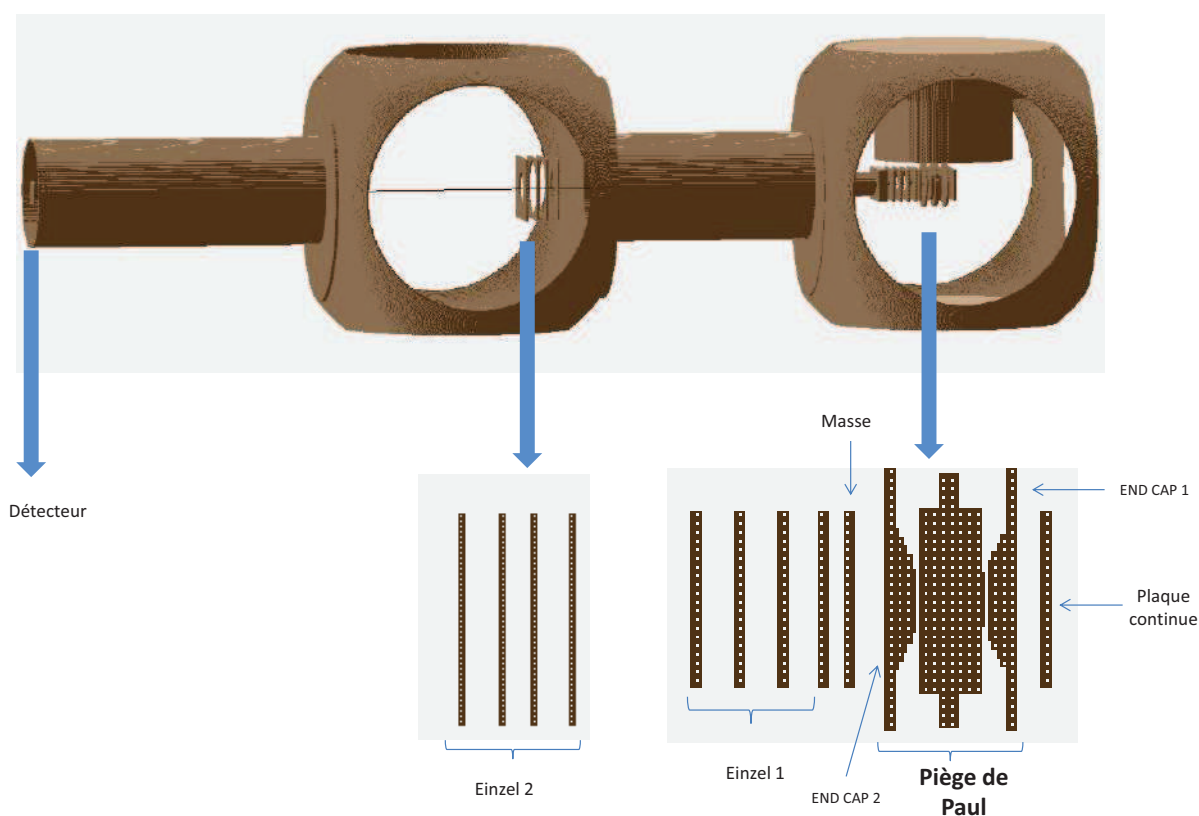


FIGURE 3.47 – Schéma du TOF sous SIMION.

Pour les simulations, j'ai pris des particules qui partent dans toutes les directions de l'espace. La position initiale des ions se situe entre le milieu de la plaque continue et l'End cap 1 (voir figure 3.47) puisque c'est à cet endroit que la désorption se produit. Afin d'être le plus large possible, l'énergie des particules varie entre 0 et 10 eV. On constate que si aucun potentiel n'est appliqué, les particules partent dans toutes les directions de l'espace (voir figure 3.48 a)). Dans ce cas, la transmission des ions dans le piège est très faible, seulement 1 %. En appliquant les mêmes tensions que celles appliquées pour le spectre expérimental de la figure 3.46, c'est-à-dire : sur les 2 END CAP un potentiel de 2015 V et un potentiel oscillant sur l'électrode centrale du piège un potentiel de 2500 V, on constate que les ions sont mieux transmis dans le piège. En effet, la transmission est cette fois-ci de 30 % (voir figure 3.48 b)). Dans ces simulations, je n'ai pas réalisé une "vrai" séquence de piégeage, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de gaz tampon, donc les ions ne sont pas piégés. L'intérêt de ces simulations est d'estimer uniquement quelle serait la transmission des ions dans le piège.

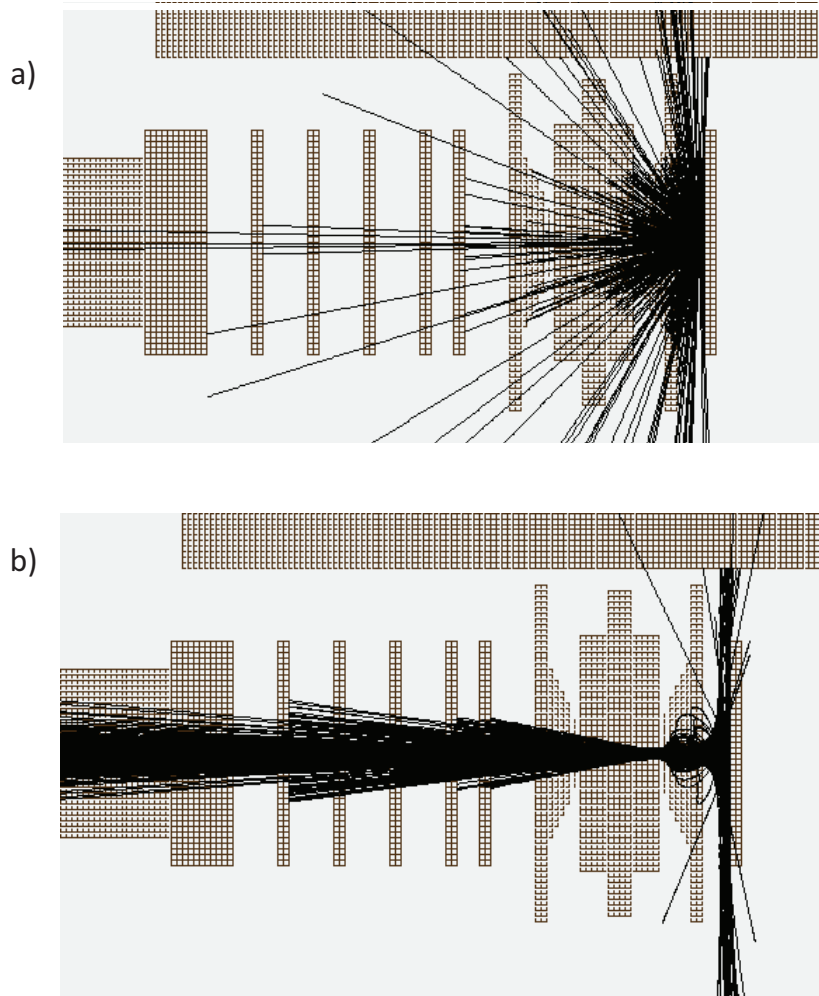


FIGURE 3.48 – a) Aucune tension n'est appliquée. b) Avec tensions appliquées : 2015 V sur les END CAP et 2500 V sur l'électrode centrale.

Cependant, des ions vont dans le sens contraire du piège (comme je l'ai dit au paragraphe précédent, je fais voler des ions dans toutes les directions de l'espace afin de prendre tous les cas possibles). En effet, puisqu'aucune tension n'est appliquée sur la plaque de tension continue des ions vont heurter cette plaque. J'ai donc appliqué une tension sur cette dernière. Avec une tension de 2019 V, qui est la valeur appliquée sur la plaque de tension continue pour l'obtention du spectre de la figure 3.46, on observe que tous les ions pénètrent dans le piège (figure 3.49) avec une transmission de 100 %.

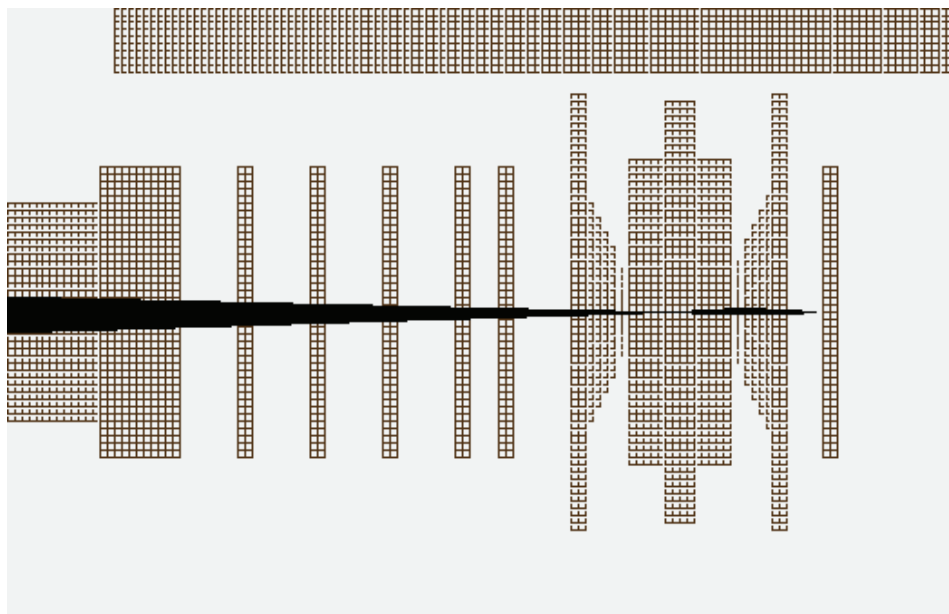


FIGURE 3.49 – Plaque continue : 2019 V, END CAP 1 et 2 : 2015 V, électrode centrale : 2500 V.

Maintenant, puisque la collection des ions dans le piège a été discutée, je vais présenter des simulations sur les temps de vol des molécules, en partant du centre du piège. Je ne m'intéresse pas au processus de piégeage des ions, puisque je pars du principe que les ions qui entrent dans le piège sont tous piégés en majeure partie. Je fais donc partir des ions au centre du piège (point source) avec une énergie cinétique nulle. En effet, c'est tout l'intérêt du piège, qui réduit la dispersion en énergie inhérente au processus de mise en phase gazeuse. Cependant, je simule exactement l'étape d'extraction qui se déroule une fois que les ions sont piégés. Tout d'abord, on coupe le potentiel oscillant de l'électrode centrale, ensuite l'END CAP 2 (figure 3.47) chute de 400 V (elle passe donc de 2015 V à 1615 V) pendant une durée de 4 μ s. Après que les ions ont été extraits du piège, l'END CAP 2 repasse à 2015 V. Le pic de bradykinine met expérimentalement

44 μ s pour atteindre le détecteur. Le TOF théorique de la bradykinine est également de 44 μ s. On peut confirmer l'attribution du pic de bradykinine sur le spectre de la figure 3.45.

J'ai également réalisé un histogramme pour le fragment observé sur le spectre de la figure 3.45. Ce fragment met 40 μ s expérimentalement pour atteindre le détecteur.

Sous SIMION, j'ai trouvé le même TOF pour une molécule avec une masse de 888 g/mol. Cette masse correspond à la perte de l'arginine de la molécule de bradykinine.

3.4 Conclusion

J'ai démontré que l'extraction retardée ne nous permet pas d'atteindre une résolution suffisante pour nos études sur l'endommagement de biomolécules. J'ai donc remplacé cette extraction par un piège de Paul. Grâce à ce dernier, nous avons gagné un facteur 5 sur la résolution en masse. Nous devrions encore améliorer ce facteur puisque les paramètres du piège tels que les tensions appliquées, la durée de piégeage ou encore la durée d'injection du gaz tampon ne sont pas optimisés.

Depuis février 2016, ces expériences de caractérisation ont été arrêtées pour développer le nouveau dispositif. Aujourd'hui, la nouvelle version est en cours de développement. Notamment, l'équipe est en train de développer le système de visualisation in-situ (testé lors de ma thèse) pour suivre la micro-gouttelette sur l'ensemble de son parcours de chute. Par la suite, l'équipe pourra coupler une source d'ions simplement chargés à ce dispositif pour étudier les effets d'endommagement de molécules d'intérêts biologiques.

Chapitre 4

Etude de l'endommagement à l'échelle moléculaire

CHAPITRE 4 : Etude de l'endommagement à l'échelle moléculaire

L'une des thématiques émergentes de l'équipe porte sur l'irradiation de systèmes biomoléculaires pertinents (tels que des brins d'ADN) en phase condensée avec une analyse physico-chimique en phase gazeuse des produits issus de l'irradiation. Cette étude repose sur le couplage de notre source de mise en phase gazeuse précédemment décrite avec une plateforme d'irradiation. L'objectif est d'accéder à une compréhension au niveau moléculaire des mécanismes d'endommagement, en dépassant les limites des approches "*top-down*" et "*bottom-up*" évoquées dans le chapitre 1 à la section 1.4. Plus précisément, nous souhaitons nous intéresser à la chimie radicalaire associée aux effets indirects, suite à l'irradiation par un faisceau d'ions des micro-gouttelettes et des biomolécules qu'elles contiennent. La contribution des effets directs sera quant à elle étudiée à travers une collaboration initiée avec l'équipe MATériaux Défauts IRradiation (MADIR) du Centre de recherche sur les Ions, les MATériaux et la Photonique (CIMAP) à Caen.

4.1 Irradiation de micro-gouttelettes sous vide par un faisceau d'ions.

Comme je l'ai rappelé dans le chapitre 1 à la section 1.6, les deux approches classiques "*top-down*" et "*bottom-up*", n'ont pas permis de clarifier les origines des dommages causés par l'irradiation, à une échelle moléculaire. En effet, l'approche "*top-down*" ne permet pas de mettre en exergue que les conséquences biologiques liées à l'irradiation, telles que les cassures simple et double brin de l'ADN, sans pouvoir déceler les causes étant donné la grande complexité de la chaîne d'événements engendrés. L'approche "*bottom-up*" s'est révélée quant à elle inutile pour extrapoler les résultats auxquels elle conduit à des conséquences biologiques observables, en raison de la trop grande simplification des systèmes étudiés (absence d'environnement, taille des biomolécules limitée : quelques bases nucléiques ou une dizaine d'acides aminés).

Nous proposons donc, une voie originale, qui combinera les avantages des deux approches classiques précédentes : étude en phase condensée de biomolécules pertinentes (telles que des brins d'ADN) et compréhension des processus à l'échelle moléculaire par l'utilisation de techniques d'analyse en phase gazeuse. Cette nouvelle approche permettra

d'étudier les processus de chimie radicalaire induits suite à une irradiation (effets indirects).

Elle repose sur le couplage de l'expérience de mise en phase gazeuse de grandes biomolécules par désorption laser non-résonnante sur microgouttelettes (décrite en détail dans le chapitre 2 section 2.2) à une plateforme d'irradiation par des ions simplement chargés de basses énergies (la source d'ions ainsi que son couplage avec l'expérience de mise en phase gazeuse est décrite dans la section 4.2). Ce projet a obtenu un soutien financier de l'INCA (Institut National du CAncer) en 2015.

Pour pouvoir étudier les effets indirects, l'irradiation doit se faire en phase condensée, donc en amont de la mise en phase gazeuse (voir figure 4.1). Cette irradiation sera produite par un faisceau d'ions interagissant avec la micro-gouttelette lors de sa chute sous vide, avant désorption. La forme donnée au faisceau d'ions dans la zone d'interaction permettra d'ajuster le temps d'irradiation de quelques μs à plusieurs centaines de micro-secondes. Ce temps d'irradiation sera suffisant pour permettre la formation d'espèces radicalaires et leur migration dans la solution

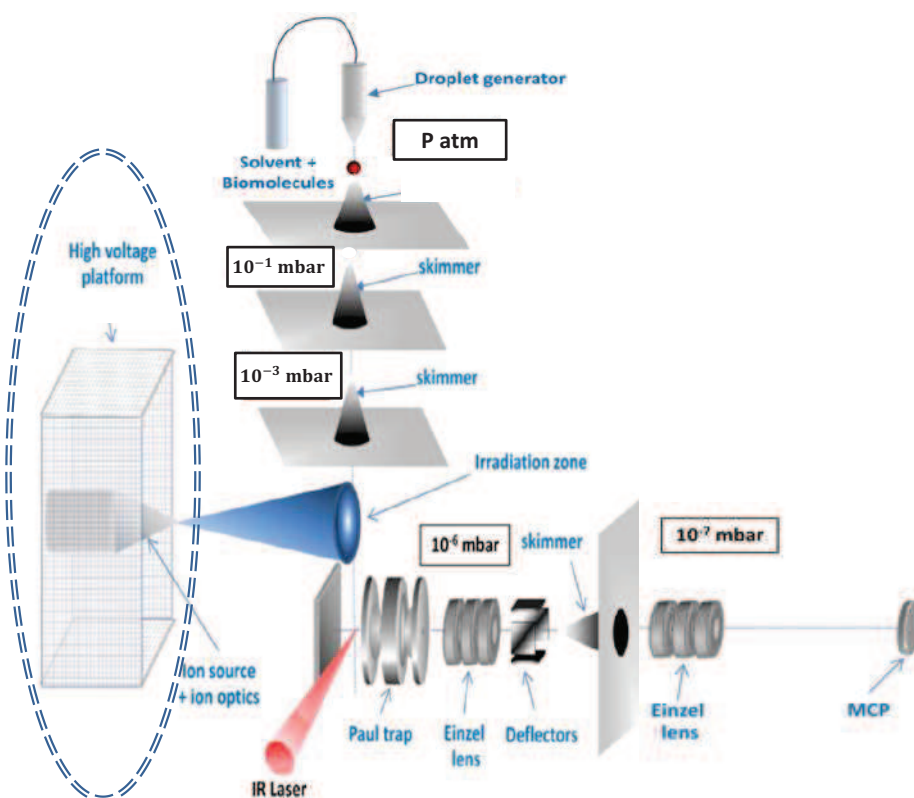


FIGURE 4.1 – Couplage entre la plateforme d'irradiation et la source de mise en phase gazeuse. L'irradiation sera effectuée en amont de la désorption, en phase condensée.

Donc, avec la plateforme d'irradiation, nous allons irradier par des ions simplement chargés, possédant une énergie cinétique de quelques dizaines de keV, des gouttelettes

contenant les biomolécules dont nous voulons étudier les dommages. La zone d'exposition correspondra aux très faibles doses d'irradiation (maximum de l'ordre du picroSv en dose équivalente). Les ions créeront, par radiolyse dans la couche superficielle (premières centaines de nanomètres) du solvant, une cascade de particules secondaires (électrons solvatés et radicaux). Ceci constitue l'étape physico-chimique de l'irradiation (voir chapitre 1 section 1.3.3), bien connue grâce à l'étude de la radiolyse de l'eau. Or, l'étape suivante (phase chimique de l'irradiation) durant laquelle les radicaux libres vont réagir avec les molécules présentes en solution dans la zone non-irradiée, est nettement moins bien caractérisée dans le cas de la radiolyse de l'eau, voire quasiment incomprise dans le cas de biomolécules. C'est cette partie de chimie radicalaire liée aux effets indirects que notre dispositif permettra d'étudier, pour la toute première fois, en étant exempt de toute autre contribution. En effet, les effets directs seront limités à une très faible couche à la surface de la micro-gouttelette (faible profondeur de pénétration des ions), tandis que les espèces secondaires (radicaux libres, électrons solvatés) créées dans cette même couche vont migrer dans tout le volume de la micro-gouttelette (distances de migration de l'ordre de quelques dizaines de μm , pour un diamètre de la micro-gouttelette de 50 μm) et engendrer des cascades qui elles aussi s'étendent à l'ensemble de la micro-gouttelette (voir figure 4.2).

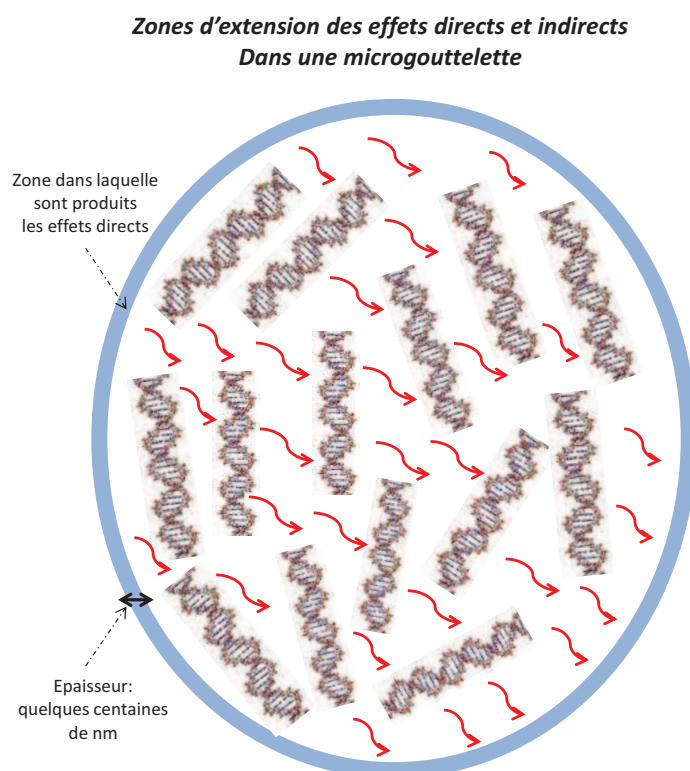


FIGURE 4.2 – Les molécules d'ADN sont dissoutes dans l'eau. Lors de l'irradiation, des effets directs et indirects sont engendrés dans une couche de faible épaisseur à la surface de la micro-gouttelette. Les effets directs se limitent à cette couche, alors que des espèces radicalaires liées aux effets indirects se propagent dans tout le volume de la micro-gouttelette.

Cette irradiation des micro-gouttelettes sous vide permettra donc bien aux mécanismes de chimie radicalaire de se dérouler. Les études débiteront avec un environnement aqueux, mais la versatilité de notre source de biomolécules permettra par la suite de prendre en compte les nombreux effets d'inhomogénéités de cette chimie en employant différents solvants. Etant donné que les plus sévères conséquences de l'irradiation résultent de l'endommagement du matériel génétique, en particulier par la production de cassures simple et double brin de la molécule d'ADN [19], les biomolécules sélectionnées pour l'étude des effets indirects seront notamment des brins d'ADN. L'étude pourra cependant s'étendre aux conséquences des radiations sur d'autres biomolécules (peptides et protéines) dans l'objectif d'approcher les conditions cellulaires en mélangeant des polypeptides aux molécules d'ADN dans les micro-gouttelettes. Aller vers des environnements de plus en plus pertinents biologiquement revêt une importance considérable car l'endommagement de l'ADN est susceptible d'être influencé par les molécules environnantes. Une récente étude d'Alizadeh et Sanche [84] a ainsi montré que la présence de petites biomolécules autour de l'ADN pouvait considérablement augmenter le rendement des cassures simple et double brin de la molécule d'ADN.

Ces modifications des taux d'endommagement par l'environnement est exploité médicalement par l'ajout de radio-sensibilisateurs vectorisés vers la zone tumorale. Ces radio-sensibilisateurs (par exemple nanoparticules d'or, de platine, d'alliages) ont la capacité d'augmenter les effets de la radiothérapie ou de la hadronthérapie. Une des explications avancée est qu'ils absorbent les rayonnements ionisants et réémettent un grand nombre d'électrons secondaires, électrons secondaires qui conduisent à de nombreuses cassures des brins d'ADN. En les vectorisant (en fonctionnalisant les nanoparticules par exemple), on peut cibler les zones tumorales et provoquer ainsi un fort endommagement de ces zones tout en précisant les tissus sains environnants. Il y a donc un grand intérêt à mieux comprendre les mécanismes d'action de ces radio-sensibilisateurs et à quantifier leurs effets. Notre dispositif nous permettra d'étudier ces effets, et nous nous sommes d'ores et déjà, via une collaboration initiée avec l'équipe Spectroscopies Biomolécules et Milieux Biologiques (SPMB) du laboratoire Chimie, Structures, Propriétés de Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques (CSPBAT) à l'université Paris 13 et le laboratoire de Recherche Vasculaire (LVTS pour Laboratory for Vascular Translational Science) également à l'université Paris 13, intéressé à la caractérisation en phase gazeuse de nanoparticules d'or fonctionnalisées (par des polymères pegylés par exemple, voir chapitre 3 à la sous-section 3.2.4.4). Cette étude pourra être menée en parallèle au CIMAP, à Caen, en ajoutant ces mêmes nanoparticules fonctionnalisées à des glaces.

Dans la suite, je présente la plateforme d'irradiation en détail ainsi que le couplage de cette dernière à notre source de mise en phase gazeuse.

4.2 Couplage de notre source de désorption à une source d'ions

4.2.1 Détails techniques de la plateforme d'irradiation

Pour endommager nos biomolécules, nous avons choisi de travailler avec une source d'ions fondée sur un plasma entretenu par une décharge de type magnétron. Notamment, la notre

est une source ECR (Electron Cyclotron Resonance) achetée chez l'entreprise TECTRA, qui développe différentes sources d'ions. On peut voir une photographie de notre source sur la figure suivante.



FIGURE 4.3 – Source ECR de la marque TECTRA. Modèle : *tectra Gen2 Plasma Source*.

Je vais maintenant décrire le fonctionnement d'une source d'ions ECR avec laquelle il est possible d'obtenir des ions monochargés ou multichargés. Ce type de source a été développé par R.Geller en 1969 [85]. Aujourd'hui, elles sont utilisées dans différents domaines tels que : les interactions ion-surface, la physique des plasmas et la physique atomique.

Son principe repose sur l'interaction entre un gaz d'électrons piégés dans un champ magnétique et des atomes que l'on souhaite ioniser. Plus précisément, ce gaz d'électrons est confiné dans une chambre sous l'influence d'un champ magnétique axial et radial. Si une onde électromagnétique (quelques GHz) de même fréquence f_{HF} que la fréquence de giration f_{cyc} des électrons est appliquée, alors ces derniers sont accélérés et leur rayon s'accroît (principe de la résonance électronique cyclotronique). On peut exprimer ceci avec la relation suivante :

$$2\pi f_{HF} = 2\pi f_{cyc} = \frac{eB}{m_e} \quad (\text{Equation 4.1})$$

Notamment, pour une fréquence $f_{HF} = 2.45$ GHz (c'est le cas de notre source), pour que la condition de résonance soit remplie, il faut que le champ magnétique soit égal à 0,0876 T. Cette fréquence est souvent utilisée car un grand nombre de générateurs micro-onde sont développés à cette fréquence.

Les électrons passent plusieurs fois dans la zone ECR. Lors de leurs multiples passages dans la zone ECR, ils peuvent gagner ou perdre de l'énergie, on parle alors de chauffage stochastique. Au final le bilan est plutôt positif et ces électrons ont alors une

vitesse suffisante (les électrons peuvent atteindre des énergies allant jusqu'à plusieurs dizaines de keV [86]) pour ioniser par impact électronique les atomes qui entrent en collision avec ce gaz d'électrons. Pour que le processus d'impact électronique se produise, il est nécessaire que l'énergie cinétique des électrons soit plus grande que le potentiel d'ionisation de l'électron le moins lié à l'atome. Ensuite, les ions une fois chargés, sont extraits de la source par l'application d'une haute tension. La figure suivante illustre mon propos.

Avec ce type de source, les courants d'ions en sortie peuvent atteindre quelques dizaines de mA. La nôtre devrait nous permettre d'atteindre 20 mA. En sortie de la source, nous ajouterons une optique ionique pour obtenir des flux de l'ordre de plusieurs mA.cm^{-2} dans la zone de collision. Cette source peut travailler avec un vaste ensemble de gaz (nobles ou réactifs) permettant de produire, par exemple, des faisceaux d'ions de He, O, Ne, Ar, ce qui permettra de garder une certaine flexibilité vis-à-vis du pouvoir d'arrêt linéique. Ce critère, couplé à la possibilité de faire varier l'énergie cinétique des faisceaux produits en plaçant cette source sur une plateforme haute tension ($\simeq 50 \text{ kV}$), nous permettra de contrôler la zone endommagée de la goutte, en faisant varier la longueur de pénétration des ions de quelques nanomètres à la centaine de nanomètres.

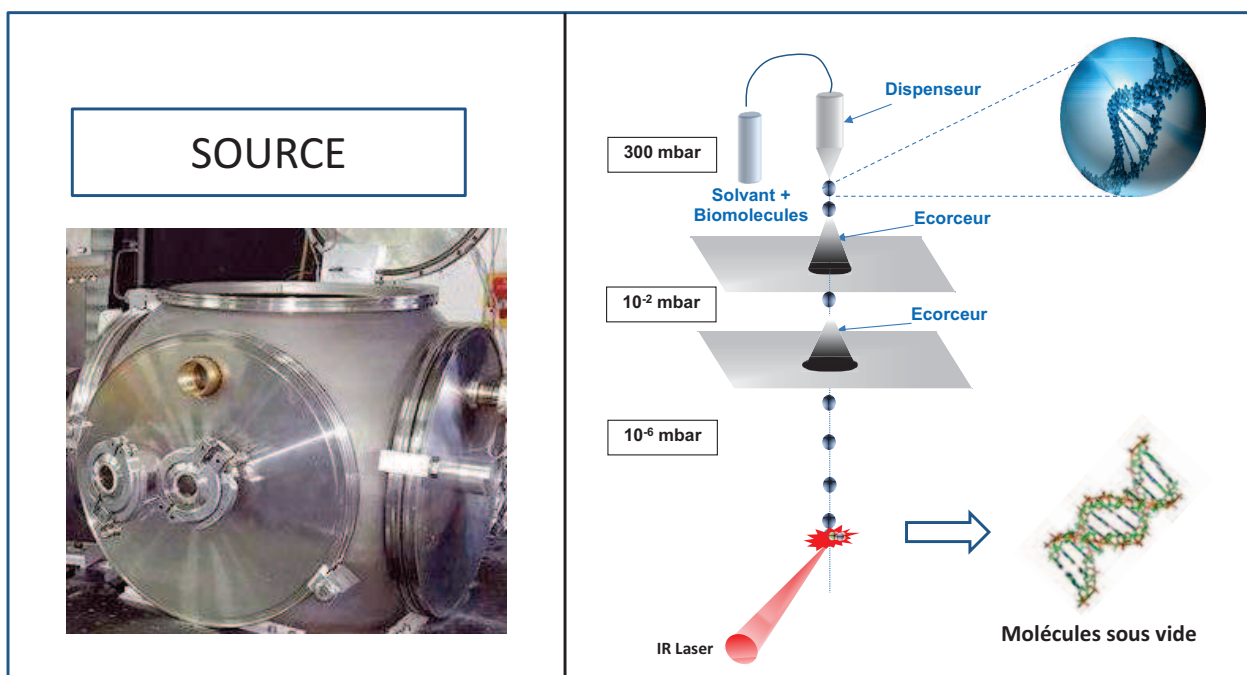


FIGURE 4.4 – Schéma de principe d'une source ECR.

4.2.2 Couplage mécanique de la source d'ions à l'expérience

Actuellement, nous sommes en train de développer la nouvelle version de la source, avec notamment une évolution vers trois chambres et trois écorceurs au lieu de deux chambres

et deux écorceurs initialement (voir chapitre 2 section 2.2.5 figure 2.22). Cette évolution nous permettra de faire fonctionner le dispenseur à pression atmosphérique plutôt que dans une chambre à 300 mbar (c'est ce qu'on faisait initialement), ce qui sera plus adapté à ses conditions classiques de fonctionnement. De plus, nous pourrions nous affranchir du DMSO comme solvant et utiliser uniquement de l'eau ce qui nous permettra d'être plus pertinent biologiquement.

En parallèle, nous sommes également en train de modifier le design du TOF. Nous l'avons allongé d'au moins un mètre car nous envisageons d'ajouter un tube de Gauss (après le piège de Paul) dont la longueur est d'au moins 50 cm. L'intérêt d'un tube de Gauss est de pouvoir accélérer les ions en sortie du piège de Paul et donc d'améliorer la résolution et la détection. En pratique, on extrait les ions du piège en pulsant l'électrode de sortie, puis on impose une différence de potentiel élevée entre cette électrode de sortie et l'entrée du tube de Gauss pour accélérer fortement les ions. Une fois que tous les ions sont dans le tube, on change subitement le potentiel du tube pour le ramener à un potentiel nul. Lors de ce changement de potentiel, les ions ne sont pas perturbés et restent donc fortement accélérés. Ainsi, les ions à la sortie du tube sont suffisamment accélérés et parcourent une zone sans champ avant d'arriver sur le détecteur.

De plus, l'expérience se trouve au milieu de la salle (avant elle était collée à un mur). Ceci nous permet de tourner autour de l'expérience sans problème afin de réaliser des modifications si nécessaire et permettra également de réaliser le couplage avec la plateforme d'irradiation. La figure 4.5 présente le nouveau dispositif qui est actuellement en cours de développement.



FIGURE 4.5 – Nouveau montage en cours de développement.

L'irradiation s'effectuera donc dans la *source* pendant la chute de la micro-gouttelette (voir figure 4.6). Une fois la micro-gouttelette irradiée, on effectuera la désorption avec notre laser OPO. Ensuite, les ions produits sont capturés dans un piège de Paul (le piège est dans deuxième enceinte, juste après la *source*). Par la suite, ils sont extraits du piège

et évoluent dans une zone de vol libre avant d'être détectés via une MCP. Chaque enceinte est montée sur un plateau qui peut glisser sur des rails. Nous avons réalisé ceci afin de pouvoir apporter facilement des modifications dans chaque enceinte.

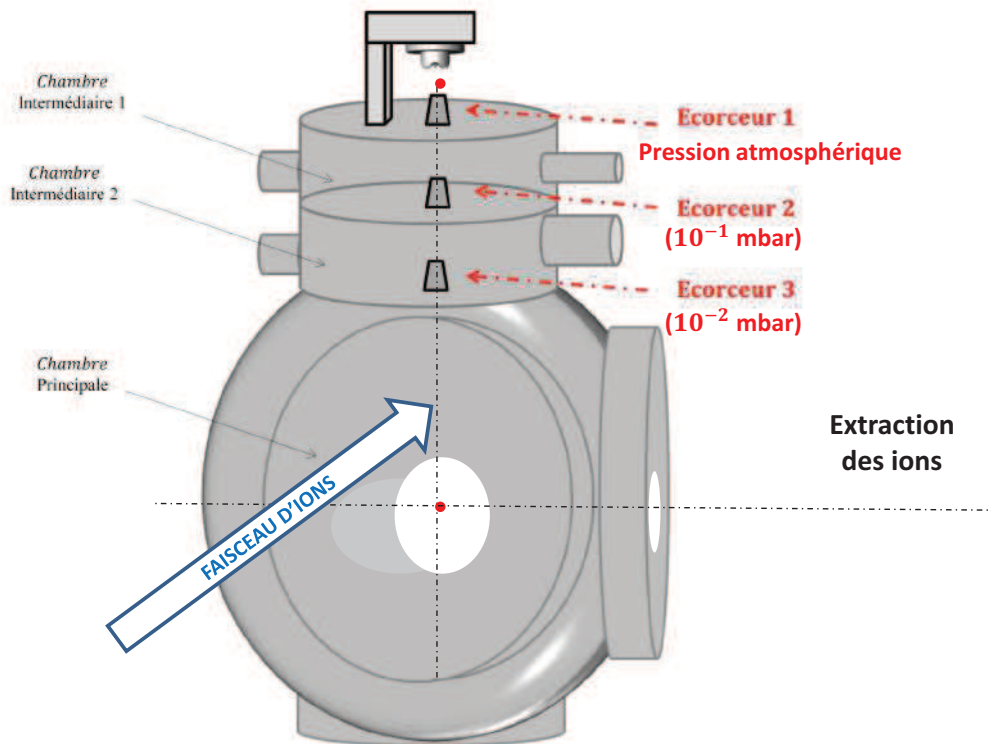


FIGURE 4.6 – Schéma de la nouvelle source de micro-gouttelettes. Le faisceau d'ions irradie la micro-gouttelette lors de sa chute sous vide. Le point rouge représente une micro-gouttelette.

Le laser OPO passera à travers un hublot d'une bride qui est opposée à la bride concernant le faisceau d'ions. Le faisceau d'ions sera donc au-dessus du faisceau laser pour irradier les micro-gouttelettes en amont de la désorption laser.

Dans la nouvelle version de notre source de micro-gouttelettes nous avons trois chambres : chambre intermédiaire 1, chambre intermédiaire 2 et chambre générateur. Après plusieurs tests de vide, les pressions respectives sont les suivantes : 10^{-1} mbar, 10^{-2} mbar et 10^{-6} mbar. Au niveau du détecteur, nous espérons avoir une pression de 10^{-7} mbar puisqu'une vanne sera montée au milieu des 2 cylindres de la partie TOF (voir figure 4.7).

La figure suivante présente une vue d'ensemble du nouveau dispositif.

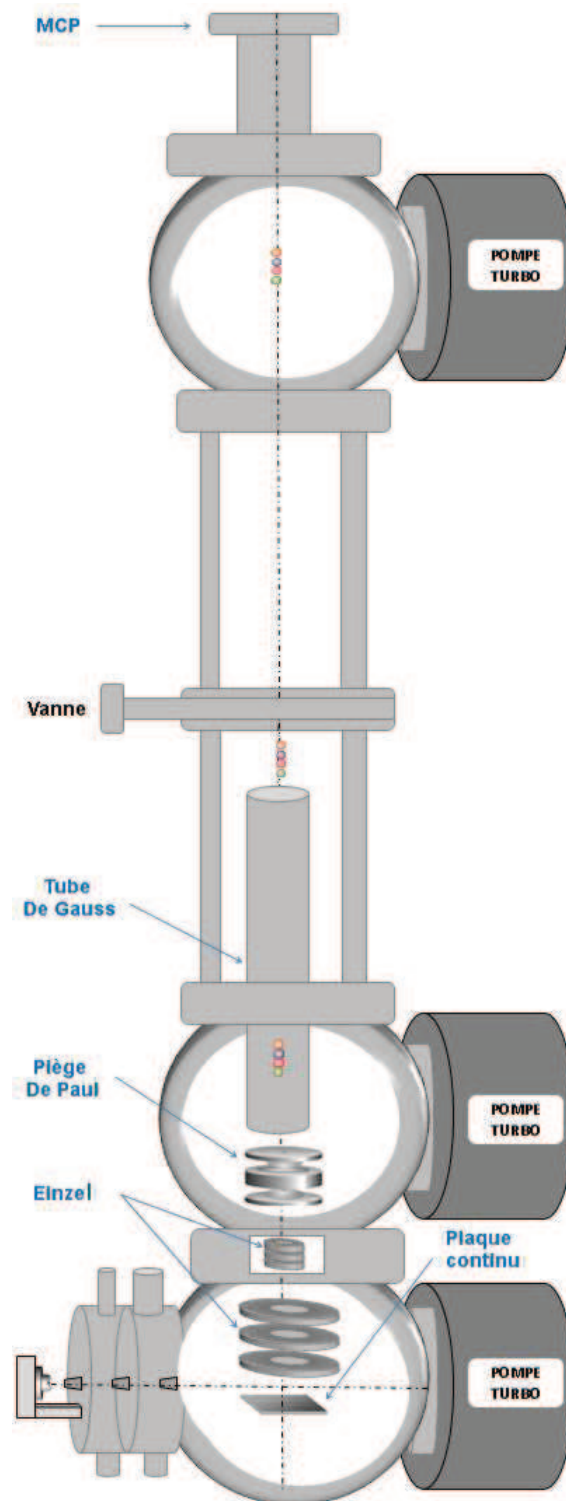


FIGURE 4.7 – Schéma de la nouvelle source de micro-gouttelettes. Le faisceau d'ions irradie la micro-gouttelette au cours de sa chute sous vide. Le point rouge représente une micro-gouttelette.

Une fois que les ions sont désorbés avec notre Laser OPO, ils sont poussés par une plaque

continue et focalisés avec une Einzel de grande taille. Une seconde Einzel sera présente pour focaliser les ions dans le piège de Paul. Ensuite, les ions sont extraits du piège et pénètrent dans un tube de Gauss ($\simeq 3000$ V). Lorsque tous les ions sont dans le tube, on ramène subitement le potentiel de ce dernier à 0V). Après avoir traversé une zone de vol libre, ils sont comptés par un détecteur MCP. Dans chaque enceinte, le vide est obtenu par des pompes turbo moléculaires. Au niveau du détecteur, la pression atteinte sera proche de 10^{-7} mbar.

4.3 Effets directs

Avec l'approche que nous proposons, nous avons accès uniquement aux effets indirects comme je l'ai expliqué précédemment. Pour obtenir la contribution des effets directs, une collaboration a été initiée avec l'équipe MADIR au CIMAP, à Caen. Les mêmes biomolécules (brins d'ADN) piégées dans de la glace, seront irradiées avec un faisceau d'ions lourds hautement énergétiques (leur faisceau d'ions peut couvrir la gamme d'énergie allant du KeV au MeV). De ce fait, nous gardons l'avantage d'irradier en phase condensée, avec une analyse quantitative des produits issus de l'irradiation, en phase gazeuse. Nous aurons la possibilité de prendre en compte un effet d'environnement, en contrôlant l'épaisseur de la couche de glace dans laquelle seront piégées nos biomolécules.

Le dispositif de l'équipe MADIR comporte une chambre dans laquelle réside une tête froide qui permet de condenser des gaz sur une surface de cuivre et de préparer des échantillons de glace. C'est dans cette chambre qu'on irradie avec le faisceau du Ganil les biomolécules piégés dans la glace. Les fragments issus de l'irradiation sont détectés par spectrométrie de masse à temps de vol. Plusieurs expériences ont été effectuées sur des glaces d'eau. Notamment, la figure suivante montre un spectre de glace d'eau irradiée à 10 K par un faisceau de O^{6+} à 90 KeV.

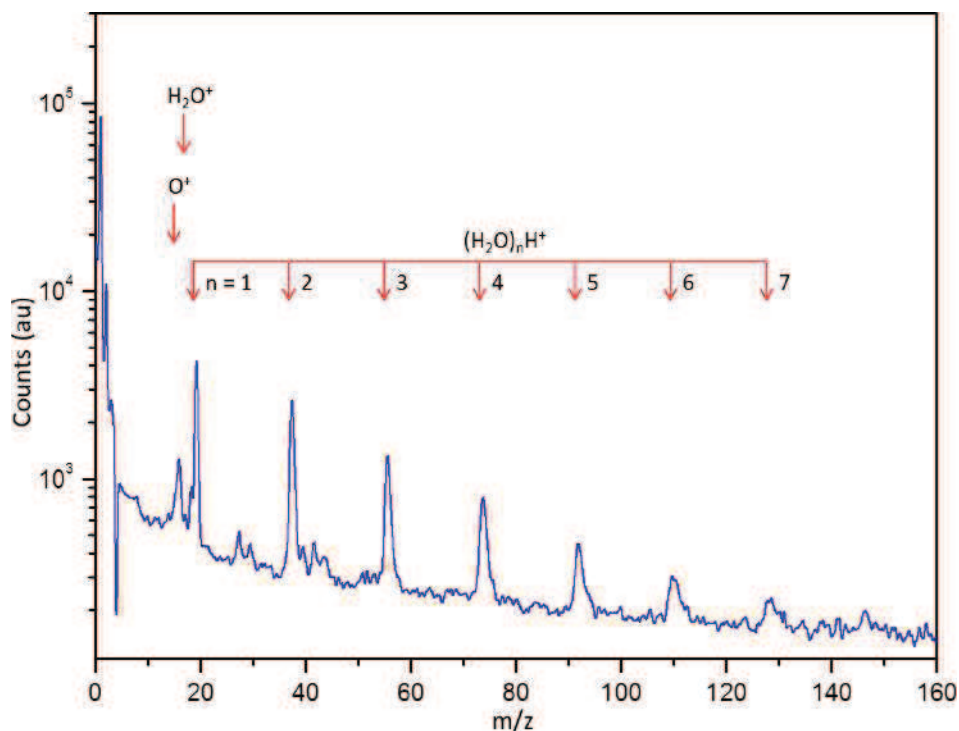


FIGURE 4.8 – Spectre de masse d’ions secondaires émis suite à l’irradiation d’une glace d’eau par un faisceau de O^{6+} à 90 KeV. Le spectre de masse est dominé par un série d’agrégats d’eau $(H_2O)_nH^+$.

Récemment, une micro-balance en quartz (QCM : Quartz-Crystal Microbalance) a été ajouté à la tête froide. Cette micro-balance permet de contrôler l’épaisseur de la matrice formée. Lors de l’irradiation, il y a formation de fragments de différentes natures : neutres et chargés. Cependant, il y a plus de fragments neutres que de fragments chargés. Nous pouvons savoir combien il y a d’espèces chargés grâce au TOF. La micro-balance permettra de quantifier les fragments neutres mais aussi de contrôler l’épaisseur des glaces formées avant irradiation

Donc, à Caen, nous étudierons les effets directs sur des biomolécules irradiées par des ions de haute énergie. En effet, ce type de particules peut déposer une grande quantité d’énergie menant à la destruction de la biomolécule mère. Avec un TOF, il sera alors possible de détecter les fragments issus de la biomolécule mère. A partir de l’analyse du spectre de temps de vol, une analyse quantitative sera effectuée pour comprendre le mécanisme de destruction direct des biomolécules. Ces résultats obtenus à Caen seront alors comparés à ceux obtenus en phase liquide sur notre dispositif à Paris concernant les effets indirects. Grâce à cette comparaison nous espérons établir une hiérarchie dans les événements d’irradiation et interpréter, à une échelle moléculaire, l’origine des dommages.

4.4 Conclusion

Ce chapitre a permis de présenter notre approche pour étudier les effets indirects d'irradiation via le couplage de l'expérience de mise en phase gazeuse de grandes biomolécules par désorption laser non-résonnante sur micro-gouttelettes (décrite en détail dans le chapitre 2 section 2.2) à une plateforme d'irradiation par des ions simplement chargés de basses énergies. Pour obtenir la part des effets directs d'irradiation, une collaboration a été initiée avec l'équipe MADIR au CIMAP, à Caen.

Concernant les effets indirects, la nouvelle version de notre source de micro-gouttelettes est prête. Actuellement, nous sommes en train de caractériser la source d'ions. Une fois ceci réalisé, nous allons coupler la source d'ions à l'expérience de mise en phase gazeuse. Comme je l'ai expliqué précédemment, les micro-gouttelettes seront irradiées en amont de la désorption laser. C'est tout l'intérêt de notre approche, qui est d'endommager avec la source d'ions nos biomolécules dans leur environnement biologique (essentiellement de l'eau) et ensuite de transférer sous vide les fragments des biomolécules et les analyser par des techniques en phase gazeuse (spectrométrie de masse). Lorsque le couplage sera réalisé, nous effectuerons des tests sur des brins d'ADN.

Pour les effets directs, l'expérience à Caen est déjà opérationnelle. Des dates sont prévues prochainement pour mener des expériences avec les mêmes biomolécules que celles étudiées sur notre dispositif, à Paris. Nous comptons par la suite complexifier le milieu environnant (ajout de peptides par exemple) pour le rendre plus proche du milieu cellulaire, et également ajouter dans les micro-gouttelettes des nanoparticules d'or fonctionnalisées, pour mieux comprendre les effets des radio-sensibilisateurs.

Annexe

ANNEXE : Photofragmentation des 2-,3- et 4-Hydroxypyridine protoné

A - 1 Motivation du choix des systèmes étudiés

Lors de ma deuxième année de thèse, nous avons effectué des expériences au CLUPS (Centre de Laser de l'Université Paris Sud), à Orsay, afin de mener des études spectroscopiques sur les 2-,3- et 4- hydroxypyridine protonées. Les structures de ces trois molécules sont présentées sur la figure A. Les hydroxypyridines sont protonées sur l'azote et peuvent adopter deux conformations suivant la position de la paire d'électrons libres de l'oxygène par rapport à la position du proton. Le conformère pour lequel cette paire d'électrons libres est orientée vers le proton sera noté *syn*, et le conformère obtenu par rotation de π autour de la liaison C-O sera noté *anti*.

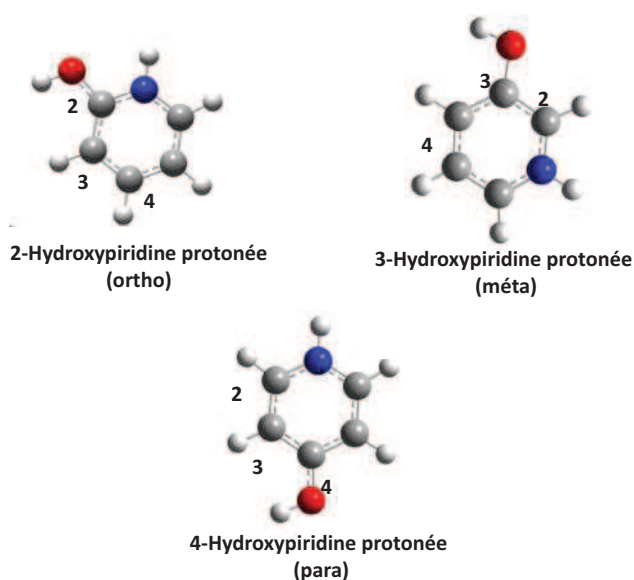


FIGURE A – Structure de la 2-,3- et 4- hydroxypyridine protonées.

Cette étude s'inscrit dans le cadre de l'approche "*bottom-up*" des effets des irradiations

dont j'ai déjà parlé précédemment : il s'agit de comprendre les processus de désexcitation sur des systèmes "modèles". De tels systèmes modèles doivent être suffisamment petits d'une part, pour que l'interprétation des résultats expérimentaux à l'aide de calculs de chimie quantique soit possible, et suffisamment pertinents biologiquement parlant d'autre part, pour pouvoir extrapoler ces résultats à des systèmes jouant effectivement un rôle dans le vivant. Les hétérocycles aromatiques constituent de tels systèmes modèles, dans la mesure où ils peuvent représenter des briques moléculaires constitutives de grandes biomolécules, et il y a donc un intérêt fondamental à comprendre leur photochimie dans l'ultraviolet [87–89]. Cette photochimie est en effet sous-jacente aux fonctions de beaucoup de biomolécules et peut engendrer notamment un endommagement de l'ADN et causer ainsi des maladies [90, 91]. Parmi ces hétérocycles aromatiques, notre attention s'est portée sur les hydroxypyridines pour deux raisons. La première raison concerne la 2-hydroxypyridine, qui présente deux tautomères stables : la forme enol et la forme keto (appelée 2-pyridone). Ces deux tautomères sont liés par un transfert d'hydrogène entre l'azote et l'oxygène, et ce sont des hétérocycles azotés présentant les mêmes sites de liaison hydrogène que l'uracile et la thymine. Cette similitude fait du dimère 2-pyridone-2-hydroxypyridine un modèle très pertinent pour l'étude de paires de bases de l'ADN [92], et de nombreuses études de spectroscopie en phase gazeuse sur des jets moléculaires de 2-hydroxypyridine ont été réalisées au cours des dernières décennies [93–97]. La seconde raison ayant motivé notre choix concerne la 3-hydroxypyridine : son cation a été identifié comme étant un chromophore photo-toxique pouvant provoquer la sensibilisation de cellules de la peau [98], et des dérivés de la 3-hydroxypyridine, comprenant une large gamme de biomolécules cutanées, peuvent provoquer des dommages cutanés par photo-oxydation [99]. Cette molécule est donc même plus qu'un simple système modèle, et l'étude de ses états excités pourrait conduire à une meilleure compréhension de ses mécanismes d'action.

Nous nous sommes intéressé plus spécifiquement ici aux hydroxypyridines protonées. La production et les études par spectroscopie d'acides aminés aromatiques protonés et de bases de l'ADN ou de l'ARN protonées (et de leurs homo-dimères) se sont développées récemment et ont été rendues possibles par le couplage entre une source électrospray et un piège froid [100]. La molécule aromatique protonée la plus simple, le benzène, et l'hétérocycle aromatique azoté le plus simple, la pyridine, n'ont été caractérisés que très récemment à moyenne résolution [101, 102]. Le spectre électronique du benzène protoné ne présente aucune structure, ce qui est en accord avec les importants changements de géométrie et la dynamique rapide par conversion interne prédits par des calculs *ab-initio* [103]. En ce qui concerne la pyridine protonée, les spectres réalisés dans la gamme $3700\text{--}45000\text{ cm}^{-1}$ montrent une large bande électronique avec une structure vibronique résolue. La structure de l'état excité n'est pas plane et correspond à une géométrie prévulfénique. Ce comportement est commun à de nombreux petits aromatiques et est également observé pour la pyridine neutre [104–107]. Très récemment, Broquier *et al.* ont réalisé l'étude des ortho, meta et para aminopyridines protonées [108, 109] et ont montré que bien que ces molécules aromatiques sont relativement simples, leurs mécanismes de désexcitation sont complexes. Nous avons donc décidé de réaliser une étude systématique de l'influence de la position du groupement hydroxyle dans les hydroxypyridines protonées. Nous avons réalisé la spectroscopie de ces molécules dans la gamme $33500\text{--}4100\text{ cm}^{-1}$ à l'aide d'un dispositif couplant une source électrospray avec un piège quadripolaire et un spectromètre de masse par temps de vol.

A - 2 Résultats expérimentaux

A - 2.1 Dispositif expérimental

Les 2-,3- et 4-hydroxypyridine ont été achetées chez Sigma Aldrich. Pour l'expérience, elles sont dissoutes dans un mélange eau/méthanol (50/50) à une concentration de 100 mM. Quelques gouttes d'acide acétique sont ajoutés au mélange pour favoriser la protonation. Les spectres électroniques ont été obtenus via une technique de spectroscopie par photo-fragmentation dans un piège quadrupolaire cryogénique (piège de Paul de Jordan TOF Products, Inc). Ce dispositif [110, 111] est similaire à celui développé par Wang [112].

Les espèces protonées sont donc produites dans une source d'ion de type électrospray. Elles passent à travers un octopole pulsé à 10 Hz qui permet de produire des paquets d'ions d'une durée comprise entre 500 ns et 1 μ s. Ensuite, elles traversent un premier tube de Gauss porté à -200 V pendant 6 μ s. Une fois que tous les ions sont dans le tube de Gauss, on porte le tube à un potentiel nul de sorte que les ions sortent du tube dans une région sans champ. Cette séquence temporelle produit des paquets d'ions avec une largeur temporelle de moins de 1 ms et permet la sélection en masse en fonction du temps de vol de l'ion parent que l'on souhaite étudier. Cette sélection en masse est réalisé 40 cm en aval du tube de Gauss, à l'entrée du piège quadripolaire. Les ions parents sont alors piégés dans piège quadripolaire, qui est monté sur la tête froide d'un cryostat, qui maintient une température de 10-15 K. Un gaz tampon (hélium) est envoyé dans le piège afin de piéger et thermaliser les ions. On envoi le gaz tampon via une vanne pulsé 1 ms avant l'entrée des ions dans le piège.

Le laser de photo-fragmentation est envoyé après quelques dizaines de millisecondes pour permettre aux ions de se thermaliser par collisions avec le gaz tampon dans le piège. Enfin, tous les fragments ioniques et les molécules parents sont extraits du piège et accélérés à l'aide un second tube de Gauss (longueur de 30 cm), pour une analyse en masse dans un spectromètre de masse par temps de vol. La photo-fragmentation peut-être réalisée à l'aide de deux laser différents : un laser picoseconde à amplification paramétrique optique (OPA) ayant une résolution de 8 cm^{-1} ou un laser nanoseconde à colorant (Quantel TDL 90) ayant une résolution d'environ de 0.2 cm^{-1} . La figure B présente le dispositif expérimentale.

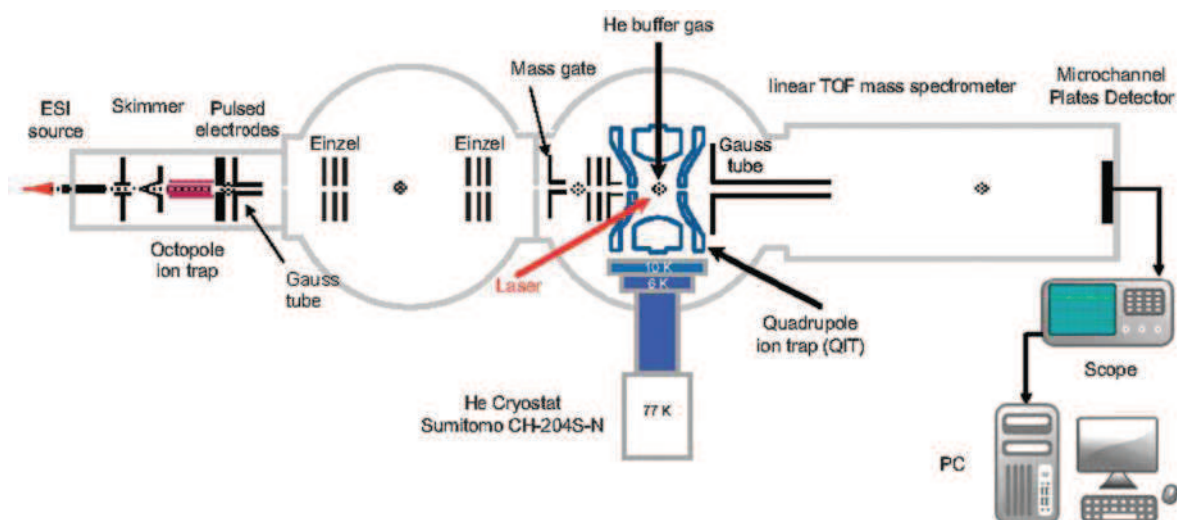


FIGURE B – Dispositif expérimentale comprenant la source d’ions de type électrospray, le piège quadrupolaire et le spectromètre de masse par temps de vol.

Pour les mesures de cinétique de fragmentation, le temps de fragmentation est mesuré en changeant le délai entre le laser et le pulse d’extraction qui permet d’éjecter les ions hors du piège vers le spectromètre de masse. La résolution temporelle, de l’ordre de 80 ns, est limitée par le front de montée du pulse haute tension.

Dans le cas de la 3-hydroxypyridine, deux isomères sont susceptibles d’être présents dans le piège après le processus de refroidissement, comme je l’expliquerai ultérieurement. Pour confirmer la présence de ces deux isomères, nous avons réalisé une spectroscopie UV-UV (“Hole Burning”) des ions parents piégés, à l’aide de deux lasers à colorants. Nous avons utilisé pour cela la méthode dite du “titillement” (“tickle method”), initialement proposée par Kang et al. [113]. Cette méthode consiste à appliquer sur l’une des électrodes d’entrée ou de sortie du piège une radiofréquence auxiliaire dont la fréquence est ajustée pour éjecter de manière sélective un fragment ionique donné. De cette façon, ce fragment ionique, créé par un premier laser UV (laser de pompe) accordé sur une bande vibronique donnée, est éjecté du piège, ce qui rend possible l’enregistrement du signal induit par un second laser UV (sonde) qui balaye toute la gamme spectrale étudiée, et ce sans aucun bruit de fond. La tension de la radiofréquence auxiliaire reste inférieure à 1 V et est appliquée pendant 10 ms après l’excitation provoquée par le laser de pompe.

A - 2.2 2-hydroxypyridine protonée : 2-HPH⁺

La figure C.a) présente le spectre de photo-fragmentation UV, bien résolu vibrationnellement, obtenu avec le laser OPA picoseconde sur un large domaine spectral, allant de 34500 cm⁻¹ à plus de 2000 cm⁻¹ plus haut. L’excitation UV de 2-HPH⁺ (m/z 96) conduit à un fragment de m/z 78, correspondant à la perte de H₂O. Ce fragment, qui est aussi la principale voie de dissociation en dissociation induite par collision (CID), est produit

immédiatement avec une cinétique de formation plus courte que la résolution temporelle de l'expérience définie par le temps de montée de 80 ns du pulse d'extraction du piège.

Le spectre vibronique de 2-HPH⁺ est composé de bandes intenses et étroites. La première de ces bandes intenses est observée à $35\,435 \pm 5\text{ cm}^{-1}$ tandis que des transitions de faible intensité sont à peine visibles dans le rouge de cette bande intense. La figure C.b) présente le spectre obtenu avec le laser à colorant dont la résolution est de 0.2 cm^{-1} . Ce spectre confirme que la première bande vibronique de faible intensité est bien située à $34\,806 \pm 5\text{ cm}^{-1}$ (0_0^0), c'est-à-dire, à 630 cm^{-1} de la bande intense. Ces faibles transitions ne peuvent pas être attribuées à des bandes chaudes car elles sont trop loin dans le rouge de la bande intense. Dans la région des faibles fréquence, il y a une progression vibrationnelle de $\pm 82\text{ cm}^{-1}$ à partir de la première transition à $34\,806\text{ cm}^{-1}$ avec au moins deux quantas d'intensité croissante. Cela suggère une distorsion de géométrie dans l'état excité suivant un mode de basse fréquence, ce qui conduit à une bande origine de faible intensité. Le fait que le signal soit faible rend difficile une attribution sans ambiguïté de toutes les transitions observées. Nous pouvons néanmoins retrouver la même progression vibrationnelle construite depuis une bande située 390 cm^{-1} au-dessus de la transition la plus intense. Dans l'ensemble, le spectre vibronique de 2-HPH⁺ ressemble très étroitement à celui obtenu pour la 2-aminopyridine protonée [108]. Comme nous le verrons plus loin, ces deux ensembles de transitions intenses et faibles seront attribués à deux minima distincts dans l'état excité de 2-HPH⁺, comme c'est le cas pour la 2-aminopyridine protonée. La bande origine de 2-HPH⁺ est décalé vers le rouge de plus de 1300 cm^{-1} par rapport à la 2-hydroxypyridine neutre [93–96].

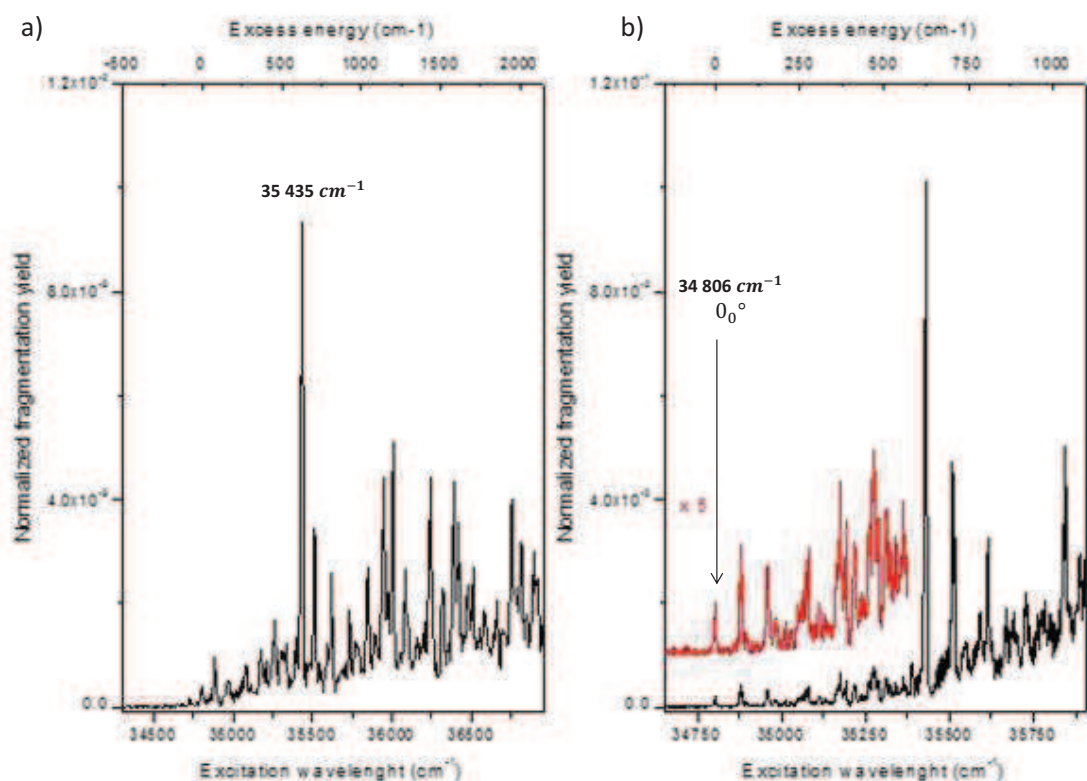


FIGURE C – Spectre de photo-fragmentation de la 2-hydroxypyridine protoné pour le fragment ionique m/z 78. En a), le spectre est enregistré sur une large gamme spectrale avec le laser OPA (résolution de 8 cm^{-1}). En b), la région de faible fréquence a été obtenu avec le laser à colorant (résolution de 0.2 cm^{-1}).

A - 2.3 3-hydroxypyridine protonée : 3-HPH⁺

Le spectre vibronique de 3-HPH⁺, résolu vibrationnellement (figure D.a)), a été obtenu avec le laser OPA depuis $33\,500\text{ cm}^{-1}$ jusqu'à 3000 cm^{-1} plus haut. La fragmentation induite par le laser UV conduit principalement à deux fragments qui sont aussi observés en CID : m/z 68, qui est le principal fragment et correspond à la perte de CO, et m/z 78, qui est dix fois moins intense et correspond à la perte de H₂O, comme observé pour 2-HPH⁺. Une cinétique de fragmentation de $210\text{ }\mu\text{s}$ a été mesurée pour les deux voies de fragmentation et ceci est compatible avec une dissociation dans l'état fondamental suite à une désexcitation par conversion interne.

Comme pour la 2-hydroxypyridine protonée, le spectre vibronique est composé d'un ensemble de transitions intenses commençant à $34\,357\text{ cm}^{-1}$ et plusieurs bandes peu intenses plus loin dans le rouge. Le spectre de meilleure résolution obtenu avec le laser à colorant (figure D.b)) permet de confirmer la position de la première transition de faible intensité, qui se trouve à $33\,814\text{ cm}^{-1}$, soit environ 540 cm^{-1} dans le rouge par rapport

à la première bande intense. Ici encore, les bandes de faibles intensité sont trop décalées vers le rouge pour qu'elles puissent correspondre à une progression de bandes chaudes. Dans l'ensemble, ce spectre vibronique, ressemble étroitement à celui de la 2-HPH⁺, avec deux groupes de transitions, l'un de faible intensité, l'autre d'intensité élevée.

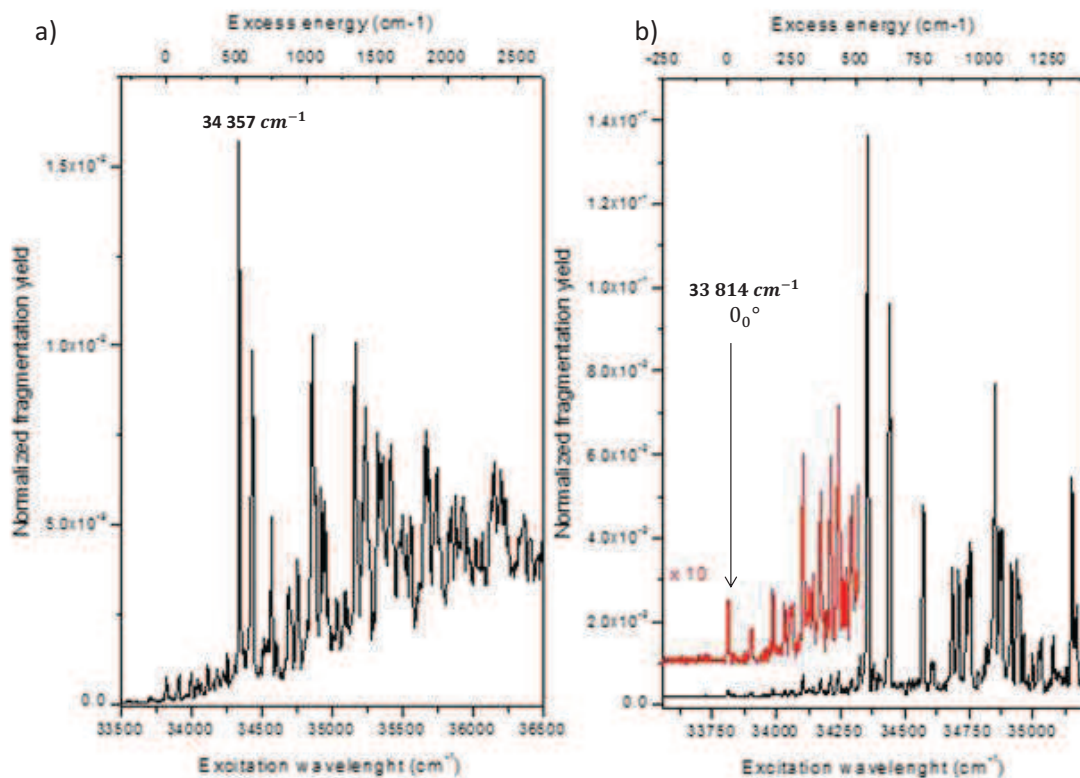


FIGURE D – Spectre de photo-fragmentation de 3-hydroxypyridine protonée pour le fragment ionique m/z 68. En a), le spectre a été obtenu sur une large gamme spectrale avec le laser OPA (résolution de 8 cm^{-1}). En b), domaine des basses fréquences, obtenu avec le laser à colorant (résolution de 0.2 m^{-1}).

Pour le 3-hydroxypyridine protonée, deux isomères (syn et anti) proches en énergie peuvent être présents à une basse température. La spectroscopie UV-UV "Hole Burning" a été utilisée pour discriminer ces deux isomères. La très faible intensité du spectre dans le rouge de la première bande intense étant un obstacle à l'obtention de tout signal de "hole burning" dans cette région spectrale, nous nous sommes donc concentrés sur la zone dans laquelle les transitions plus intenses sont détectées.

Le laser de pompe a tout d'abord été fixé sur la transition à $34\,357\text{ cm}^{-1}$ (fig E a)). La plupart des transitions du spectre vibronique sont alors détectés dans le spectre de hole burning, à l'exception de celle à $34\,686\text{ cm}^{-1}$. Un second spectre de hole burning est donc obtenu en fixant le laser de pompe sur cette fréquence (figure E.b)). Ces deux spectres permettent de reconstituer le spectre de la 3-hydroxypyridine protonée dans son

entier, ce qui indique clairement que, dans cette région spectrale tout du moins, deux conformères seulement contribuent au spectre expérimental

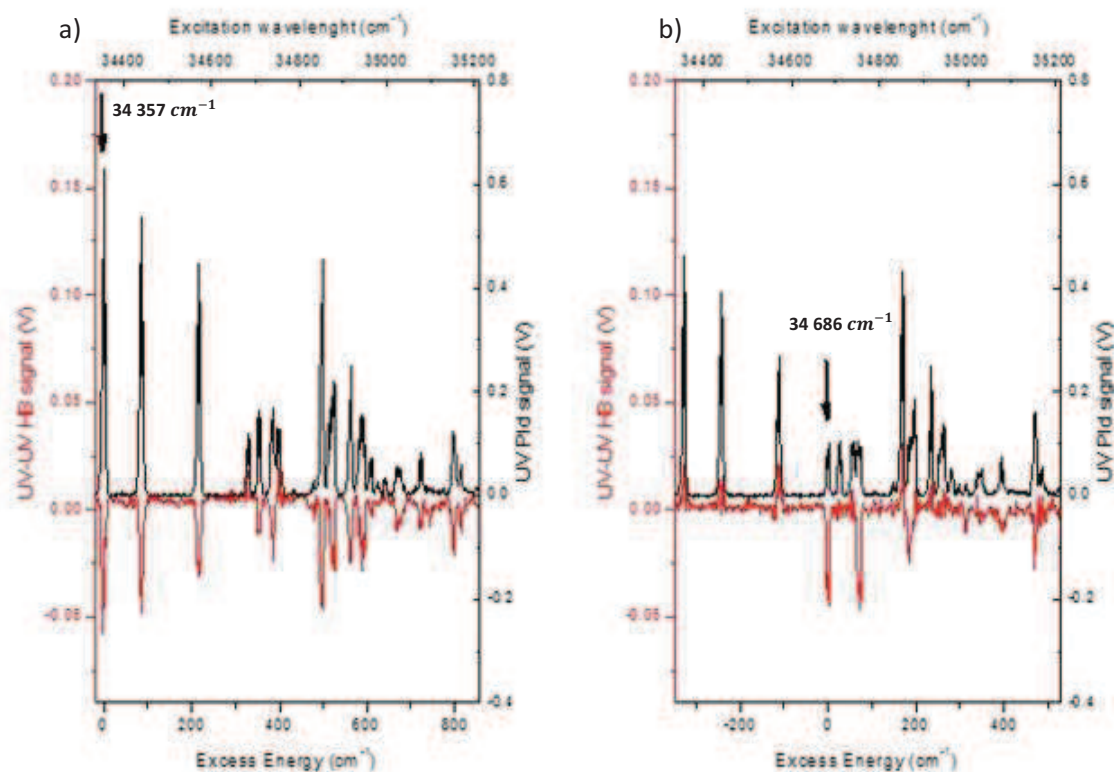


FIGURE E – Spectre UV-UV "hole burning" de 3-hydroxypyridine protonée pour deux fréquences différentes du laser de pompe : $34\,357\text{ cm}^{-1}$ (a) et $34\,686\text{ cm}^{-1}$ (b). Pour chaque courbe, la trace en noir correspond au signal de photo-fragmentation et la trace en rouge correspond au signal hole burning.

A - 2.4 4-hydroxypyridine protonée : 4-HPH⁺

Pour la 4-hydroxypyridine protonée, l'excitation UV conduit à trois fragments : le principal fragment ($m/z\ 68$) correspond à la perte de CO, le second ($m/z\ 78$) correspond à la perte de H₂O et le dernier ($m/z\ 69$), qui est le moins intense correspond à la perte de HCN). La cinétique de fragmentation est de l'ordre de 2.5 ms, ce qui est beaucoup plus long que pour la 2-hydroxypyridine protonée et la 3-hydroxypyridine protonée. Comme pour les autres molécules, une cinétique de fragmentation aussi longue suggère fortement que la dissociation se produit au niveau fondamental après conversion interne.

Le spectre de photo-fragmentation de la 4-hydroxypyridine protonée, enregistré avec le laser OPA (F.a)) est bruité et bien moins structuré que ceux obtenus pour les 2-

et 3-hydroxypyridine protonée. Avec le laser à colorant, seuls quelques pics très fins sont observés avant un pic intense, suivi par la montée d'un fond continu à partir d'environ 40 350 cm^{-1} . La première transition se situe à 39 660 cm^{-1} et doit correspondre à la bande d'origine. Cette transition 0_0^0 est nettement décalée vers le bleu par rapport à celles de la 2- et de la 3-hydroxypyridine protonée. Une première bande vibrationnelle est située à 120 cm^{-1} au-dessus de la bande d'origine tandis que la bande la plus intense apparaît 630 cm^{-1} plus haut en énergie. Ce spectre est clairement différent de ceux obtenus pour la 2- et la 3-hydroxypyridine protonée.

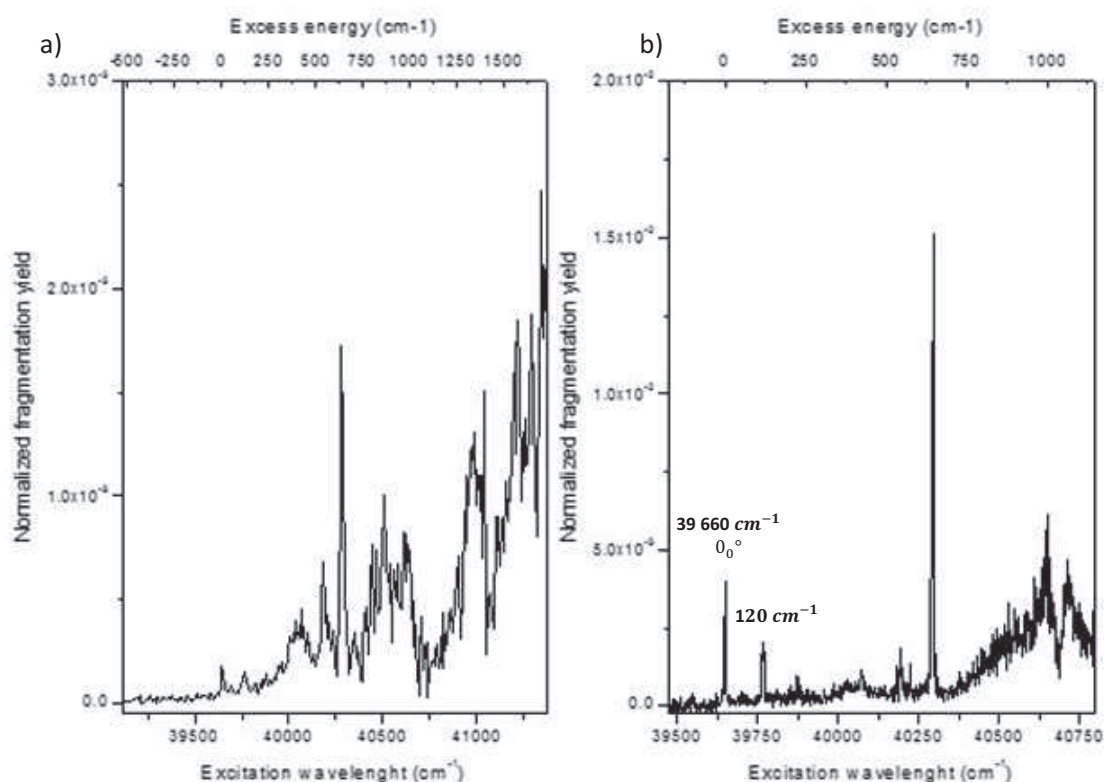


FIGURE F – Spectre de photo-fragmentation de 4-hydroxypyridine protonée moyenné sur les 3 fragments de m/z 78, 69 et 68. En a), le spectre est enregistré sur une large gamme spectrale avec le laser OPA (résolution de 8 cm^{-1}). En b), la région de basse fréquence a été obtenue avec le laser à colorant (résolution de 0.2 cm^{-1}).

A - 3 Interprétation des résultats à l'aide de calculs *ab initio*

A - 3.1 Méthodes de calcul

Des calculs *ab initio* ont été réalisés avec le programme TURBOMOLE (V6.2) (réf 41), en utilisant l'approximation de résolution de l'identité" (RI) pour évaluer les intégrales de répulsion électronique (42). Les géométries d'équilibre des 2-, 3- et 4-hydroxypyridine

protonée a été déterminée, dans l'état fondamental et dans les états excités, au niveau CC2, avec la base double- ζ aug-cc-pVDZ, augmentée de fonctions diffuses (43). Les modes de vibration du fondamental et du premier état excité ont été calculés avec le même niveau de calcul, et l'analyse Franck-Condon a été effectuée avec le logiciel PGOPHER (44).

A - 3.2 Caractérisation des états excités

Comme attendu, le conformère syn est plus stable que le conformère anti de 4.15 kcal/mol pour la 2-hydroxypyridine protonée et de 0.95 kcal/mol pour la 3-hydroxypyridine protonée. Le conformère anti de la 2-hydroxypyridine protonée ne devrait donc pas être peuplé à basse température, tandis que la 3-hydroxypyridine protonée devrait adopter les deux conformations. Puisque les propriétés électroniques calculées sont similaires et partagent les mêmes tendances pour les structures syn et anti de la 3-hydroxypyridine protonée, nous discuterons uniquement les résultats pour la conformère syn. Pour toutes les molécules, la structure de l'état fondamental est plane, et les hydroxypyridines protonées appartiennent au groupe de symétrie Cs. Les énergies verticales des états excités pour les 2-,3- et 4-hydroxypyridine protonées sont reportées dans le tableau A ainsi que les représentations correspondantes des orbitales moléculaires frontières associées. Les premiers états excités de plus basse énergie sont tous de nature $\pi\pi^*$ et n'y en a pas de nature $n_N\pi^*$ puisque la paire d'électrons libres de l'azote pyridinique est engagée dans la liaison avec le proton. L'état $\pi\sigma_{NH}^*$ est calculé à plus de 2 eV au-dessus à l'état $\pi\pi^*$, qui porte la force d'oscillateur pour l'excitation UV. Cet état $\pi\sigma_{NH}^*$ n'est donc pas impliqué dans le processus de désexcitation des hydroxypyridines protonées. Pour la 4-hydroxypyridine protonée, le premier et le second état $\pi\pi^*$ sont presque dégénérés et fortement mélangés, avec plusieurs orbitales impliquées dans la décomposition en orbitales moléculaires de ces états. Dans ces structures planes à l'état fondamental, la paire d'électrons libres du groupe hydroxyle (orbitale p_p) est dans le même plan que les orbitales π^* du cycle pyridine et contribue à la transition $\pi\pi^*$.

Les optimisations de la géométrie du premier état $\pi\pi^*$ ont été effectuées pour les trois hydroxypyridine protonées sans contrainte de symétrie. Dans tous les cas, l'optimisation a convergé vers un état $\pi\pi^*$ plan conservant la symétrie Cs. Cependant, ces structures Cs sont des points selle de la surface d'énergie potentielle avec une fréquence imaginaire d'environ -50/-80 cm^{-1} suivant les molécules. Le mode associé correspond à un mouvement de "papillon" hors-plan du cycle pyridinique. Les structures ont été distordues suivant ce mode afin de s'éloigner de la géométrie de l'état de transition. Ceci a conduit, pour la 2- et la 3-hydroxypyridine protonée, à des géométries légèrement non planes correspondant à une structure préfulvénique, en forme de bateau, dans laquelle, les groupes N_1H et C_4H pointent au-dessus du cycle aromatique (voir figure G). Ces 2 structures adiabatiques ressemblent beaucoup à la structure de l'état excité du N-pyridinium calculée au niveau DFT/CAM-B3LYP/aug-cc-pVDZ par Hansen et al. [114], même si la pyramidalisation de l'azote est moins prononcée dans le cas présent. Ces structures optimisées sont de vrais minima de la surface d'énergie potentielle, sans fréquence imaginaire. Comme on peut le constater dans le tableau B, la transition adiabatique 0_0^0 est seulement 100 cm^{-1} (ou moins) sous la transition des structures Cs.

2-HPH ⁺			3-HPH ⁺		4-HPH ⁺	
Configuration	Energie		Configuration	Energie	Configuration	Energie
$\pi\pi^*$ (A')			$\pi\pi^*$ (A')		$\pi\pi^*$ (A')	
S ₁	4.82			4.59		5.43
(4a''-5a'')			(4a''-5a'')		(3a''-6a'') + (4a''-5a'')	
$\pi\pi^*$ (A')			$\pi\pi^*$ (A')		$\pi\pi^*$ (A')	
S ₂	6.27			5.75		5.58
(4a''-6a'')			(4a''-6a'')		(3a''-5a'')	
$\pi\pi^*$ (A')			$\pi\pi^*$ (A')		$\pi\pi^*$ (A')	
S ₃	7.19			6.72		6.59
(3a''-5a'')			(3a''-5a'')		(4a''-5a'') + (3a''-6a'')	
$\pi\sigma_{NH}^*$ (A'')			$\pi\sigma_{NH}^*$ (A'')		$\pi\pi^*$ (A')	
S ₄	7.28			7.07		7.39
(4a''-27a'')			(4a''-22a'')		(4a''-6a'')	

TABLE A – Configurations électroniques et énergies de transitions verticales (en eV) de la 2-,3- et 4-hydroxypridine protonées (CC2/aug-cc-pVDZ) pour les conformères syn. En gras : la transition portant la force d'oscillateur pour l'excitation UV.

Une si petite différence d'énergie, qui correspond plus ou moins à l'amplitude de la fréquence négative de la structure Cs, est clairement dans la barre d'erreur de la méthode CC2 et l'énergie relative des deux structures, dans l'état excité, doit être considéré avec prudence. Pour la 4-hydroxypridine protonée, l'optimisation de la géométrie suite à une distorsion suivant le mode papillon conduit avec une intersection conique de l'état fondamental 0.3 eV en-dessous de l'énergie de la structure Cs. En ce point, la pyramidalisation au niveau de l'azote protoné est grande, le groupe CH adjacent pointant presque perpendiculairement au cycle. Pour la 4-hydroxypridine protonée, l'accès de la région de Franck-Condon (structure Cs) à l'intersection conique à travers une très faible barrière est cohérente avec l'absence de progression vibrationnelle dans le spectre vibronique.

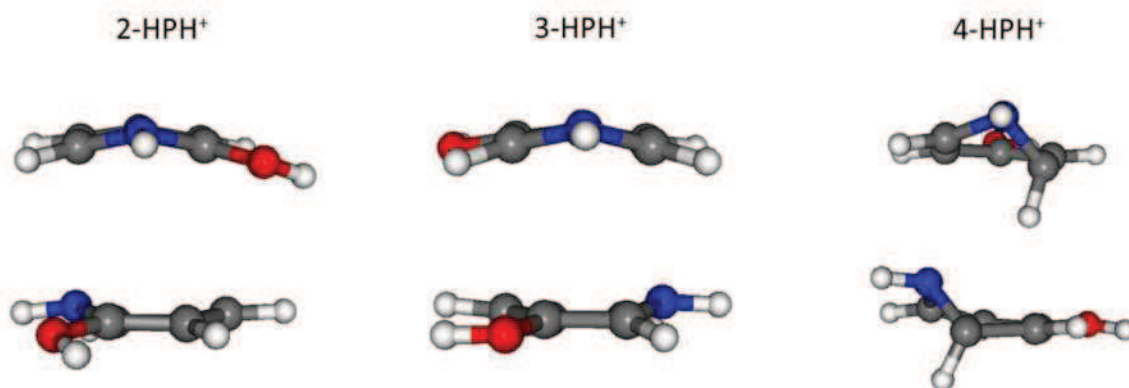


FIGURE G – Structures prefulvéniques optimisées des états excités $\pi\pi^*$ pour la 2-hydroxypyridine protonée et la 3-hydroxypyridine protonée. Pour la molécule de 4-hydroxypyridine protonée, l'optimisation de la géométrie conduit à une intersection conique avec l'état fondamental, point auquel l'optimisation a été arrêtée.

Molécules	Symétrie	0_0^0 calc	0_0^0 exp	Δ (calc-exp)
2-HPH ⁺ Syn	prefulvénique	35 427	34 806	621
	Cs	35 522	35 435	86
3-HPH ⁺ Syn	prefulvénique	34 059	33 814	245
	Cs	34 124	34 357	- 233
3-HPH ⁺ Anti	prefulvénique	34 337	-	
	Cs	34 481	34 686	- 204
4-HPH ⁺	prefulvénique	IC	39 660	
	Cs	40 523	40 297	226

TABLE B – Energie de transition $\pi\pi^*$ expérimental et théorique pour la 2-,3- et 4-hydroxypyridine protonée. Les énergies de transition calculées (CC2/aug-cc-pVDZ) sont corrigées de la différence en énergie de point o entre le fondamental et l'état excité. Toutes les valeurs sont en cm^{-1} .

A - 3.3 Analyse Franck-Condon

Le spectre électronique de la molécule de 4-hydroxypyridine protonée ne sera pas discuté ici car très peu de bandes vibroniques actives sont observées, ce qui empêche l'attribution de la structure dans la surface d'énergie potentielle $\pi\pi^*$. Les spectres vibroniques de la 2- et de la 3-hydroxypyridine protonées présentent deux ensembles de pics étroits avec des intensités très différentes. Les calculs menés sur les états excités révèlent la présence de deux structures proches dans la surface d'énergie potentielle $\pi\pi^*$: une structure adiabatique préfulvénique et une structure de géométrie plane Cs, comme dans l'état fondamental. Cette situation est la même que celle rencontrée pour la 2-aminopyridine protoné [115]. Son spectre électronique a été attribué à la combinaison de deux progressions vibroniques de ces deux minima de la surface d'énergie potentielle qui ont des activités Franck-Condon très différentes. Des transitions intenses ont été calculées pour la structure Cs qui correspond à la bande origine pour le mode dans le plan (a') du cycle pyridinique, tandis que les bandes de faibles intensités décalées vers le rouge sont attribuées au minimum adiabatique avec une progression de modes hors-plan.

Pour la 2- et la 3-hydroxypyridine protonées, nous avons calculé les spectres vibroniques simulés du minimum, et leur intensité est dix fois plus faible que celles pour les structures Cs. Pour la 3-hydroxypyridine protonée, la présence de deux conformères et l'impossibilité d'effectuer la spectroscopie Hole Burning dans la région des basses fréquences rend l'attribution très hypothétique. La comparaison entre les spectres expérimentaux et théoriques est donc reportée pour la 2-hydroxypyridine protonée sur la figure H. La bande origine calculée a une très faible intensité. Une progression du mode papillon (ν_1 (a')) calculé à 90 cm^{-1} à partir de la bande origine avec un maximum à 3-4 quanta, est en bon accord avec la progression expérimentale de 76 cm^{-1} observée expérimentalement. La même progression ν_1 construite à partir des modes Franck-Condon ν_4 , ν_5 , ν_7 , ν_{13} et ν_{15} a été calculée. Bien qu'une attribution fiable des transitions de faible intensité soit difficile, il est clair d'après ces simulations que les transitions intenses observées expérimentalement 630 cm^{-1} au-dessus de la bande origine ne peuvent pas être attribuées à ce minimum adiabatique.

Sur la figure I, le spectre vibronique expérimental de la 2-hydroxypyridine protonée est comparé aux simulations (Franck-Condon) de la structure Cs, avec son origine fixée sur la bande vibronique la plus intense du spectre expérimental ($35\,435\text{ cm}^{-1}$). Les bandes origines calculée et expérimentale diffèrent de moins de 100 cm^{-1} (table B), et les transitions calculées ont une intensité qui est plus grande d'un ordre de grandeur que celles pour la structure préfulvénique. Les modes actifs "dans le plan" de la structure Cs sont calculés à 402 , 503 , 804 , et 958 cm^{-1} et correspondent respectivement au pliage CO, 6a-b, mode 1 et 12b suivant les notations de Wilson. Ces modes actifs coïncident bien avec les transitions vibroniques intenses du spectre expérimental. Cependant, d'autres modes manquent clairement dans cette simulation, notamment les deux premières transitions à $+76\text{ cm}^{-1}$ et 183 cm^{-1} de la bande à $35\,435\text{ cm}^{-1}$. L'absence des modes actifs de basse fréquence de la structure Cs laisse suggérer que les bandes manquantes pourraient venir d'un couplage vibronique entre la structure Cs et la structure préfulvénique. Si on ajoute aux simulations Franck-Condon de la structure Cs, les simulations pour la structure préfulvénique avec 4 quanta du mode "papillon", on constate qu'il y a un bon accord avec le spectre expérimental.

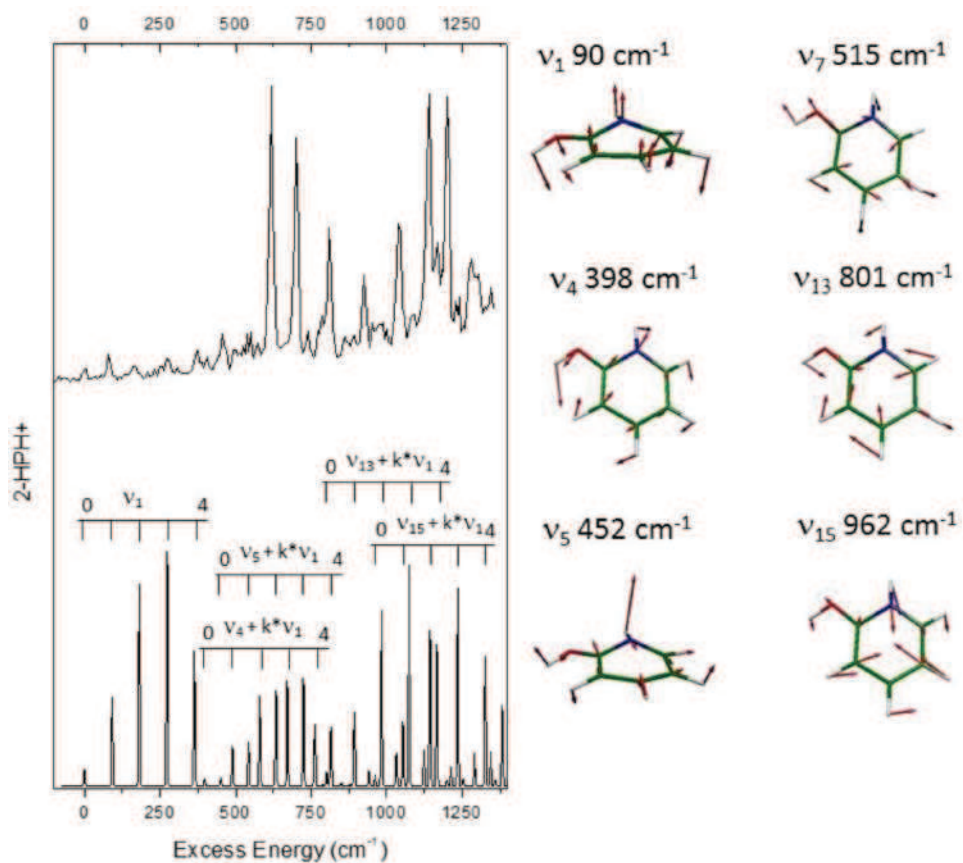


FIGURE H – En haut : spectre expérimental. En bas : spectre Franck-Condon simulé pour la structure prefulvénique de la molécule 2-hydroxypridine protonée.

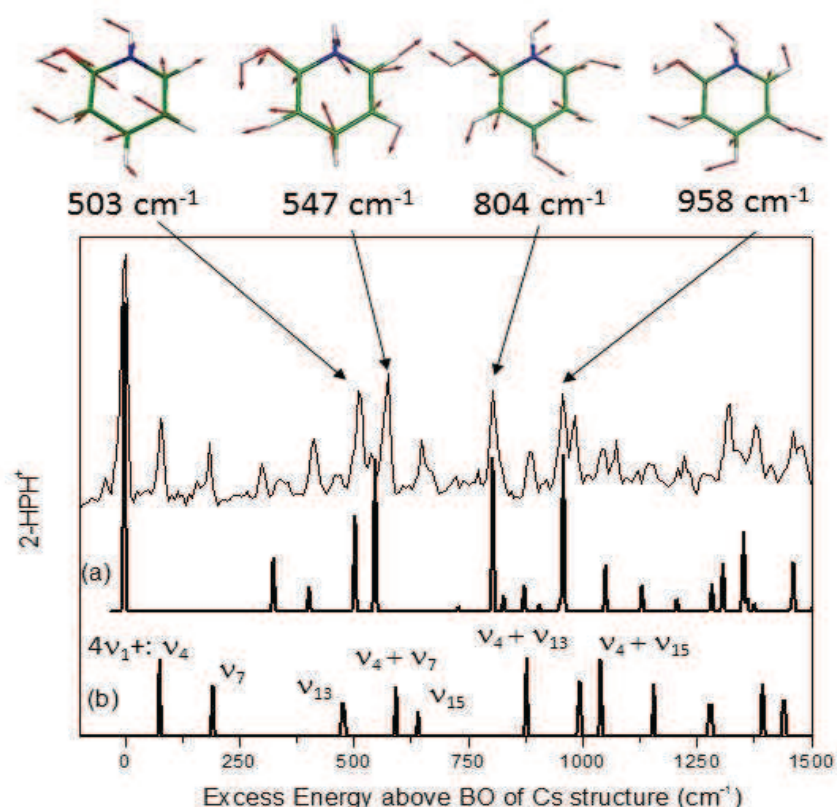


FIGURE I – En haut : Spectre expérimental de la 2-hydroxypyridine protonée. En a) : Spectre Franck-Condon simulé pour la structure Cs de la 2-hydroxypyridine protonée. En b) : Spectre Franck-Condon simulé pour la structure préfulvénique avec 4 quanta du mode papillon (v_1).

5) Conclusion

Nous avons étudié les processus de photo-fragmentation pour les hydroxypyridine protonées en combinant des études expérimentales et théoriques. Bien que les hydroxypyridine protonée ortho, meta et para semblent être des modèles simples qui imitent les briques moléculaires constituant de plus grands composés biologiquement pertinents, la compréhension de leur spectroscopie vibronique est plus complexe que prévu. Ces trois molécules présentent des spectres bien résolus, avec une forte influence de la position du groupe hydroxyle. En particulier, la bande origine de la 4-hydroxypyridine protonée est significativement décalée vers le bleu par rapport à celles de la 2- et la 3-hydroxypyridine protonée. La spectroscopie UV-UV hole burning réalisée pour la 3-hydroxypyridine protonée révèle clairement la présence de deux conformères (syn et anti) à basse température. Dans tous les cas, la faible intensité de la bande origine, associée à la progression des modes basse fréquence révèlent un changement de géométrie dans l'état excité, comme prédit par la structure préfulvénique trouvée par les calculs au niveau CC2/aug-cc-pVDZ. Les transitions vibroniques intenses sont attribuées à la structure planaire Cs, qui conduit à des intensités dix fois plus grandes. Pour les structures Cs et adiabatique, les bandes origines calculées en incluant les corrections

d'énergie de point zéro, sont en bon accord avec les données expérimentales, dans une marge d'erreur absolue de 500 cm^{-1} . Finalement, une forte interaction vibronique entre les structures préfulvéniques et planaires dans l'état excité semble rendre compte des spectres expérimentaux.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Ma thèse a porté sur le développement d'un dispositif permettant l'étude des effets des rayonnements ionisants sur des molécules d'intérêt biologique via une approche originale et encore jamais proposée. Cette approche combine les avantages des approches "*top-down*" et "*bottom-up*" : étude en phase condensée de biomolécules pertinentes (tels que des brins d'ADN) et compréhension des processus à l'échelle moléculaire par l'utilisation de techniques d'analyses en phase gazeuse. Le but final est de caractériser les dommages induits par les rayonnements ionisants à l'échelle moléculaire.

Pour cela, j'ai développé et caractérisé une nouvelle source de mise en phase gazeuse pour laquelle le transfert des molécules d'intérêts biologiques de la phase liquide vers la phase gazeuse doit être le plus "doux" possible afin de préserver au mieux la structure dite native. En effet, c'est cette structure native, donc celle adoptée en phase liquide, qui est pertinente puisque c'est celle qui est adoptée par la molécule dans le milieu biologique. Si nous irradiions les biomolécules en solution et que le transfert vers la phase gazeuse des fragments induits par l'irradiation permet en grande partie de conserver la structure qu'ils adoptent en solution, alors cela nous permet d'étudier de manière réaliste les effets d'endommagements. Le développement et la caractérisation de cette source a représenté la plus grande partie de mon travail de thèse.

Tout l'intérêt de cette source de mise en phase gazeuse repose donc sur son processus de désorption qualifié de "doux". Pour valider la douceur de la désorption, je me suis intéressé à des molécules fragiles telles que des complexes non-covalents. J'ai travaillé notamment avec le complexe non-covalent formé par la Vancomycine et un tripeptide modélisant son récepteur membranaire. J'ai réussi à conserver intact ce complexe (initialement en phase liquide) en phase gazeuse après lui avoir fait subir une désorption laser. Ceci constitue un résultat fort et confirme que notre processus de mise en phase gazeuse est "doux". Cette réussite peut s'expliquer pour plusieurs raisons. D'une part, nos biomolécules sont désorbées directement sous vide (contrairement à l'électrospray), ce qui réduit fortement l'interaction avec le gaz résiduel. D'autre part, nous produisons des états de charges relativement faibles qui permettent de réduire la répulsion électrostatique et donc de préserver au mieux la structure adoptée en phase condensée. Ces caractéristiques nous permettent d'affirmer que notre processus de mise en phase gazeuse est "doux" et que nous dénaturons potentiellement moins la structure que toutes les sources de mise en phase gazeuse existantes.

Après avoir validé la "douceur" du processus de mise en phase gazeuse, la suite

de mon travail a porté sur l'amélioration du système de visualisation qui permet de suivre la micro-gouttelette tout au long de son trajet jusqu'à sa désorption. Initialement, il n'y avait pas de système de visualisation dans la chambre intermédiaire (voir à la sous-section 2.2.2 du chapitre 2, figure 2.10). Donc, la recherche de la micro-gouttelette dans la chambre principale était longue (quelques dizaines de minutes) et fastidieuse. Depuis l'ajout du système de visualisation "en croisé" dans la chambre intermédiaire, la recherche de la micro-gouttelette est devenue plus simple et plus rapide puisque dorénavant quelques minutes suffisent à la trouver. D'ailleurs, ce système de visualisation "en croisé" est actuellement développé dans la nouvelle version de la source (voir à la sous-section 4.2.1 du chapitre 4, figure 4.1) au niveau des trois écorceurs.

En parallèle, j'ai amélioré la résolution en masse de notre temps de vol. Au début de ma thèse, on utilisait une extraction retardée pour réduire la dispersion en énergie inhérente au processus de désorption. Je rappelle que cette désorption peut produire des ions ayant un même rapport masse/charge avec des vitesses différentes. Ceci a pour conséquence d'élargir les pics d'un spectre de masse. Avec l'extraction retardée, en retardant la tension dans la zone d'extraction, on peut faire en sorte que les ions les plus lents rattrapent les plus rapides et donc diminuer la largeur des pics. Cependant, notre résolution en masse avec cette extraction retardée était limitée à $R = 115$ (pour une masse de l'ordre du kilodaltons). Cette résolution est loin d'être suffisante pour étudier des processus de fragmentation induits par irradiation. De plus, des simulations réalisées avec le logiciel SIMION 8.0, ont permis de dire que l'extraction retardée n'était pas assez efficace pour compenser la distribution de vitesse initiale et donc d'obtenir une résolution en masse suffisante pour nos études d'endommagements sur des molécules d'intérêts biologiques. Pour améliorer cette résolution en masse, nous avons donc ajouté un piège de Paul situé quelques millimètres devant l'endroit où se produit la désorption des micro-gouttelettes. Grâce à ce dernier, nous avons amélioré la résolution en masse d'un facteur 5. Ce dispositif, qui est toujours en cours de caractérisation, nous permettra d'obtenir une résolution en masse de l'ordre de l'u.m.a. pour des molécules de quelques kilodaltons, ce qui sera donc amplement suffisant pour étudier les effets de fragmentation induits par irradiation.

Actuellement, nous sommes en train d'effectuer d'autres améliorations sur l'expérience comme l'ajout d'une chambre intermédiaire dans la source. Cette chambre nous permettra de faire fonctionner le dispensateur à pression atmosphérique, pression à laquelle il est conçu pour fonctionner. Nous passons d'une source constituée de deux écorceurs à une source constituée de trois écorceurs. Par ailleurs, la longueur du TOF a été allongée d'un mètre afin d'ajouter un tube de Gauss. Ce dernier permettra d'accélérer suffisamment les ions en sortie du piège de Paul pour améliorer la résolution et la détection. Une fois que toutes ces améliorations auront été faites et qu'un signal d'ions sera de nouveau obtenu avec une molécule type telle que la bradykinine, nous allons coupler une plateforme d'irradiation par des ions simplement chargés de basses énergies à notre expérience de mise en phase gazeuse de grandes biomolécules par désorption laser non-résonnante sur micro-gouttelettes. La plateforme d'irradiation sera couplée à la partie *source* de l'expérience pour pouvoir irradier les biomolécules dans leur environnement biologique, donc en amont de la désorption. En effet, pour faire apparaître des effets indirects, il est nécessaire d'irradier les biomolécules en solution, puisque les phénomènes chimiques radicalaires sont intimement liés à l'environnement. Nous allons donc irradier par des ions simplement chargés, possédant une énergie cinétique de quelques dizaines de keV, des micro-gouttelettes

contenant les biomolécules dont nous voulons étudier les dommages. Les ions créeront, par radiolyse dans la couche superficielle (premières centaines de nanomètres) du solvant, une cascade de particules secondaires (électrons solvatés et radicaux). Par la suite, les radicaux libres vont réagir avec les molécules présentes en solution dans la zone non-irradiée. C'est cette partie de chimie radicalaire liée aux effets indirects que notre dispositif permettra d'étudier, pour la toute première fois, en étant exempt de toute autre contribution.

Et enfin, j'ai décrit en **annexe**, les expériences effectuées au CLUPS, à Orsay, durant ma deuxième année de thèse. Nous avons étudié la photo-fragmentation de la 2-,3- et 4- hydroxypyridine. Cette étude s'inscrit dans le cadre de l'approche "*bottom-up*" étant donné la petite taille de ces systèmes (comparés à des brins d'ADN) et l'absence d'environnement. Le choix de ces systèmes a été motivé par le fait que des dérivés d'hydroxypyridine sont des photo-sensibilisateurs synthétiques et peuvent contribuer aux dommages causés par le rayonnement solaire. On peut alors tenter d'extrapoler les données de cette étude à des systèmes jouant un rôle dans le vivant. De plus, l'étude des effets indirects d'irradiations sur ces mêmes molécules, pourraient nous servir de systèmes modèles pour mieux comprendre les origines de ce type de dommages.

BIBLIOGRAPHIES

Bibliographie

- [1] Rontgen. *Science*, 3 :227, **1896**.
- [2] Unscear : Sources of ionizing radiation. **2008**.
- [3] T.A. [Trikalinos, T Terasawa, S Ip, G Raman, and J Lau. Particle beam radiation therapies for cancer. *Agency for Healthcare Research and Quality (US)*, **2009**.
- [4] Reflet de la physique. 43.
- [5] W.H Bragg and M.A Elder. The influence of the velocity of the alpha particle upon the stopping power of the substance through which it passes. *PHILOSOPHICAL MAGAZINE*, 13 :507, **1907**.
- [6] P Sigmund. Stopping of heavy ions,. *Springer Tracts in ModernPhysics*, **2004**.
- [7] J.Dudouet. Thèse : Etude de la fragmentation du ^{12}C sur cible mince à 95 mev/a pour la hadronthérapie. *Université de Caen*, **2014**.
- [8] H Bethe. Zur theorie des durchgangs scheneller korpuskularstrahlen durch materie. *annalen der physic*, 397 :325, **1930**.
- [9] H.W Barkas. Nuclear research emulsions. *Academic New York*, 1, **1963**.
- [10] D Schardt and T Elsässer. Heavy ion tumor therapy : Physical and radiobiological benefits. *REVIEWS OF MODERN PHYSICS*, 82 :383, **2010**.
- [11] J.M.Denis. **2003**.
- [12] Rapport du comité scientifique des nations unies pour l'étude des effets des rayonnements ionisants. **2010**.
- [13] F Crick and J Watson. Molecular structure of nucleic acids : A structure for deoxy-ribose nucleic acid. *Nature*, 171 :737, **1953**.
- [14] R. Bensasson, E.J. Land, and T.G. Truscott. Light and ionizing radiation : generation of excited states and radicals. in excited states and free radicals in biology and medecine. *Oxford University Press*, page 249, **1993**.
- [15] I.Kassis, S.Harapanhalli, and S.James Adelstein. Strand breaks in plasmid dna after positional changes of auger electron-emitting Iodine-125 : Direct compared to indirect effects. *Radiat. Res.*, 152 :530, **1999**.
- [16] W Wien. *Physik*, 39 :528, **1912**.
- [17] Fayard B, Touati A, Abel F, Hervé du Penhoat M.A, Despiney-Bailly I, Gobert F, Ricouland M, L'hoir A, Politis M, F, Hill M, A, Stevens D, L, Sabatier L, Sage E, Goodhead D, T, and A. Chetioui. Cell inactivation and doublestrandbreaks : The role of core ionizations, as probed by ultrasoft x rays. *Radiation Research*, 157 :128, **2002**.
- [18] T.Phoutier. Mise en évidence de cassures double brin de l'adn induites par irradiation de kératinocytes humains en microfaisceau alpha. **2009**.

- [19] B.Fayard, A.Touati, F.Abel, M.A.H.du Penhoat, I. Despiney-Bailly, F.Gobert, M.Ricoul, A.L'hoir, M.F.Politis, and M.A.Hill et al. Cell inactivation and double-strand breaks : The role of core ionizations, as probed by ultrasoft x rays. *Radiat. Res.*, 157 :128, **2002**.
- [20] K.M.Prise, C.H.L.Pullar, and B.D.Michael. *Carcinogenesis*, 20 :905, **1999**.
- [21] B Boudaïffa, M.A Huels, P Cloutier, D Hunting, and L Sanche. Resonant formation of dna strand breaks by low-energy (3 to 20 ev) electrons. *Science*, 287 :1658, **2000**.
- [22] S Lacombe and C Le Sech. Advances in radiation biology : Radiosensitization in dna and living cells. *Surface Science*, 603 :1953, **2009**.
- [23] V.Cobut et al. *Radiat. Phys. Chem.*, 51 :229, **1998**.
- [24] F Martin, P Burrow, Z Cai, P Cloutier, D Hunting, and L Sanche. Dna strand breaks induced by 0-4 ev electrons : The role of shape resonances. *Physical Review Letters*, 93 :068101, **2004**.
- [25] H.Nikjoo, P. O'Neill, M.Terrissol, and col. *Radiation Research*, 156 :557, **2001**.
- [26] J.Vries, R.Hoekstra, R.Morgenstern, and T.Schlatholter. *Physical Review Letters*, 91, **2003**.
- [27] X.Pan and L.Sanche. *Physical Review Letters*, 94, **2005**.
- [28] H.Abdoul Carime, M.A.Huels, F.Brüning, E.Illenberger, and L.Sanche. Dissociative electron attachment to gas phase 5 bromouracil. *The journal of chemical physics*, 113 :2517, **2000**.
- [29] S.Denifl, S.Ptasinska, M.Cingel, S.Matejcik, P.Scheier, and T.D.Mark. Electron attachment to the dna bases thymine and cytosine. *Chemical Physics Letters*, 337 :74, **2003**.
- [30] T Schlathölter, F Alvarado, S Bari, and R Hoekstra. Ion-induced ionization and fragmentation of dna building blocks. *Physica Scripta*, 73 :113, **2006**.
- [31] J.de Vries, R.Hoekstra, R.Morgenstern, and T.Schlatholter. Ionization and fragmentation modes of nucleobases after collisions with multiply charged ions. *Physica Scripta*, 110 :336, **2004**.
- [32] D.M.Close. *Journal chemical physics*, 108 :10376, **2004**.
- [33] C.O Colson, B Besler, and M.D Sevilla. *J.Phys.Chem*, 97 :13852, **1993**.
- [34] B.Liu, S.B.Nielsen, P.Hvelplund, H.Zettergren, H.Cederquist, B.Manil, and B.Huber. Collision-induced dissociation of hydrated adenosine monophosphate nucleotide ions : Protection of the ion in water nanoclusters. *Physical Review Letters*, 97 :4, **2006**.
- [35] T.D Märk and G.H Dunn. Electron impact ionization. *Springer*, **1985**.
- [36] Ja Loo. Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 16 :1, **1997**.
- [37] S.K Kim, W Lee, and D.R Herschbach. Cluster beam chemistry hydration of nucleic acid bases, ionization potentials of hydrated adenine and thymine. *Journal of Physical Chemistry*, 100 :7933, **1996**.
- [38] J.B Fenn. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246 :4926, **1989**.
- [39] M Mann, C.K Meng, and J Fenn. *Proceedings of 36th Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topic*, page 1207, **1988**.

- [40] P Kobarle. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 35 :804, **2000**.
- [41] G Schmelzeisen-Redeker, L Bütfering, and F.W Röllgen. Desolvation of ions and molecules in thermospray mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 90 :139, **1989**.
- [42] B.A Thomson and J.V Iribarne. Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *The Journal of Chemical Physics*, 71 :4451, **1979**.
- [43] M Wilm and M Mann. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *American Chemical Society*, 68 :1, **1996**.
- [44] M Karas and F Hillekamp. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, 60 :2299, **1988**.
- [45] K Tanaka. The origin of macromolecule ionization by laser irradiation (nobel lecture). *Angewandte Chemie-International*, 42 :3860, **2003**.
- [46] M. L Vestal, P Juhasz, and Martin S. A. Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 9 :1044, **1995**.
- [47] G.A Czerwieniec, S.C Russell, C.B Lebrilla, K.R. Coffee, V Riot, P.T Steele, M Frank, and E.E Gard. Improved sensitivity and mass range in time-of-flight bio-aerosol mass spectrometry using an electrostatic ion guide. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16 :1866, **2005**.
- [48] Site : www.nationalmaglab.org. .
- [49] P Terrier, J Tortajada, G Zin, and W Buchmann. Noncovalent complexes between dna and basic polypeptides or polyamines by maldi-tof. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18 :1977, **2007**.
- [50] S Madler, E.B Erba, and R Zenobi. Maldi-tof mass spectrometry for studying noncovalent complexes of biomolecules. in *Applications of Maldi-Tof Spectroscopy*, 331 :1, **2013**.
- [51] G Bolbach. Matrix-assisted laser desorption/ionization analysis of non-covalent complexes : Fundamentals and applications. *Current Pharmaceutical Design*, 11 :25352557, **2005**.
- [52] W Zhang, S Niu, and B.T Chait. Exploring infrared wavelength matrix-assisted laser desorption/ionization of proteins with delayed-extraction time-of-flight mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 9 :879, **1998**.
- [53] W Kleinekofort, A Pfenninger, T Plomer, C Griesinger, and B Brutschy. Observation of noncovalent complexes using laser-induced liquid beam ionization/desorption. *International journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 156 :195, **1996**.
- [54] F Mafune, Y Takeda, T Nagata, and T Kondow. Formation and ejection of cluster ions from a liquid beam of aniline ethanol solution by laser photoionization. *Chemical Physics Letters*, 199 :615, **1992**.
- [55] B Abel, A Charvat, U Diederichsen, M Faubel, B Girmannnc, J Niemeyer, and A Zeeck. Applications, features, and mechanistic aspects of liquid water beam desorption mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 243 :177, **2005**.
- [56] W Kleinekofort, M Schweitzer, J.W Engels, and B Brutschy. Analysis of doublestranded oligonucleotides by laser-induced liquid beam mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 163 :L1–L4, **1997**.

- [57] M Gluckmann and M Karas. 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, **1999**.
- [58] N Morgner, H.D Barth, and B Brutschy. A new way to detect noncovalently bonded complexes of biomolecules from liquid micro-droplets by laser mass spectrometry. *Australian Journal of Chemistry*, 59 :109, **2006**.
- [59] M Cernescu, T Stark, E Kalden, C Kurz, K Leuner, T Deller, M Göbel, GP Eckert, and B Brutschy. Laser-induced liquid bead ion desorption mass spectrometry : an approach to precisely monitor the oligomerization of the amyloid peptide. *Analytical Chemistry*, 84 :5276, **2012**.
- [60] J Hoffmann, T.L Schmidt, A Heckel, and B Brutschy. Probing the limits of liquid droplet laser desorption mass spectrometry in the analysis of oligonucleotides and nucleic acids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23 :2176, **2009**.
- [61] E Rapp. Atmospheric pressure free liquid infrared maldi mass spectrometry : Toward a combined esi/maldi-liquid chromatography interface. *Analytical Chemistry*, 81 :443, **2009**.
- [62] J Hoffman. Studying the stoichiometries of membrane proteins by mass spectrometry : microbial rhodopsins and a potassium ion channel. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12 :3480, **2010**.
- [63] N Morgner, T Klainschroth, H.D Barth, B Lugwig, and B Brutschy. A novel approach to analyse membrane proteins by laser mass spectrometry : From protein subunits to the integral complex. *Journal American Society*, 18 :1429, **2007**.
- [64] F Mager, L Sokolova, J Lintzel, and B Brutschy. Lilbid-mass spectrometry of the mitochondrial preprotein translocase tom. *Journal of Physics Condensed Matter*, 22 :1, **2010**.
- [65] N Morgner. Bindings sites of the viral rna element tar and of tar mutants for various peptide ligands, probed with lilbid : A new laser mass spectrometry. *Journal American Society Mass Spectrometry*, 19 :1600, **2008**.
- [66] www.microdrop.de. .
- [67] L.W Zilch, J.T Maze, J.W Smith, and M.F Jarrold. Freezing, fragmentation, and charge separation in sonic sprayed water droplets. *International Journal of Mass Spectrometry*, 283 :191, **2009**.
- [68] Focsá C, B.Chazallon, and J.L.Destombes. Resonant desorption of ice with a tunable linbo3 optical parametric oscillator. *Surface Science*, 528 :189, **2003**.
- [69] F Sobott, W Kleinekofort, and B Brutschy. Cation selectivity of natural and synthetic ionophores probed with laser-induced liquid beam mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 69 :3587, **1997**.
- [70] B Abel, A Charvat, U Diederichsen, M Faubel, B Girmann, J Niemeyer, and A Zeeck. Applications, features, and mechanistic aspects of liquid water beam desorption mass spectrometry. *International journal of Mass Spectrometry*, 243 :177, **2005**.
- [71] J.J. Thomson. A new method of investigating the positive rays. 16 :120, **1912**.
- [72] A.J Dempster. A new method of positive ray analysis. *Physica*, 4 :316, **1918**.
- [73] F.W Aston. The possibility of separating isotopes. *Journal of the chemical society*, 115 :472, **1919**.
- [74] F.M. Penning. The spark discharge in low pressure between coaxial cylinders in an axial magnet field. *Physica*, 3 :873, **1936**.

- [75] W.C Wiley and L.C McLaren. Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution. *The review of scientific instruments*, 26 :1150, **1955**.
- [76] B.A. Mamyrin, V.I. Karataev, D.V. Shmikk, and Zagulin V.A. The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution. *Sov.Phys.*, 64 :82, **1973**.
- [77] W.C. Wiley and L.H McLaren. Time of flight mass spectrometer with improved resolution. *The review of scientific instruments*, 26 :1150, **1955**.
- [78] Site : www.photonis.com.
- [79] Thèse : Étude structurale de biomolécules de grandes tailles en phase gazeuse par spectroscopie irmpd, spectrométrie de mobilité ionique et dissociation induite par attachement d'électron ecd. **2014**.
- [80] W Paul and H Steinwedel. A new mass spectrometer without magnetic field. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section a a Journal of Physical Sciences*, 8 :448, **1953**.
- [81] R.E March and R.J Hughes. Quadrupole storage mass spectrometry. *New York : Wiley Interscience*, **1989**.
- [82] E Raymond and R.E March. An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry. *JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY*, 32 :351, **1997**.
- [83] K.R Jonscher and J.R Yates. The quadrupole ion trap mass spectrometer a small solution to a big challenge. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 244 :1, **1997**.
- [84] E.Alizadeh and L.Sanche. Low-energy-electron interactions with dna approaching cellular conditions with atmospheric experiments. *The european physical journal D*, 68 :97, **2014**.
- [85] R Geller. Electron cyclotron resonance ion sources and ecr plasmas. *London : Institute of Physics Publishing*, **1996**.
- [86] A Girard. The quadrumafios ecris : presentation and analysis of results. *Review of scientific instruments*, 65 :1714, **1996**.
- [87] A.L Sobolewski, W Domcke, C Dedonder-Lardeux, and C Jouvet. Excited-state hydrogen detachment and hydrogen transfer driven by repulsive states : A new paradigm for nonradiative decay in aromatic biomolecules. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 4 :1093, **2002**.
- [88] G.M. Roberts, C.A. Williams, H Yu, Chatterley, J.D. Young, S Ullrich, and V.G. Stavros. Probing ultrafast dynamics in photoexcited pyrrole : timescales for mediated h-atom elimination. *Faraday Discuss*, 163 :95, **2013**.
- [89] M.N.R. Ashfold, B. Cronin, A.L. Devine, R.N. Dixon, and M.G.D. Nix. The role of excited states in the photodissociation of heteroaromatic molecules. *Science*, 312 :1637, **2006**.
- [90] G.G GomezTejedor and M.C Fuss. Radiation damage in biomolecular systems. *Springer*, **2012**.
- [91] D Picconi, F.J.A Ferrer, R Improta, A Lami, and F Santoro. Quantum-classical effective-modes dynamics in 9h-adenine. a quadratic vibronic coupling model. *Faraday Discuss*, 163 :223, **2013**.
- [92] C.Y. Switzer, S.E. Moroney, and S.A Benner. Enzymatic recognition of the base pair between isocytidine and isoguanosine. *Science*, 32 :10489, **1993**.
- [93] D Lee, S.J Baek, K.-W. Choi, Y.S Choi, and S.K Kim. Resonantly-enhanced two-photon ionization and mass-analysed threshold ionization (mati) spectroscopy of 2-hydroxypyridine. *Korean Chem. Soc.*, 23 :277, **2002**.

- [94] K Sakota, S Tokuhara, and H Sekiya. Dispersed fluorescence spectroscopy of 2-hydroxypyridine and its cyclically hydrogen-bonded water clusters in the gas phase : an examination of occurrence of excited-state proton transfer. *Chem. Phys. Lett.*, 448 :159, **2007**.
- [95] M.R Nimlos, D.F Kelley, and E.R Bernstein. Spectroscopy, structure, and proton dynamics of 2-hydroxypyridine and its clusters with water and ammonia. *J. Phys. Chem.*, 93 :643, **1989**.
- [96] Y Matsuda, T Ebata, and N Mikami. Ir-uv double-resonance spectroscopic study of 2-hydroxypyridine and its hydrogen-bonded clusters in supersonic jets. *J. Phys. Chem. A*, 105 :3475, **2001**.
- [97] M Meuwly and A Müller. Energetics, dynamics and infrared spectra of the dna base-pair analogue 2-pyridone 2-hydroxypyridine. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 5 :2663, **2003**.
- [98] G.T Wondrak, M.J Roberts, D Cervantes-Laurean, M.K Jacobson, and E.L Jacobson. Proteins of the extracellular matrix are sensitizers of photo-oxidative stress in human skin cells. *J. Invest. Dermatol.*, 121 :578, **2003**.
- [99] G.T Wondrak, M.J Roberts, M.K Jacobson, and E.L Jacobson. 3-hydroxypyridine chromophores are endogenous sensitizers of photooxidative stress in human skin cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 :300009, **2004**.
- [100] Y.S Wang, C.H Tsai, Y.T Lee, H.C Chang, J.C Jiang, O Asvany, S Schlemmer, and D Gerlich. Investigations of protonated and deprotonated water clusters using a low-temperature 22-pole ion trap. *J. Phys. Chem. A*, 107 :4217, **2003**.
- [101] N Esteves-López, C Dedonder-Lardeux, and C Jouvét. Excited state of protonated benzene and toluene. *J. Chem. Phys.*, 143 :074303, **2015**.
- [102] C.S Hansen, S.J Blanksby, N Chalyavi, E.J Bieske, J.R Reimers, and A.J Trevitt. Ultraviolet photodissociation action spectroscopy of the n-pyridinium cation. *J. Chem. Phys.*, 142 :4014301, **2015**.
- [103] M.F Rode, A.L Sobolewski, C Dedonder, C Jouvét, and O Dopfer. Computational study on the photophysics of protonated benzene. *J. Phys. Chem. A*, 113 :5865, **2009**.
- [104] M Chachisvilis and A Zewail. Femtosecond dynamics of pyridine in the condensed phase : Valence isomerization by conical intersections. *J. Phys. Chem. A*, 103 :7408, **1999**.
- [105] D Zhong, W.-G Diao, T.M Bernhardt, S.D Feyter, J.D Roberts, and A.H Zewail. Femtosecond dynamics of valence-bond isomers of azines : transition states and conical intersections. *Chem. Phys. Lett.*, 298 :129, **1998**.
- [106] A Sobolewski and W Domcke. Photophysically relevant potential energy functions of low-lying singlet states of benzene, pyridine and pyrazine : an ab initio study. *Chem. Phys. Lett.*, 180 :381, **1991**.
- [107] K Grove, R.A King, and U Burger. Photo-rearrangement of n-substituted pyridinium and meta-alkoxypyridinium ions. *J. Mol. Struct.*, 807 :25, **2007**.
- [108] M Broquier, S Soorkia, C Dedonder-Lardeux, C Jouvét, P Theulé, and G Grégoire. Twisted intramolecular charge transfer in protonated amino pyridine. *J. Phys. Chem. A*, 120 :3797, **2016**.
- [109] S Soorkia, M Broquier, and G Grégoire. Multiscale excited state lifetimes of protonated dimethyl aminopyridines. *Phys.Chem.Chem.Phys.*, 18 :23785, **2016**.

- [110] G Féraud, M Broquier, C Dedonder, C Juvet, G Grégoire, and S Soorkia. Excited state dynamics of protonated phenylalanine and tyrosine : Photo-induced reactions following electronic excitation. *J. Phys. Chem. A*, 119 :5914, **2015**.
- [111] M Broquier, S Soorkia, and G Grégoire. A comprehensive study of cold protonated tyramine : Uv photodissociation experiments and ab initio calculations. *Phys.Chem.Chem.Phys.*, 17 :25854, **2015**.
- [112] X.-B Wang and L.-S Wang. Development of a low-temperature photoelectron spectroscopy instrument using an electrospray ion source and a cryogenically controlled ion trap. *Rev. Sci. Instrum*, 79 :073108, **2008**.
- [113] H. Kang, G Feraud, C. Dedonder-Lardeux, and C Juvet. New method for double-resonance spectroscopy in a cold quadrupole ion trap and its application to uv–uv hole-burning spectroscopy of protonated adenine dimer. *J. Phys. Chem. Lett.*, 5 :2760, **2014**.
- [114] C.S. Hansen, S.J. Blanksby, N. Chalyavi, E.J. Bieske, J.R. Reimers, and A.J. Trevitt. Ultraviolet photodissociation action spectroscopy of the n-pyridinium cation. *J. Chem. Phys.*, 142 :014301, **2015**.
- [115] M. Broquier, S. Soorkia, C. Dedonder-Lardeux, C. Juvet, P. Theulé, and G Grégoire. Twisted intramolecular charge transfer in protonated amino pyridine. *J. Chem. Phys.*, 120 :3797, **2016**.

Résumé

Dans cette thèse, nous avons développé et caractérisé un nouveau type de source de mise en phase gazeuse de biomolécules qui repose sur une désorption laser non résonnante sur des microgouttelettes directement sous vide. Ce dispositif nous permettra à terme d'ouvrir une voie d'étude originale pour appréhender les effets des rayonnements ionisants sur des molécules organiques d'un point de vue physique.

Nous présenterons en détail ce dispositif avec lequel nous avons réussi à transférer sous vide, de façon non destructive, des biomolécules et des complexes non-covalents dans une gamme de masse de l'ordre du kDa et à les identifier par spectrométrie de masse par temps de vol. Nous montrerons notamment les défis techniques qu'il a fallu relever pour permettre le transfert des microgouttelettes sous vide et comment par simulation du spectromètre, nous sommes parvenus à optimiser fortement les paramètres de collection des espèces moléculaires désorbées et la résolution en masse de notre système, en remplaçant, dans la zone de désorption, l'extraction électrostatique à potentiels retardés par un piège électrostatique quadripolaire.

Nous exposerons enfin la façon dont ce dispositif, couplé à une plateforme d'irradiation d'ions simplement chargés possédant une énergie de l'ordre du keV, nous permettra de caractériser à une échelle moléculaire l'endommagement lié à des mécanismes de chimie radicalaire radio-induits.

Mots clés : biomolécules en phase gazeuse, désorption laser, microgouttelettes, chimie radicalaire, spectrométrie de masse, effets d'irradiation

Abstract

In this thesis, we have developed and characterized a new type of gas phase source of biomolecules which based on non-resonant laser desorption on microdroplets directly under vacuum. This device will eventually allow us to open an original way to study the effects of ionizing radiation on organic molecules from a physical point of view.

We will present in detail this device with which we transferred with success under vacuum, in a non-destructively way, biomolecules and non-covalent complexes in a mass range of the order of kDa and we assigned them with time-of-flight mass spectrometry. We will show in particular the technical challenges that we had to overcome in order to allow the transfer of microdroplets under vacuum and how by simulation of the spectrometer, we have been able to highly optimize the collection parameters of the desorbed molecular species and the mass resolution of our system, by replacing, in the desorption zone, delayed extraction by a quadrupole electrostatic trap.

Finally, we will describe the way in which this device, coupled to a simply charged ion irradiation platform with an energy of the order of the keV, will enable us to characterize on a molecular scale the damage due to radio-induced radical chemistry mechanisms.

Keywords : biomolecules in gas phase, laser desorption, microdroplets, radical chemistry, mass spectrometry, irradiation effects