

École doctorale n° 146 : Sciences, Technologies, Santé Galilée

# Laboratoire de Physique des Lasers

## THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

### l'Université Paris-XIII dénommée Université Sorbonne Paris Nord

Spécialité “Physique”

*présentée et soutenue publiquement par*

**Ali Beydoun**

le 24 Novembre 2022

**Contributions au développement d'une nouvelle technique de mise en phase gazeuse pour l'étude de la structure et l'endommagement de biomolécules**

#### **Jury**

<b>Jean-Yves Chesnel</b>	Professeur des universités, Université de Caen	Rapporteur
<b>Jean-Philippe Champeaux</b>	Maître de conférences HDR, Université Paul Sabatier	Rapporteur
<b>Sophie Carles</b>	Maître de conférences, Université de Rennes 1	Examinatrice
<b>Luc Museur</b>	Professeur des universités, USPN	Président du jury
<b>Nicolas Nieuwjaer</b>	Maître de conférences HDR, USPN	Encadrant
<b>Bruno Manil</b>	Professeur des universités, USPN	Directeur de thèse



# Laboratoire de Physique des Lasers

## THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

**l'Université Paris-XIII dénommée**

**Université Sorbonne Paris Nord**

**Spécialité “Physique”**

*présentée et soutenue publiquement par*

**Ali Beydoun**

le 24 Novembre 2022

**Contributions au développement d'une nouvelle technique de mise en phase gazeuse pour l'étude de la structure et l'endommagement de biomolécules**

### **Jury**

<b>Jean-Yves Chesnel</b>	Professeur des universités, Université de Caen	Rapporteur
<b>Jean-Philippe Champeaux</b>	Maître de conférences HDR, Université Paul Sabatier	Rapporteur
<b>Sophie Carles</b>	Maître de conférences, Université de Rennes 1	Examinatrice
<b>Luc Museur</b>	Professeur des universités, USPN	Président du jury
<b>Nicolas Nieuwjaer</b>	Maître de conférences HDR, USPN	Encadrant
<b>Bruno Manil</b>	Professeur des universités, USPN	Directeur de thèse



*À mes parents,  
à Françoise*



# Remerciements

C'est avec une grande joie et un immense plaisir que je rédige ces quelques mots pour dire merci à tous ceux qui m'ont aidé, soutenu et poussé vers l'avant pour réussir ma thèse.

Je commence par remercier vivement l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie très sincèrement le professeur Luc Museur qui a présidé le jury. Je remercie particulièrement Jean-Yves Chesnel et Jean-Philippe Champeaux d'avoir accompli le rôle de rapporteurs avec rigueur et application. Un grand merci à Sophie Carles d'avoir accepté d'examiner ma thèse.

Ces années de travaux de thèse au sein de l'équipe BioMolécules et Spectroscopie n'auraient jamais vu le jour sans le soutien de mes collègues de l'équipe BMS. Tout d'abord, je souhaiterais remercier mon directeur de thèse Bruno Manil qui m'a accordé une grande confiance pendant ma thèse. Merci Bruno pour cette confiance et merci d'avoir su me rassurer et me motiver pour avancer dans les moments les plus difficiles. Au delà de ton encadrement scientifique, je te remercie d'avoir toujours su créer une belle ambiance de travail au sein de l'équipe. Je remercie également Charles Desfrancois d'avoir lu et corrigé une partie de ma thèse et pour ses conseils pertinents pendant les séances d'escalade. J'espère qu'on pourra continuer à grimper ensemble!

Je remercie Frederic Lecomte qui m'a encadré en début de la thèse et qui m'a lancé sur l'expérience quand je suis arrivé au sein de l'équipe. Avec Frederic j'ai partagé le même bureau pendant 4 années agréables. Je te remercie pour ta gentillesse et ta générosité en caféine. Je te remercie aussi de m'avoir motivé pour le footing de midi. Grâce à toi j'ai pu faire un semi-marathon cette année et peut-être que l'on fera un marathon ensemble l'année prochaine. J'adresse mes remerciements et ma gratitude à Nicolas Nieuwjaer qui a parfaitement encadré cette thèse. Merci Nicolas d'avoir relu et corrigé l'intégrité de ma thèse, merci pour ton soutien sans cesse; je te remercie également pour la pression dont j'avais besoin pour la dernière ligne droite. Tes conseils m'ont permis d'achever ce travail et c'était un plaisir de travailler avec toi. Pour finir, je souhaite une bonne continuation à Ayoub Badri, le nouveau doctorant qui a rejoint l'équipe à la fin de ma thèse.

Je souhaite également remercier Sylvain Queyreau, qui est l'une des personnes que j'ai eu le plaisir de connaître durant ma thèse. Merci pour ton soutien fort et sincère. Je tiens à remercier la directrice de notre laboratoire, Anne Amy-klein, qui était toujours présente pour écouter et aider les doctorants sur tous les sujets surtout

pendant et après la période de pandémie.

Je remercie chaleureusement mon compatriote et ami Dr. Saab pour son soutien durant la période pré-soutenance. Je remercie très sincèrement pour la même cause et pour pleines d'autres raisons Tatiana et Yara avec qui j'ai partagé de bons moments au sein et en dehors du laboratoire. Je vous souhaite beaucoup de courage pour la fin de vos thèses et je reviendrai prochainement vous applaudir avec fierté.

Et il y a aussi beaucoup d'autres collègues qui avaient quitté le laboratoire avant la fin de ma thèse mais qui sont toujours près de moi. Je remercie Christelle, Lucas, Sarah et Louis. Je n'oublierai pas Kaci et Ilhem Kechadi qui m'ont honorés par leur présence le jour J avec leur petit prince Ethan.

Je remercie mes amis proches Ali, Khalil, Elise et mon cher Basile. Votre amitié et votre soutien comptent pour moi. Je souhaite remercier énormément ma plus chère amie Massilia qui a rédigé sa thèse en même temps que moi. On a beaucoup de souvenirs de cette période avec des hauts et des bas mais nous y sommes arrivés tous les deux. Je te remercie de m'avoir toujours boosté vers l'avant. Je suis fier de toi et je te souhaite le meilleur pour l'avenir.

Il y a plusieurs années, je suis arrivé de Beyrouth pour continuer mes études en France. Pendant toutes ces années j'ai vécu chez une personne très chère pour moi. Françoise, je te remercie pour tout le soutien que tu m'as apporté pendant toutes ses années et pour ton affection dont je suis profondément reconnaissable. Je remercie également Chantal et Ernst pour leur gentillesse et leur présence le jour de ma soutenance comme pour les occasions antérieures. Vous êtes tous une deuxième famille pour moi.

Le merci infini va pour ma famille et mes parents qui m'ont aidé à réaliser ce rêve, celui de venir finir mes études en France, mon deuxième pays que je remercie également. Je sais que vous êtes fier de moi et c'est aussi une grande joie pour moi de vous voir toujours heureux.

# Table des matières

<b>Table des matières</b>	<b>ii</b>
<b>Remerciements</b>	<b>v</b>
<b>Introduction</b>	<b>xi</b>
<b>1 Biomolécules en phase gazeuse</b>	<b>1</b>
1.1 Systèmes d'intérêt biologique . . . . .	1
1.1.1 Acides aminés et protéines . . . . .	2
1.1.2 Objets thérapeutiques : exemple des nanoparticules . . . . .	6
1.1.3 Acide nucléique (base ADN, base ARN) . . . . .	7
1.2 Intérêt des études en phase gazeuse . . . . .	10
1.2.1 Lien entre structure et fonction biologique . . . . .	10
1.2.2 Structure native d'une biomolécule . . . . .	10
1.2.3 Contrôle de la stœchiométrie . . . . .	12
1.3 Techniques de mise en phase gazeuse de biomolécules . . . . .	13
1.3.1 Mise en phase gazeuse par chauffage . . . . .	14
1.3.2 Electrospray . . . . .	15
1.3.3 MALDI . . . . .	17
1.3.4 Désorption laser sur jet liquide sous vide . . . . .	19
1.4 Spectrométrie de masse : Aspects historiques . . . . .	23
1.4.1 Structure d'un spectromètre de masse . . . . .	24
1.4.2 Principe de fonctionnement de la spectrométrie de masse à temps de vol . . . . .	28
1.4.3 Spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR) . . . . .	30
1.5 Conclusion . . . . .	32
<b>2 Expérience de désorption</b>	<b>35</b>
2.1 Description de l'expérience de désorption laser sur microgouttelettes . . . . .	35
2.1.1 Génération des microgouttelettes . . . . .	39
2.1.2 Système d'imagerie <i>in situ</i> pour la visualisation des microgouttelettes . . . . .	41
2.1.3 Laser de désorption : laser OPO . . . . .	45
2.1.4 Extraction et détection . . . . .	48
2.2 Résultats expérimentaux (caractérisation de l'ancien dispositif) . . . . .	49
2.2.1 Mise en phase gazeuse d'un nonapeptide . . . . .	49

2.2.2	Mise en phase gazeuse d'un complexe non covalent . . . . .	50
2.2.3	Amélioration de la résolution en masse . . . . .	51
2.2.4	Influence de l'énergie laser sur les espèces désorbées . . . . .	52
2.3	Développements instrumentaux . . . . .	55
2.3.1	Objectifs et contraintes . . . . .	55
2.3.2	Nouveau générateur d'impulsions . . . . .	57
2.3.3	Conception d'un écorceur "maison" . . . . .	59
2.3.4	Montage avec deux écorceurs inversés . . . . .	62
2.4	Couplage avec un piège de Paul . . . . .	66
2.4.1	Piège ionique (piège de Paul) . . . . .	66
2.5	Conclusion . . . . .	67
<b>3</b>	<b>Simulation du phénomène de désorption</b> . . . . .	<b>69</b>
3.1	Introduction . . . . .	69
3.2	Processus de désorption laser . . . . .	69
3.3	Simulations SIMION . . . . .	72
3.3.1	Introduction . . . . .	72
3.3.2	Modélisation de la géométrie du spectromètre de masse . . . . .	73
3.3.3	Programmation sous SIMION : extraction retardée . . . . .	74
3.4	Résultats des simulations . . . . .	78
3.4.1	Système et paramètres de simulation . . . . .	78
3.4.2	Transmission du spectromètre de masse . . . . .	79
3.4.3	Distribution de temps de vol en fonction du délai d'extraction . . . . .	87
3.4.4	Effet de la durée d'extraction . . . . .	92
3.5	Conclusion . . . . .	94
<b>4</b>	<b>Études structurales par IRMPD</b> . . . . .	<b>97</b>
4.1	Introduction . . . . .	97
4.2	Spectroscopie IRMPD . . . . .	98
4.2.1	Principe . . . . .	98
4.2.2	Dispositif expérimental de l'IRMPD par le laser à électrons libres . . . . .	101
4.2.3	Laser à électrons libres . . . . .	102
4.3	Méthodologie de recherche des structures moléculaires . . . . .	104
4.3.1	Exploration de la surface d'énergie potentielle (PES) . . . . .	105
4.3.2	Champs de force . . . . .	106
4.3.3	Méthodes semi-empiriques : Asutin Model (AM1) . . . . .	107
4.3.4	Théorie de la fonctionnelle de la densité : DFT . . . . .	108
4.4	Études structurales de complexes organo-métalliques . . . . .	110
4.4.1	Motivations et choix des systèmes . . . . .	110
4.4.2	Spectres IRMPD de $[M^{3+}(Acac^-)_2(AcacH)]^{+1}$ , M = Al, Fe ou Ru . . . . .	111
4.4.3	Spectres IRMPD de $[M^{3+}(Acac^-)_2]^{+1}$ , M = Al, Fe . . . . .	117
4.4.4	Spectres IRMPD de $[M^{3+}(Acac^-)_5]^{+1}$ , M = Al, Fe . . . . .	119
4.5	Études structurales de nanoagrégats d'or protégés par des ligands . . . . .	123
4.5.1	Introduction . . . . .	123
4.5.2	Etude structurale de nano-agrégats Au-TriPhénylPhosphine . . . . .	125
4.5.3	Complexe or-glutathion (Au-GS) . . . . .	131

4.6	conclusion . . . . .	136
<b>5</b>	<b>Complexes d'inclusion en phase gazeuse</b>	<b>139</b>
5.1	Spectrométrie de mobilité ionique . . . . .	140
5.1.1	Approche historique et théorie de la mobilité ionique . . . . .	140
5.1.2	Dispositif expérimental à l'ILM . . . . .	144
5.1.3	Calcul des sections efficaces de collision . . . . .	145
5.2	Sections efficaces de complexes cage moléculaire - principe actif . . . . .	146
5.2.1	Motivations . . . . .	146
5.2.2	Résultats pour le complexe $\beta$ -cyclodextrine + paracétamol . . . . .	148
5.2.3	Résultats pour le complexe $\beta$ -cyclodextrine + acide salicylique . . . . .	150
5.3	Etude structurale par IRMPD . . . . .	150
5.3.1	Spectroscopie IRMPD pour le complexe $\beta$ -cyclodextrine + paracétamol . . . . .	152
5.3.2	Spectroscopie IRMPD pour le complexe $\beta$ -cyclodextrine + acide salicylique . . . . .	156
5.4	Perspectives d'étude de complexes d'inclusion . . . . .	158
5.4.1	Complexe (2 :1) entre la $\beta$ -cyclodextrine et l'acide salicylique doublement déprotoné ( $m/z = 1202$ ) . . . . .	158
5.4.2	Recherche conformationnelle par une approche de DFTB . . . . .	158
5.5	Conclusion . . . . .	158
	<b>Conclusion générale</b>	<b>161</b>
<b>A</b>	<b>Perspectives : Irradiation des biomolécules et Endommagement</b>	<b>165</b>
A.1	Effets des radiations ionisantes sur le vivant . . . . .	165
A.2	Endommagement : effets directs et effets indirects . . . . .	166
A.3	Irradiation des biomolécules sous vide par des ions de faible énergie . . . . .	168
A.4	Source plasma d'irradiation de type magnétron . . . . .	171
A.5	Fonctionnement de notre source d'irradiation . . . . .	172
A.6	Couplage du système d'optique ionique à la source d'irradiation . . . . .	174
	<b>Bibliographie</b>	<b>192</b>



# Introduction

Une biomolécule est une molécule présentant un intérêt biologique et qui est soit naturellement présente dans les organismes vivants, où elle participe à son métabolisme et son entretien, soit qui peut être synthétisée dans un but thérapeutique. Cette fonction biologique s'exprime au travers d'une conformation moléculaire stable qu'il est nécessaire de caractériser pour comprendre son action ou de produire pour induire son effet. Dans le cas de la production de médicaments, la modification ou la perte de la structure du produit peut ainsi nuire à son efficacité ou engendrer la formation d'autres espèces potentiellement dangereuses. La détermination de cette conformation devient alors essentielle pour comprendre sa fonction associée. Cette détermination peut être réalisée grâce à une cristallographie aux rayons X ou par RMN (résonance magnétique nucléaire), qui ont toutes deux leurs avantages et leurs limitations.

Bien que les méthodes de diffraction des rayons X permettent de déterminer la structure à haute résolution, elles nécessitent que la molécule en question soit cristallisée, ce qui devient vite complexe pour les grosses biomolécules qui possèdent beaucoup d'interactions internes : acides, basiques, polaires, non polaires et présentent des forces répulsives pouvant modifier la conformation que la molécule adopterait en solution. Quant à elles, les techniques de RMN permettent de surmonter certains de ces inconvénients dans la mesure où l'on peut examiner les molécules dans des environnements plus natifs, bien que cela soit limité aux molécules relativement plus petites. En outre, les mesures par RMN étant par nature lentes, elles ne peuvent déterminer que la conformation moyenne adoptée par la molécule en solution. L'une des limitations de cette technique est due à la complexité des analyses des spectres lorsque la taille des systèmes augmente, ainsi la RMN est limitée aux protéines inférieures à 35 kDa. Une autre limitation vient de la nécessité d'utiliser une solution de grande concentration (mM) et donc une grande quantité de produit (2 à 50 mg). Ainsi comme aucune de ces deux méthodes de détermination, que l'on peut caractériser de *top-down*, n'apparaît idéale pour identifier les propriétés physico-chimiques à une échelle nanoscopique, des approches contraires *bottom-up* peuvent être envisagées.

Le développement de nouvelles sources d'ionisation douces dites «**Soft Ionization**» telles que l'electrospray [1] et le MALDI [2] qui permettent la mise en phase gazeuse de biomolécules de grande taille, et la combinaison de la spectrométrie de masse, des pièges ioniques et de la spectroscopie laser, fournissent de nouvelles méthodes plus avantageuses par rapport aux techniques classiques pour interroger les conformations individuelles des macromolécules. Bien entendu, l'une des questions clés dans l'uti-

lisation de toutes ces sources dans la recherche structurale est la relation entre la structure en phase gazeuse et celle de la molécule dans son environnement natif (en phase condensée) où elle remplit sa fonction [3–5].

C'est dans ce contexte scientifique qui vise le développement et l'amélioration des techniques de mise en phase gazeuse que cette thèse trouve sa place. Mon travail a porté principalement sur le développement instrumental d'une nouvelle technique de mise en phase gazeuse de biomolécules par désorption laser sur microgouttelettes sous vide. Elle a été inspirée de celle développée par l'équipe de Brutschy à Francfort [6] et par celle d'Abel à Göttingen [7]. Son importance réside dans le fait qu'elle regroupe les avantages des autres techniques de mise en phase gazeuse citées ci-dessus, mais qu'elle devrait également permettre d'étudier l'endommagement des molécules d'intérêt biologique à l'échelle moléculaire par l'irradiation des gouttelettes contenant ces biomolécules avec des ions de faible énergie.

Le plan de ce manuscrit se décompose en cinq chapitres. Le **chapitre 1** est une introduction sur l'intérêt des études de systèmes biomoléculaires en phase gazeuse. Il commence par une brève présentation de systèmes d'intérêts biologiques de tailles différentes (de quelques dizaines à plusieurs milliers d'atomes). Ensuite, je présenterai les avantages de notre choix d'étudier les structures de biomolécules en phase gazeuse par rapport aux autres techniques utilisées en phase condensée. Je décrirai le principe de fonctionnement des sources d'ionisation les plus communément utilisées pour la mise en phase gazeuse de grandes biomolécules (l'électrospray et le MALDI), ainsi que celui de la désorption laser sur jet liquide. La dernière section de ce chapitre est dédiée à la spectrométrie de masse couplée à une source d'ionisation. Je donnerai alors l'exemple d'un spectromètre de masse par temps de vol, tel que celui que nous utilisons sur notre dispositif expérimental.

Le **chapitre 2** porte sur le développement expérimental d'une source originale et unique en France pour la mise en phase gazeuse de biomolécules par une technique de désorption laser sur microgouttelettes. Une présentation détaillée du dispositif dans sa première version est discutée dans ce chapitre. Ensuite, de nombreux tests de développements instrumentaux et d'optimisation de cette source sont présentés. Ces travaux ont comme objectif de converger vers une nouvelle version du dispositif expérimental qui soit opérationnel pour des études d'endommagement de biomolécules par irradiation. Cette modification dans le schéma expérimental permettra de générer des gouttelettes micrométriques contenant les biomolécules à partir de la pression atmosphérique et donc d'utiliser l'eau comme solvant. Ce point nécessite un changement dans le diagramme de pompage différentiel ainsi que la conception d'écorceurs de géométries particulières pour le guidage des gouttelettes sous vide. Les résultats ainsi que les contraintes engendrées par ces modifications seront discutés. Une perspective de géométrie plus compacte est proposée à la fin de ce chapitre.

Le **chapitre 3** porte sur les simulations numériques réalisées avec le logiciel SIMION et destinées à l'optimisation des paramètres expérimentaux permettant l'extraction et la détection des espèces désorbées. Plus précisément, nous mettons au

point dans ce chapitre l'effet d'un dispositif d'extraction retardée utilisé dans notre spectromètre de masse pour mieux comprendre le processus de désorption. Je présente le fonctionnement de l'extraction retardée, son effet sur la transmission du spectromètre de masse et son importance pour la compréhension des caractéristiques des espèces désorbées (distribution d'énergie et directions d'éjection).

Dans le **chapitre 4**, je présenterai les études structurales réalisées sur des complexes organo-métalliques (complexe entre un ou plusieurs atome(s) comme Fe, Al ou Ru lié(s) à quelques ligands d'acétylacétonates) et de plus gros systèmes comme les nano-agrégats d'or (complexe entre un cœur d'or composé de dix à onze atomes et des ligands de triphénylphosphine ou de glutathion). Ces systèmes sont utilisés de plus en plus fréquemment en imagerie et comme radio sensibilisateurs pour optimiser les techniques de traitement anti-tumoral par radiothérapie. Les études structurales sont réalisées par spectroscopie IRMPD à l'aide des lasers à électrons libres de CLIO (Centre Laser Infrarouge d'Orsay) en France et à FELIX (Free-Electron Lasers for Infrared eXperiments) au Pays-Bas. Après une introduction sur la spectroscopie d'action IRMPD et une description du fonctionnement de ces expériences, j'explique ensuite brièvement la méthodologie suivie pour les calculs des spectres IR en dynamique moléculaire. Je termine par les discussions et les comparaisons entre les spectres expérimentaux et les spectres simulés.

Le **chapitre 5** est consacré à des études structurales de complexes d'inclusion entre des macromolécules et des principes actifs. Les deux systèmes présentés ici sont les complexes entre la  $\beta$ -cyclodextrine et des principes actifs tels que le paracétamol ou l'acide salicylique. Ces complexes présentent un intérêt pour la recherche de traces de médicaments dans l'eau potable par exemple, mais les cyclodextrines possèdent également de nombreuses autres applications du fait de leurs capacités à modifier les caractéristiques physiques, chimiques ou biologiques des molécules qu'elles encapsulent. Dans ce chapitre je présente premièrement la technique de spectrométrie de mobilité ionique, ainsi que le dispositif expérimental de l'ILM (Institut Lumière Matière) sur lequel nous avons réalisé des mesures de sections efficaces de collision sur ces systèmes. La deuxième partie du chapitre contient les résultats des études structurales menées par comparaison entre les calculs de fréquence au niveau B3LYP/6-31+G(d,p) et les spectres expérimentaux obtenus par IRMPD réalisée à CLIO et à FELIX.

Enfin, je décris dans une annexe les perspectives d'endommagement de biomolécules pour les études des effets indirects liés à l'irradiation par faisceau d'ions. Ces études seraient rendues possibles par le couplage entre la source de micro-gouttelettes que j'ai décrite dans le chapitre 2 et une source d'irradiation commerciale.



# Chapitre 1

## Intérêts des études de biomolécules en phase gazeuse

### 1.1 Systèmes d'intérêt biologique

Une biomolécule est une molécule naturellement présente dans un organisme vivant et qui participe à son métabolisme et à son entretien. Il existe une multitude de biomolécules (glucides, lipides, protéines, ADN ...) ayant chacune un rôle bien défini dans les processus physico-chimiques permettant le développement et la survie de l'organisme. Ces molécules possèdent des tailles différentes, qui peuvent varier de quelques dizaines d'atomes comme les acides aminés, à plusieurs centaines de milliers d'atomes pour les plus grandes protéines (c'est le cas par exemple pour la titine représentée sur la figure (1.1) qui est la plus grande protéine connue chez l'être humain avec environ 30 000 acides aminés), et atteindre des dizaines de milliards d'atomes pour les chromosomes humains.

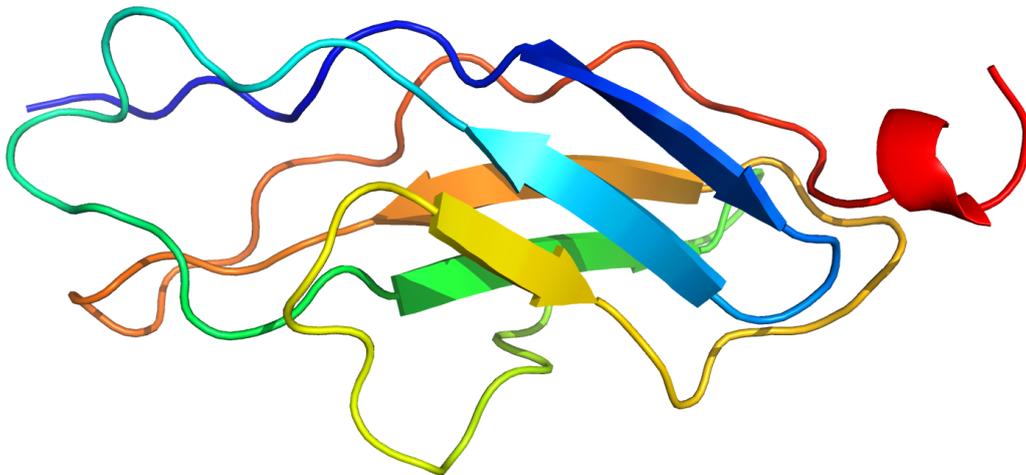


FIGURE 1.1 – Structure de la titine de myocarde humain obtenue par Résonance Magnétique Nucléaire (tirée de la PDB 1BPV).

Les structures des biomolécules sont ainsi extrêmement variées permettant une large expression de diverses fonctions biologiques, malgré le fait qu'elles ne soient constituées que de peu d'éléments chimiques, qui sont généralement le carbone (C), l'hydrogène (H), l'oxygène (O), l'azote (N), le phosphore (P) et le soufre (S). Dans cette thèse, l'objectif de nos recherches est donc d'étudier ce lien structure/fonction en déterminant la structure de certaines biomolécules ou de systèmes moléculaire d'intérêt biologique telles que des nanoparticules fonctionnalisées pour l'imagerie ou la thérapie. Un second objectif à plus long terme sera aussi d'étudier l'endommagement de biomolécules sous l'effet de rayonnements ionisants. Je vais maintenant présenter, dans ce chapitre introductif, les éléments de base des systèmes d'intérêts biologiques qui ont fait l'objet de mes travaux.

### 1.1.1 Acides aminés et protéines

#### Nature chimique d'un acide aminé

Les acides aminés sont de petites molécules organiques qui sont les éléments constitutifs des protéines. Un acide aminé (figure 1.2) est un élément organique avec une structure chimique de type  $H_2N - C_\alpha(R) - COOH$ , où l'atome de carbone  $C_\alpha$  se lie à un groupe amine ( $-NH_2$ ), un groupe acide carboxylique ( $-COOH$ ), un atome d'hydrogène ( $-H$ ) et le groupe ou la chaîne latérale spécifique ( $-R$ ). La nature du groupe R caractérise les différents acides aminés. Ainsi, on dénombre 20 acides aminés (figure 1.3) qui sont désignés chacun par un code, composé d'une lettre ou de trois lettres, selon la définition de l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).

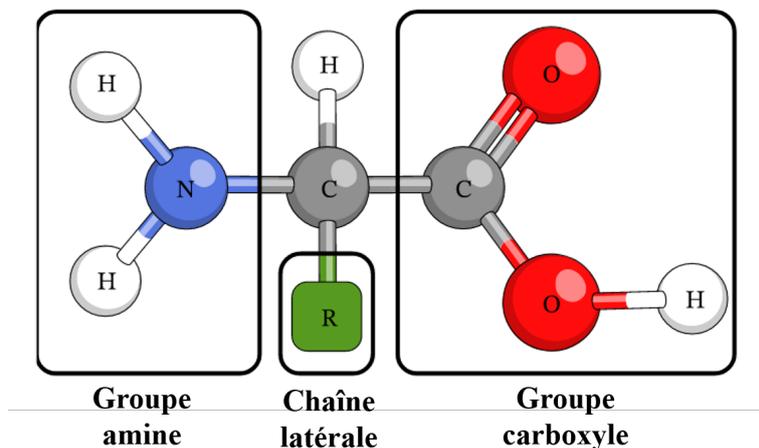


FIGURE 1.2 – La structure d'un acide aminé.

Le plus souvent, le classement des acides aminés se fait en fonction de la position du groupe amine par rapport au groupe carboxyle, c'est-à-dire suivant le nombre d'atomes de carbone séparant les deux groupes. On distingue les acides  $\alpha$ -aminés,  $\beta$ -aminés ou  $\gamma$ -aminés, qui possèdent respectivement un, deux ou trois atome(s) de carbone(s) entre les deux groupes fonctionnels. Les vingt acides aminés naturels les

plus courants et qui constituent les éléments de constitution des protéines sont tous des acides  $\alpha$ -aminés.

On peut également classer les acides aminés en fonction des propriétés chimiques ou physiques de leurs chaînes latérales, telles que la polarité, le point isoélectrique, la nature aliphatique, aromatique, cyclique ou à chaîne ouverte. Par exemple, certains acides aminés ont des chaînes latérales polaires qui sont solubles dans l'eau, comme la sérine, la thréonine et l'asparagine. D'autres acides aminés sont hydrophobes, comme l'isoleucine, la phénylalanine et la valine. L'acide aminé cystéine possède une chaîne latérale chimiquement réactive qui peut former des liaisons avec une autre cystéine. On peut aussi différencier les acides aminés basiques comme l'arginine, la lysine et l'histidine, des acides aminés acides comme l'acide aspartique et l'acide glutamique qui se chargent négativement par déprotonation du groupement carboxylique.

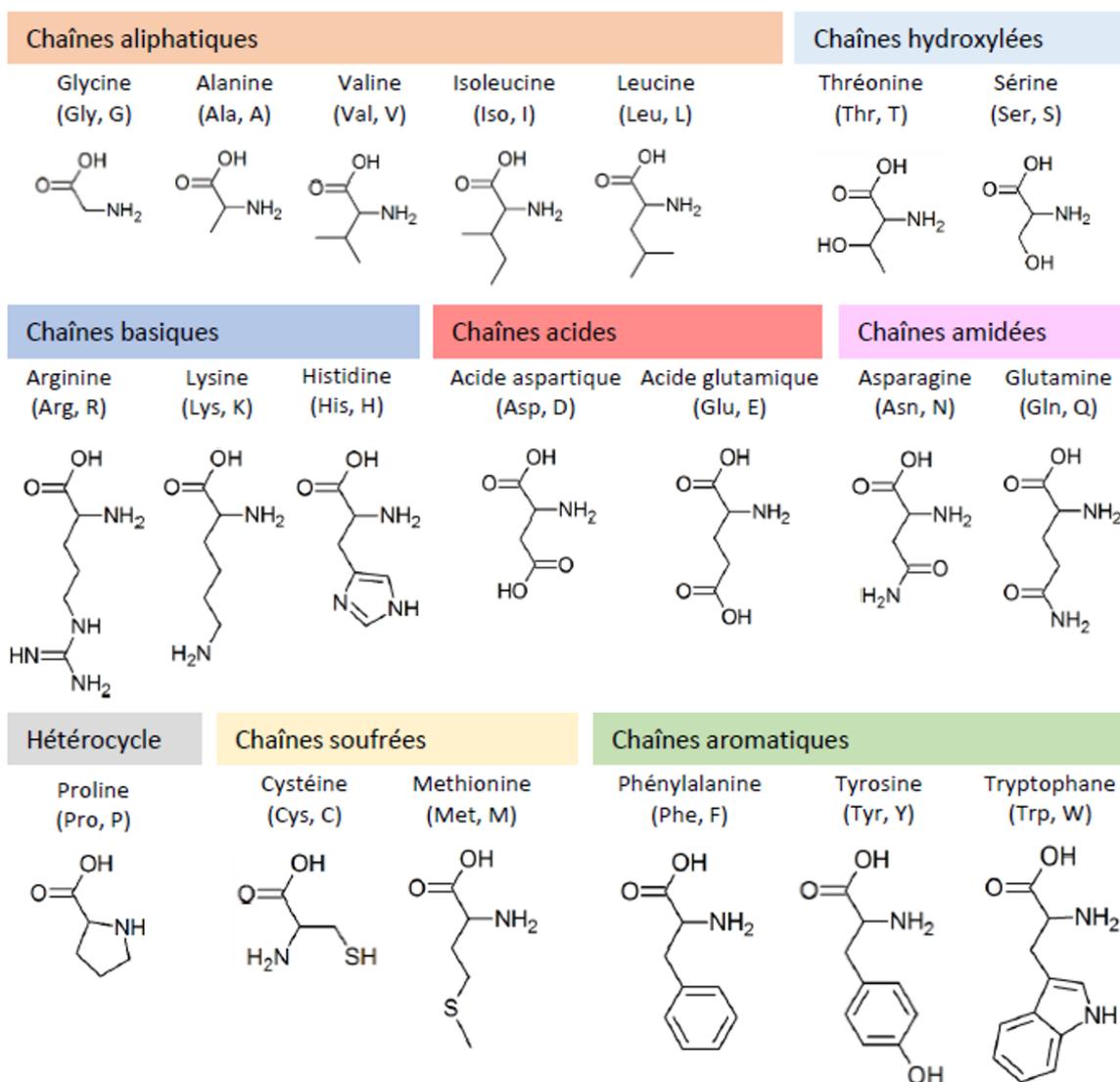


FIGURE 1.3 – Représentation de 20 acides aminés naturels.

### Structures d'une protéine

Les protéines sont le produit final du processus de décodage qui commence avec les informations portées par l'ADN cellulaire. Elles contiennent les éléments structuraux de la cellule servant de catalyseurs pour pratiquement toutes les réactions biochimiques qui se produisent chez les êtres vivants. Chaque protéine est composée de différentes combinaisons d'acides aminés, qui sont reliés entre eux par des liaisons peptidiques. Une liaison peptidique est une liaison covalente qui relie le groupe amine d'un acide aminé au groupe carboxyle d'un autre acide aminé. Cette réaction de condensation libère une molécule d'eau (figure 1.4). L'enchaînement de plusieurs polypeptides (un polypeptide est formé d'un arrangement de 20 à 100 acides aminés) constitue une protéine.

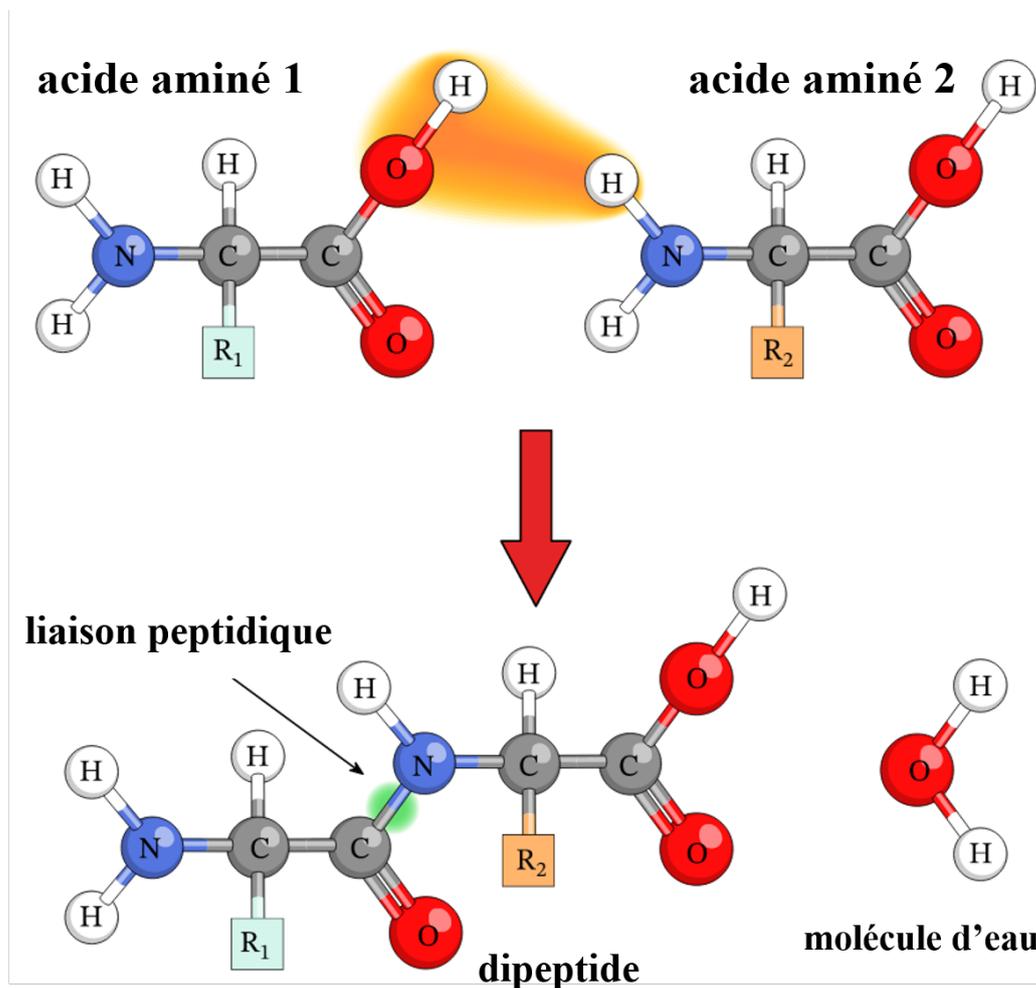


FIGURE 1.4 – Schéma de la formation de la liaison peptidique à partir de deux acides aminés de chaînes latérales  $R_1$  et  $R_2$  formant un dipeptide et une molécule d'eau en solution.

En plus de la séquence linéaire d'acides aminés constituant une protéine (appelée structure primaire), celle-ci est également caractérisée par une variété de structures tridimensionnelles. On peut ainsi distinguer 3 autres structures pour une protéine. La structure secondaire, qui est la description des arrangements locaux des acides

aminés voisins, stabilisés par des liaisons hydrogènes. Il existe plusieurs variétés de structures secondaires, mais les plus souvent rencontrées sont l'hélice  $\alpha$  et le feuillet  $\beta$ . La structure tertiaire, quant à elle, est une vision tridimensionnelle à l'échelle de la protéine tout entière. Elle décrit la disposition tridimensionnelle des structures secondaires d'une protéine. Cette structure est maintenue en place par des liaisons covalentes telle que le pont disulfure et d'autres non covalentes telles que les liaisons hydrogènes, les interactions ioniques, les forces de Van der Waals et le tassement hydrophobe (conduisant à la formation d'un coeur hydrophobe). Enfin, la structure quaternaire décrit l'arrangement de plusieurs protéines entre elles, on parle alors d'un complexe de protéines (par exemple l'hémoglobine est constituée de nombreuses protéines formant un complexe protéique unique). Le tableau (1.5) regroupe les quatre niveaux de structure d'une protéine dans le cas d'une protéine eucaryote, la PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen).

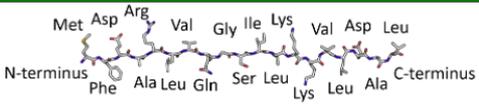
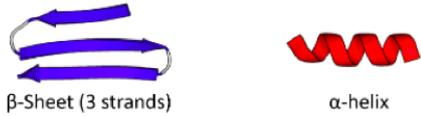
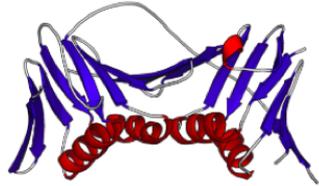
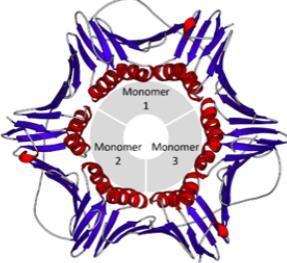
Structure d'une protéine	Description	Type de liaisons	Exemple de la structure de la PCNA (PDB:1AXC)
Primaire	assemblage des acides aminés	liaisons peptidiques	
secondaire	hélices alpha ou feuillets bêta	liaisons hydrogène (H)	
tertiaire	forme tridimensionnelle (repliment de la protéine)	liaisons H, ioniques, ponts disulfure et interactions hydrophobes	
quaternaire	assemblage de plusieurs structures tertiaires (plusieurs polypeptides)	liaisons H, ioniques, ponts disulfure et interactions hydrophobes	

FIGURE 1.5 – Description des structures primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire d'une protéine, dans le cas de la PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen.)

### Nomenclature des fragments peptidiques

La nomenclature de fragments peptidiques chargés a été introduite par Roepstorff & Folhman [8] et Biemann [8,9]. Le nom du fragment est défini selon la position de la rupture de la liaison covalente. Un exemple est présenté sur la figure (1.6) pour

la nomenclature d'un composé de 4 acides aminés avec les quatre chaînes latérales ( $R_1, R_2, R_3$  et  $R_4$ ), numérotées à partir de l'extrémité N-terminale ( $NH_2$ ) jusqu'au C-terminal ( $COOH$ ). Ainsi, la position de la charge après rupture d'une liaison du squelette - dans le cas d'un peptide monochargé- se trouve soit du côté C-terminal produisant des fragments  $X_i, Y_i$  ou  $Z_i$ , soit du côté du N-terminal formant des fragments  $a_j, b_j$  ou  $c_j$ .  $i$  et  $j$  correspondent au numéro de la liaison peptidique rompue, en comptant à partir du C-terminal pour les ions  $X_i, Y_i$  et  $Z_i$ , et du N-terminal pour les ions  $a_j, b_j$  et  $c_j$ .

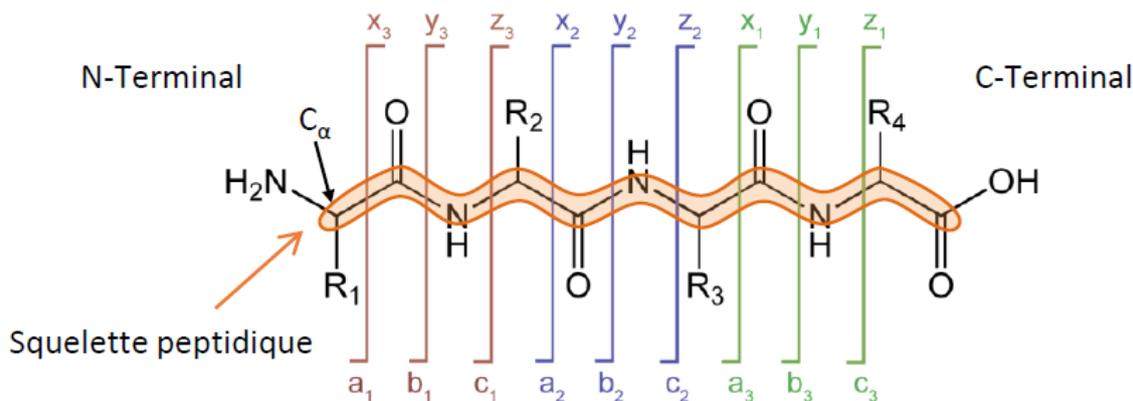


FIGURE 1.6 – Nomenclature des fragments d'une chaîne peptidique de quatre acides aminés.

Ces notations permettent également d'indiquer quelle est la liaison covalente rompue. Ainsi, la rupture de la liaison  $C_{\alpha,i} - C$  donne les ions  $a_j, X_i$ , la rupture C-N produit les ions  $b_j, Y_i$  et enfin la rupture  $N - C_{\alpha,i+1}$  donne les ions  $c_j, Z_i$ . Pour un peptide multichargé, on peut voir la formation d'ions complémentaires du fait de la localisation des charges de chaque côté d'une liaison rompue.

### 1.1.2 Objets thérapeutiques : exemple des nanoparticules

En plus du matériel biologique présent dans les organismes vivants, il existe d'autres systèmes d'intérêt biologique : les objets thérapeutiques. Ainsi, nous axons une partie de nos recherches dans le groupe BMS (BioMolécules et Spectroscopie) à étudier ces objets d'intérêt thérapeutique qui trouvent aujourd'hui un rôle important en nanomédecine. Un objet thérapeutique est défini comme une biomolécule de taille inférieure au micromètre (souvent inférieure à 200 nanomètres) et qui est destiné à l'imagerie et au traitement d'une tumeur. Les différents objets thérapeutiques issus de la nanotechnologie sont par exemple les nanoparticules, les nanocapsules, les liposomes, les micelles, ou les dendrimères.

Dans ce contexte, une approche très puissante s'est développée. On parle de la "théranostique" qui permet de coupler la phase diagnostique et la phase thérapeutique dans le même système, afin de traiter de manière ciblée et individualisée chaque zone tumorale. La phase de diagnostique a pour but de cartographier les tumeurs pour déterminer leur emplacement exact et les éventuelles métastases. Il s'agit d'utiliser une imagerie fonctionnelle qui se réalise à l'aide d'un dispositif appelé PET-Scan

(Positron Emission Tomography) [10]. Cette imagerie a recours à des traceurs - plus précisément des isotopes - qui sont des éléments radioactifs instables, et en associant ces traceurs à des molécules comme les anticorps par exemple, ces derniers seront capables de reconnaître les tumeurs et de s'y fixer. Ainsi, les régions qui "s'allument" correspondent aux cellules dysfonctionnelles (figure 1.7).

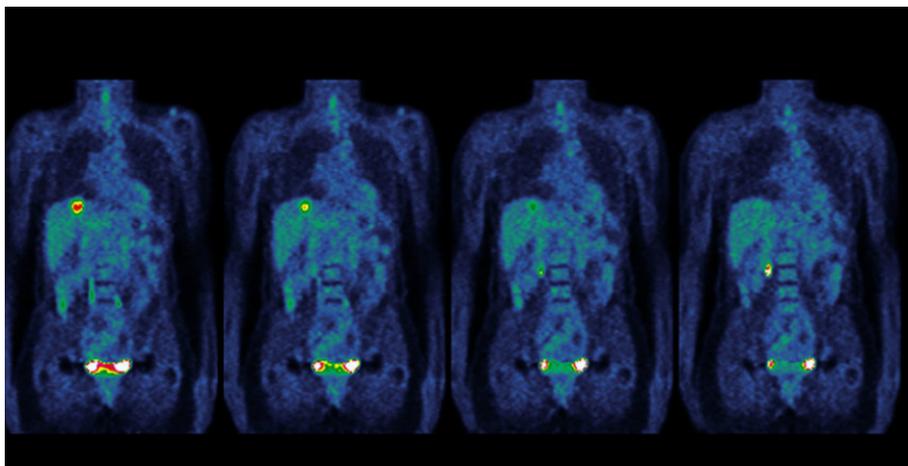


FIGURE 1.7 – Imagerie médicale par PET-Scan. Les régions colorées correspondent aux cellules cancéreuses.

Avec la théranostique, la phase thérapeutique arrive après la localisation de la tumeur. Plusieurs choix pour le traitement sont possibles, comme la radioimmunothérapie ou la radiothérapie ciblée. La première consiste à injecter un isotope radioactif puissant, qui va irradier directement la tumeur. La radiothérapie ciblée quant à elle utilise des faisceaux lumineux comme traitement (et des faisceaux d'ions dans le cas de l'hadronthérapie ou de la protonthérapie). En radiothérapie, des radiosensibilisateurs peuvent être utilisés, pour limiter l'endommagement des tissus sains environnant la tumeur. Nous avons mené des études structurales sur de tels objets ( $\text{Au}_{10}\text{SG}_{10}$  par exemple, voir [11]), ainsi que sur divers nanoagrégats métalliques [12] qui possèdent de nombreuses propriétés optiques et des possibilités de ciblage. Nous avons également mené des études structurales sur des objets possédant des propriétés d'encapsulation (voir chapitre 5).

### 1.1.3 Acide nucléique (base ADN, base ARN)

Les acides nucléiques jouent un rôle déterminant dans le stockage, l'expression et la transmission de l'information génétique dans tous les organismes vivants procaryotes et eucaryotes. Ces macromolécules complexes existent sous deux formes, l'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique (ARN). La molécule d'ADN a été mise en évidence en 1953 par Francis Crick et James Waston [13]. Cette dernière est libre dans le cytoplasme des cellules chez les procaryotes, alors que pour les eucaryotes, elle est placée dans le noyau de taille micrométrique de façon dépliée et comprimée

pour former le chromosome (figure 1.8). L'ADN est composé de deux brins complémentaires (structure en double hélice), en revanche l'ARN est constitué d'un brin unique (figure 1.10).

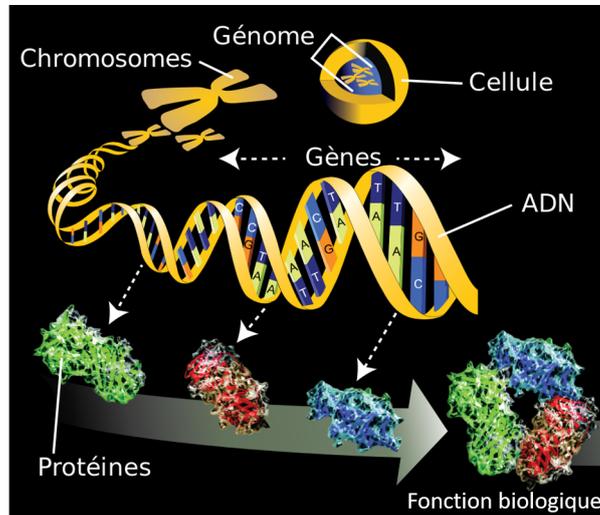


FIGURE 1.8 – De l'ADN à la fonction biologique d'une protéine.

Chacun de ces brins est formé d'une séquence de nucléotides liés entre eux par des liaisons phosphodiester. Un nucléotide est une molécule organique qui est l'unité de base de l'acide nucléique. Ces nucléotides sont constitués d'un nucléoside en liaison avec un à trois groupement phosphate, et un nucléoside est l'association entre des bases azotées (nucléobases) et un pentose (sucre) via une liaison glycosidique (figure 1.9). Les 5 bases nucléiques (bases azotées) d'un nucléotide sont regroupées en deux familles (les purines et les pyrimidines) :

- Les purines sont des composés bicycliques comprenant deux hétérocycles à cinq et six atomes : l'adénine (A) et la guanine (G).
- Les pyrimidines sont des composés monocycliques comprenant un hétérocycle à six atomes : la cytosine (C), l'uracile (U) et la thymine (T).

Les liaisons entre deux nucléotides de chaque brin d'ADN sont des liaisons hydrogènes. Le nucléotide T peut se lier uniquement au nucléotide A, et le nucléotide G ne se lie qu'au nucléotide C. Cette structure entre deux bases complémentaires de l'ADN forme une paire dite de Watson-Crick. Par ailleurs, l'information génétique portée par l'ADN est régie par cette succession de nucléotides qui constitue ce qu'on appelle la séquence de brin. Les deux fonctions principales de l'ADN sont la transmission de l'information génétique et la synthèse des protéines (figure 1.10).

L'acide ribonucléique (ARN) est la molécule mono-caténaire (à brin unique) qui permet la synthèse des protéines ayant des activités biologiques définies. Cette molécule, comme l'ADN, peut être produite dans un noyau pour les organismes eucaryotes ou dans le cytoplasme pour les cellules procaryotes. La première étape de la synthèse des protéines est la transcription d'un gène d'ADN (un gène est une por-

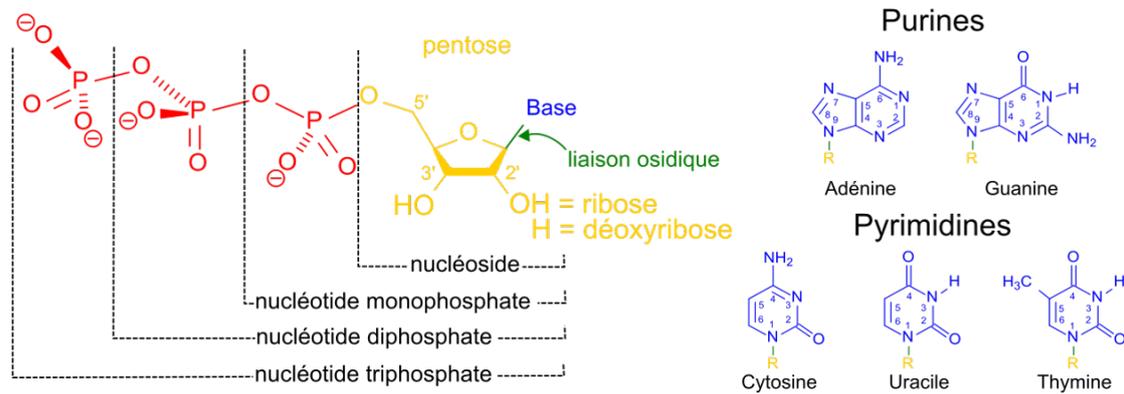


FIGURE 1.9 – structure d'un nucléotide (en bleu sont représentées les 5 bases d'acide nucléique)

tion de l'ADN) en une molécule d'ARN messenger (ARNm), ensuite la traduction de l'information portée par l'ARNm permet de produire différentes protéines. Au niveau structural, le brin d'ARN est similaire à l'ADN, cependant le nucléotide U est substituée au nucléotide T (complémentaire de l'adénine A dans l'ADN), ainsi que l'association d'un sucre désoxyribose, dans le cas de l'ADN à la place d'un ribose pour l'ARN (figure 1.9).

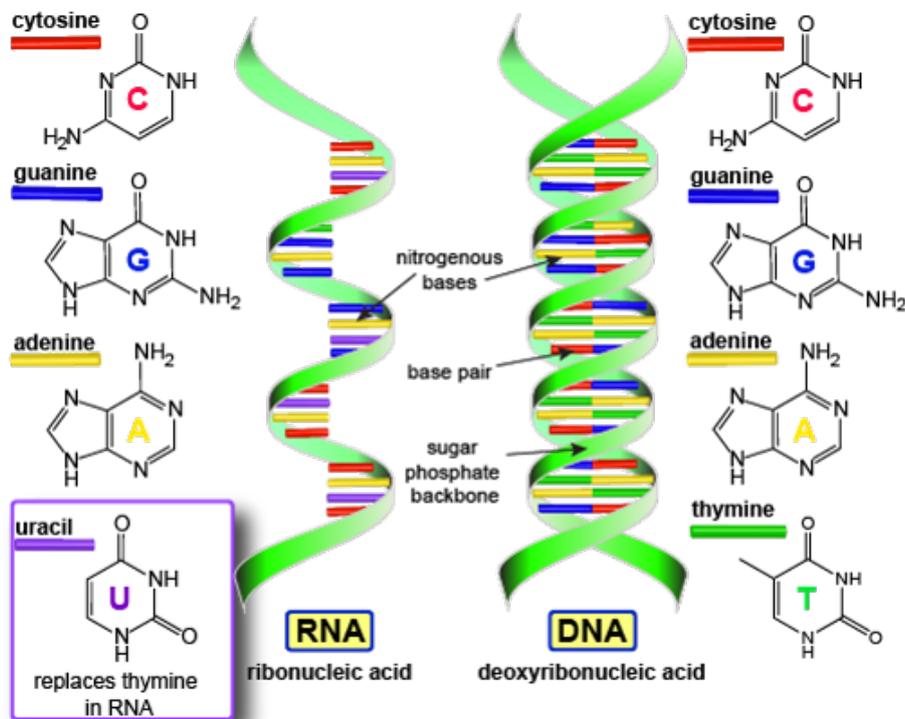


FIGURE 1.10 – Structure en double hélice de l'Acide DésoxyriboNucléique et structure en simple brin de l'Acide Ribo-Nucléique.

## 1.2 Intérêt des études en phase gazeuse

### 1.2.1 Lien entre structure et fonction biologique

Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, les fonctions biologiques des macromolécules dépendent généralement de leurs structures tridimensionnelles. Les protéines par exemple possèdent une structure particulière dont les propriétés physico-chimiques permettent d'assurer une activité biologique normale. En revanche, une structure ayant un repliement instable de la chaîne protéique, entraîne un dysfonctionnement dans la fonction biologique de la protéine en question. C'est le cas de certaines maladies neurodégénératives, e.g. Alzheimer, due au mauvais repliement de la protéine d'amyloïde (figure 1.11).

La protéine d'amyloïde-bêta ( $A\beta$ ) est composée de 37 à 49 résidus d'acides aminés. Ce polypeptide est obtenu par protéolyse de la protéine précurseur amyloïde-bêta (APP), qui est une protéine membranaire conservée chez les humains et concentrée dans les synapses des neurones. L'APP joue plusieurs rôles comme la formation et la réparation synaptiques, la régulation de plasticité neurale et l'exportation de fer. L'accumulation des plaques amyloïdes  $A\beta$  sous forme fibrillaire amyloïde observées dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer peuvent altérer les fonctions de l'APP qui se trouve en baisse de production. La perte d'APP causée par la présence excessive d' $A\beta$  peut produire des déficits physiologiques qui contribuent à la démence.

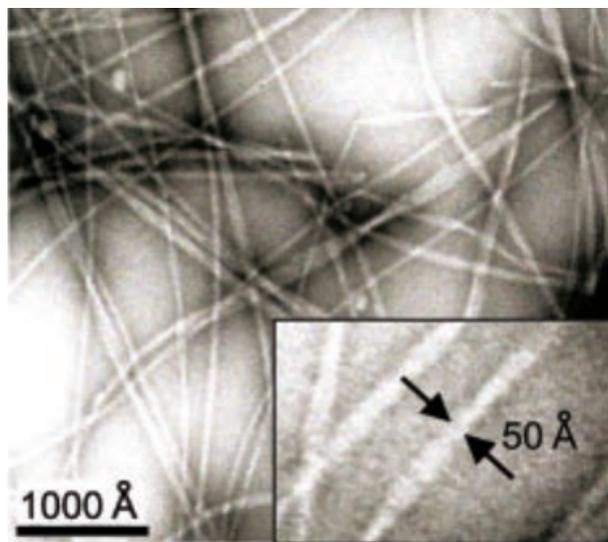


FIGURE 1.11 – Microscopie électronique par transmission de fibrilles amyloïdes.

### 1.2.2 Structure native d'une biomolécule

La structure des biomolécules et de leurs complexes est susceptible de changer selon l'environnement de la molécule. On appelle "état natif", toute conformation ou

structure moléculaire tridimensionnelle adoptée par la molécule dans le milieu biologique et qui lui confère sa fonction. Pour relier la fonction biologique à la structure d'une biomolécule, il faut idéalement déterminer la structure de la biomolécule dans son environnement. Dans le cas de la protéine  $A\beta$ , les études spectrales par résonance magnétique nucléaire (RMN) ont permis de déterminer la structure secondaire du brin 1-42 de l'amyloïde- $\beta$ , qui est composé de domaines en hélice  $\alpha$  séparés par des jonctions flexibles déstructurées. Cette observation montre aussi que la structure dépend fortement du pH. Ainsi, pour obtenir plus d'informations sur la transition conformationnelle qui pilote l'agrégation amyloïdale, les techniques d'études en phase gazeuse permettent de déterminer la structure native par une détection qui préserve le mieux possible l'information structurale, c.à.d. une technique qui est capable de détecter les plus faibles des liaisons non-covalentes.

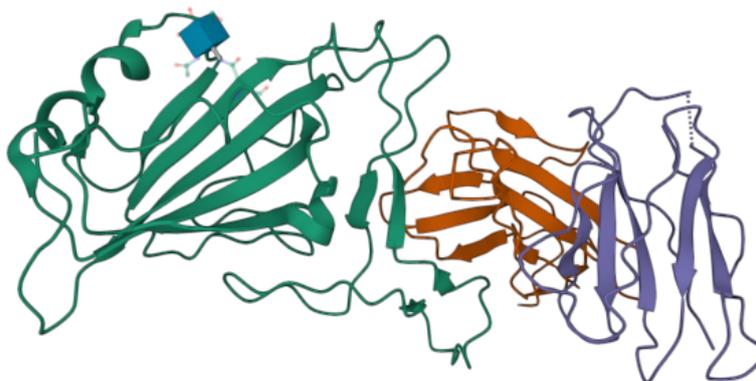


FIGURE 1.12 – SARS-CoV-2 spike in complex with the CA521 neutralizing antibody Fab

Le domaine d'étude structurale de biomolécules et ses complexes a démarré avec les techniques d'analyses spectroscopiques en phase condensée (solide ou liquide). Nous citerons parmi ces techniques les plus utilisées et qui permettent d'étudier les interactions biomoléculaires : le dichroïsme circulaire (**CD**), la spectroscopie Raman, la spectroscopie infrarouge, la spectroscopie ultraviolette et la résonance magnétique nucléaire (**RMN**) qui peuvent être appliquées sur des systèmes en phase liquide.

La cristallographie aux rayons **X**, s'applique sur les systèmes en phase solide. Elle est également une des techniques très puissante permettant de déterminer les structures moléculaires. Ainsi, elle a conduit en 1953 à l'identification de la structure en double hélice de l'ADN, et celle de l'hémoglobine. Aujourd'hui, un grand nombre de molécules biologiques révélées par cette méthode, sont répertoriés dans la Protein Data Bank (PDB). Néanmoins, le pouvoir de résolution ( $2\text{\AA}$ ) de cette technique reste insuffisant pour résoudre la position des atomes d'hydrogène. De plus, la difficulté de cristalliser efficacement certains systèmes (protéines membranaires hydrophobes) est un inconvénient majeur pour cette technique. Enfin, il ne faut pas oublier que ce n'est à priori pas la structure native que l'on obtient en étudiant des molécules en phase solide.

La spectroscopie **RMN**, est une autre méthode employée dans l'étude des structures de molécules. Cette technique se base sur le phénomène physique de résonance magnétique. L'échantillon est soumis à une perturbation par un champ oscillant faible (onde radio) et placé dans un champ magnétique constant fort, et il produira ce qu'on appelle un signal RMN. Ce dernier permet l'observation des champs magnétiques locaux autour des noyaux atomiques. Ces champs intramoléculaires modifient la fréquence de résonance, donnant ainsi accès aux détails de la structure électronique d'une molécule et de ses groupes fonctionnels. L'avantage de la RMN réside dans sa capacité à étudier des systèmes en solution, ceci permet de sonder la phase native, afin de fournir des informations détaillées sur la structure, la dynamique et l'environnement chimique des molécules. En pratique, l'investigation des spectres devient extrêmement compliqué à mettre en œuvre lorsque la taille des systèmes augmente, ainsi la RMN est limitée aux protéines inférieures à 35 kDa. Une autre limitation qui se rajoute à la complexité d'interprétation est la nécessité d'utiliser une solution de grande concentration (mM) et donc une grande quantité de produit (2 à 50 mg).

Bien que ces techniques citées ci-dessus permettent d'étudier la structure d'une biomolécule, le résultat qu'elles donnent ne correspond pas à la réponse d'un objet unique. Pour ces raisons, il était donc préférable de penser à utiliser une technique d'étude en phase gazeuse comme une approche complémentaire avec la phase condensée, permettant ainsi de comparer les résultats des deux phases.

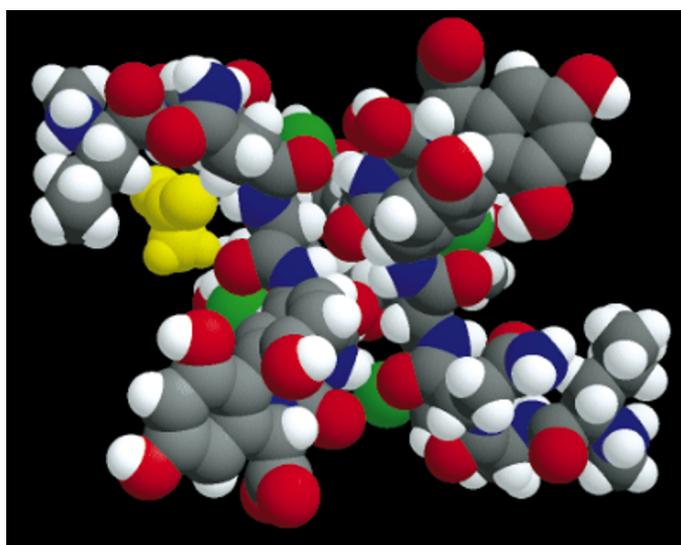


FIGURE 1.13 – Structure du dimère de la vancomycine obtenu par cristallographie X [14].

### 1.2.3 Contrôle de la stoechiométrie

L'intérêt majeur de l'étude des biomolécules en phase gazeuse réside en la possibilité de contrôler parfaitement la stoechiométrie du système étudié. On s'affranchit également des effets du solvant, qui est essentiellement constitué d'eau dans un organisme, pour pouvoir se concentrer sur les propriétés intrinsèques du système. De plus,

les techniques d'analyse en phase gazeuse offrent la possibilité de piéger et refroidir vibrationnellement les ions moléculaires à l'aide des pièges ioniques et de les manipuler par des champs électrostatiques, qui permettent d'interroger les espèces ioniques isolées par spectroscopie laser à différentes échelles temporelles. En outre, les résultats des expériences sur des molécules isolées en phase gazeuse peuvent être comparés de manière fiable aux calculs de chimie quantique pour des systèmes simples, ce qui n'était pas forcément le cas pour la phase condensée, où les modèles utilisés sont complexes et peu robustes.

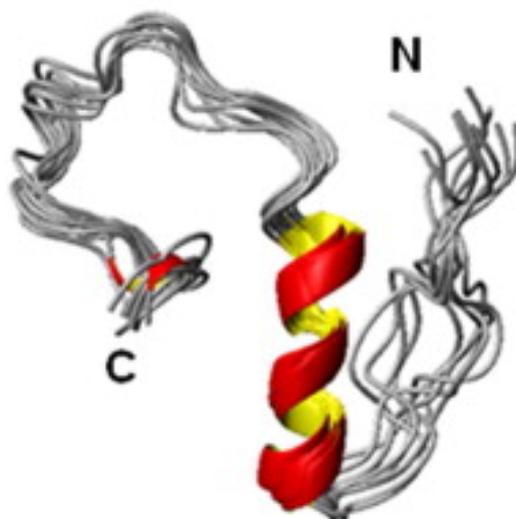


FIGURE 1.14 – Structure de  $A\beta_{1-40}$  dans 50 mM de NaCl mesurée par RMN de haute résolution [15].

### 1.3 Techniques de mise en phase gazeuse de biomolécules

L'évaporation et la désorption des molécules sont les deux méthodes qui permettent de mettre en phase gazeuse des molécules initialement sous forme liquide ou solide. Parmi les techniques les plus répandues on peut citer, pour créer des espèces neutres : le jet thermique, le jet supersonique, la source à ablation laser (MALDI) et la source à gouttelettes d'hélium. D'autres sources utilisées permettent d'obtenir des espèces ioniques et/ou neutres : l'Ionisation/Désorption laser assistée par matrice (MALDI), l'Electrospray (ESI) et le jet liquide (LILBID : Laser-Induced Liquid Beam Ionization/Desorption).

Dans ce dernier cas, l'augmentation de l'énergie interne du système, ainsi que les changements des propriétés physico-chimiques de l'analyte qui peut être ionisé, varient selon le choix de la source d'ionisation. De manière générale, nous pouvons séparer les sources d'ionisation en deux catégories, selon la quantité d'énergie apportée à la molécule ionisée. On distingue ainsi les "sources d'ionisation dites énergétiques"

qui provoquent, en plus de l'ionisation de la molécule, sa fragmentation et les "sources d'ionisation dites douces" qui permettent de mettre en phase gazeuse des ions moléculaires en préservant les liaisons non covalentes telles que les liaisons hydrogènes responsables de la structure secondaire d'une macromolécule.

Les types de sources d'ionisation restent toutefois nombreuses, et possède chacune un processus d'ionisation spécifique. En effet, une molécule neutre peut s'ioniser selon différentes voies via l'éjection d'électrons, la capture d'électrons, la protonation, la déprotonation ou par le transfert d'une espèce chargée d'une phase condensée à la phase gazeuse. Dans le paragraphe suivant, on présente brièvement certaines techniques d'ionisation.

### 1.3.1 Mise en phase gazeuse par chauffage

La sublimation et la vaporisation sont les premières techniques de mise en phase gazeuse d'un système respectivement solide ou liquide. Il s'agit simplement de chauffer de manière directe ou indirecte l'échantillon, afin d'augmenter sa température pour atteindre un seuil permettant l'évaporation des molécules qui se trouvent à la surface de l'échantillon et les passer en phase gazeuse.

En effet, la pression  $P$  de vapeur saturante d'une substance, qui est la pression obtenue lorsqu'un équilibre est atteint entre les atomes ou les molécules désorbées et celles adsorbées à la surface, augmente avec la température  $T$  de l'échantillon. C'est la relation de Clapeyron (1.1) qui régit cette dépendance non linéaire entre  $P$  et  $T$  :

$$\frac{dP}{dT} = \frac{L}{T\Delta V} \quad (1.1)$$

où  $L$  est la chaleur latente exprimée en (J/mol) et  $\Delta V$  la variation du volume molaire en ( $\text{m}^3/\text{mol}$ ). Le chauffage n'est donc pas adapté aux molécules thermiquement instables, c.à.d. les molécules qui possèdent un seuil de dissociation plus faible que l'énergie de désorption. De ce fait, cette méthode se limite, du point de vue des molécules d'intérêt biologique, aux systèmes composés de moins de 20 atomes environ, telles que certaines bases nucléiques. Par exemple, la thymine, l'adénine et la cytosine ont pu être analysées par Kim et al. [16] dans une expérience de sublimation en jet supersonique. Une étude récente se focalise sur l'exploration d'une nouvelle technique permettant l'évaporation de biomolécules neutres (comme des petits peptides et des sucres) en présence d'un fluide supercritique comme le  $\text{CO}_2$  [17].

Toutefois, le chauffage reste une technique inadaptée pour étudier la structure et l'endommagement des systèmes de grands poids moléculaires tels que les bases d'ADN et d'ARN pour les raisons citées ci-dessus, et des sources plus douces ont donc été mises au point pour étudier de tels systèmes en phase gazeuse.

### 1.3.2 Electrospray

L'électrospray ou électronébulisation (ESI) est l'une des techniques permettant de transférer en phase gazeuse, de manière douce, de grandes biomolécules déjà ionisées en phase liquide. Cette technique a été développée en 1988 par John B. Fenn (prix Nobel de chimie en 2002 [1]). Elle est aujourd'hui largement utilisée en protéomique (analyse des protéines) et aussi par exemple pour l'étude en phase gazeuse de virus, encore viables après électronébulisation [18].

Le principe de fonctionnement de l'ESI peut se décomposer en trois étapes :

1. Nébulisation par formation des microgouttelettes chargées au bout d'un capillaire métallique.
2. Evaporation et production des ions par explosions coulombiennes.
3. Transfert et isolation des espèces ioniques en phase gazeuse.

#### **1) Nébulisation par formation des gouttelettes chargées au bout d'un capillaire métallique :**

L'échantillon à étudier est une solution qui contient des analytes dissoutes dans un solvant (solution hydroalcoolique ou dans de l'eau). Cette solution est introduite dans un capillaire métallique inoxydable à l'aide d'une seringue. Un potentiel électrique élevé allant jusqu'à plusieurs kilovolts est appliqué sur ce capillaire, créant une différence de potentiels entre le capillaire et une électrode située quelques millimètres en aval de ce dernier figure (1.15). Le sens du courant ionique (sens de déplacement des cations) dépend de la valeur du potentiel appliqué au niveau du capillaire. Dans le cas du potentiel positif illustré sur la figure (1.15), les cations ont migré vers l'extrémité du capillaire. En revanche les anions se déplacent dans le sens inverse.

À la suite de cette séparation des charges, on voit apparaître au bout du capillaire la formation d'un filament liquide (cône de Taylor), qui est due à cette répulsion électrostatique entre les charges. La nébulisation en fines gouttelettes chargées à partir de ce cône de Taylor s'effectue lorsque l'équilibre entre les forces électrostatiques et la tension de surface devient instable à cause d'une perturbation (augmentation du champ électrique par exemple). Par la suite, les gouttelettes chargées vont se déplacer sous l'action du champ électrique et d'un gradient de pression qui s'applique entre la source et l'entrée d'un analyseur en masse.

#### **2) Evaporation et formation des ions par explosions coulombiennes :**

Les gouttelettes multichargées et pulvérisées à partir du cône de Taylor possèdent un diamètre initial qui dépend de trois paramètres essentiels : le débit de la solution utilisée, le potentiel électrique appliqué sur le capillaire et la conductivité du solvant [19].

L'évaporation progressive du solvant des gouttelettes du fait des collisions avec le gaz résiduel a comme effet de réduire leur diamètre, tout en gardant constant

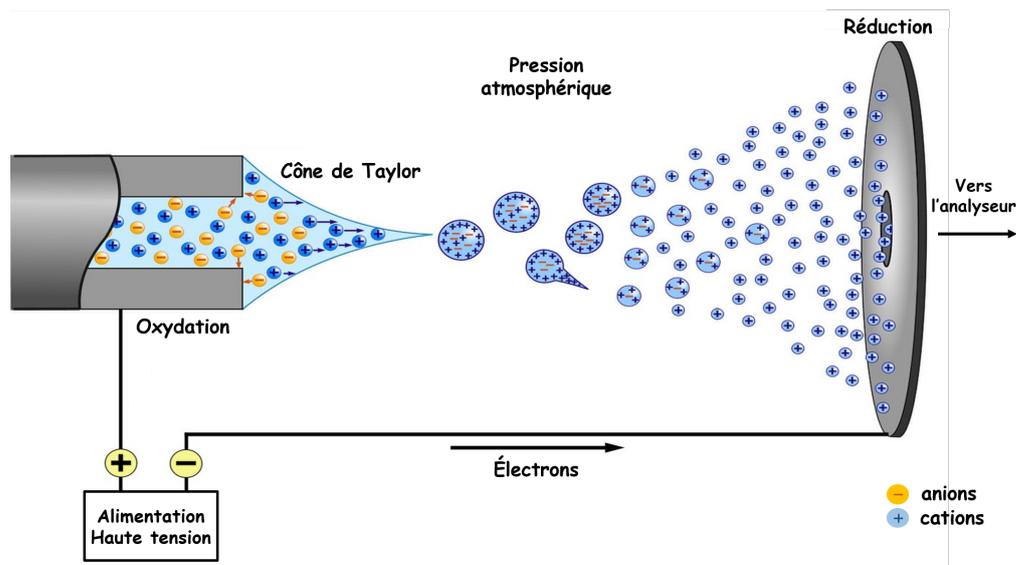


FIGURE 1.15 – Schéma représentatif du principe de fonctionnement de l'électrospray.

le nombre de charges dans une gouttelette. Ainsi, la densité de charge augmente au fur et à mesure que le rayon  $R$  de la gouttelette diminue. Par conséquent, la répulsion coulombienne devient du même ordre de grandeur que la tension de surface. À ce moment, les gouttelettes se déforment et deviennent instables. On appelle cette condition d'instabilité, la limite de Rayleigh qui conduit à une explosion coulombienne qui va diviser la gouttelette en nanogouttelettes chargées.

Cette séquence de désolvatation et de fission coulombienne se répète à chaque fois que la limite de Rayleigh est atteinte. Elle est d'autant plus efficace pour des gouttelettes contenant des analytes hydrophobes. En effet, les analytes hydrophobes occuperont plutôt la surface de la gouttelette et seront donc désorbés plus facilement. Certains ESI utilisent un capillaire de transfert chauffé entre l'orifice et l'analyseur du spectromètre de masse dans le but d'optimiser l'évaporation.

### 3) Transfert et isolation des espèces ioniques en phase gazeuse :

Il existe dans la littérature deux mécanismes qui permettent d'expliquer le processus de production des espèces ioniques (protonées ou déprotonées) à l'aide d'une source ESI. Le «Charged Residue Model» (**CRM**) a été le premier mécanisme proposé par Dole en 1968 et étendu par Röhlgen [20]. Dans ce mécanisme, les fissions de Rayleigh consécutives s'arrêtent lorsque l'on n'a plus qu'un seul ion moléculaire présent dans la gouttelette (figure 1.16).

Le deuxième mécanisme, est appelé «Ion Evaporation Model» (**IEM**). Dans ce modèle, Iribarne et Thompson proposent une autre approche pour décrire la mise en phase gazeuse des ions. La dispersion en nanogouttelettes à la limite de Rayleigh aura lieu comme dans le cas du mécanisme CRM, jusqu'à ce que les gouttelettes atteignent un rayon de l'ordre de 10 nm [21]. Une désintégration supplémentaire en gouttelettes encore plus petites n'est pas censée se produire. Donc pour éliminer cet

excès de charges, les ions sont libérés de la surface des gouttelettes pour être mise en phase gazeuse (figure 1.16).

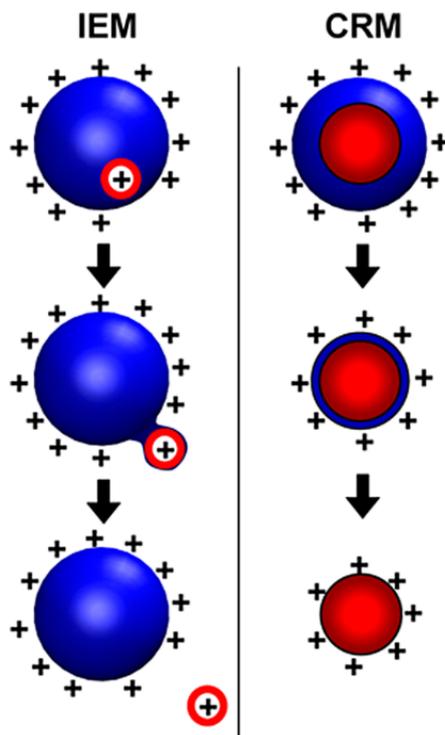


FIGURE 1.16 – Représentation des deux modèles d’isolation des ions en phase gazeuse. À gauche : le mécanisme IEM de Iribarne, À droite le modèle CRM de Röllgen. La figure est tirée de la référence [22].

L’électrospray a l’avantage de produire, de manière douce, des ions de grande masse moléculaire à partir d’une solution. Ceci est pertinent du point de vue biologique (la structure native est conservée). Néanmoins, cette ionisation se déroule à pression atmosphérique et les ions créés sont protonés ou déprotonés plusieurs fois. Le grand état de charges implique donc une forte répulsion électrostatique qui peut potentiellement affecter la structure native lors du passage de la phase liquide en phase gazeuse. D’autres inconvénients liés à cette technique sont dus à sa sensibilité envers les sels et l’incompatibilité pour les détergents. Ainsi, les interactions faibles sont facilement perdues lors des procédures d’isolation.

### 1.3.3 MALDI

L’ionisation-désorption laser assistée par matrice (**MALDI**), a été mise en place par Karas et Hillenkamp en 1988 [2]. Cette méthode de mise en phase gazeuse n’est autre qu’une version de la technique **LDI** (Laser Desorption/Ionization) qui avait été développée par Honig et Woolston en 1963 pour étudier la désorption, des espèces ioniques et des neutres, induite par un laser pulsé à rubis avec une durée d’impulsion de 50 ms sur une surface solide [23]. La seule différence apportée par le MALDI par rapport à l’ionisation laser LDI est la nature et la préparation particulière de l’échantillon.

Le MALDI s'adresse à plusieurs types de biomolécules (biopolymères tels que l'ADN, certaines protéines et des peptides) et diverses molécules organiques (telles que les polymères, dendrimères et autres macromolécules). Ces molécules d'intérêt sont piégées dans une matrice servant de vecteur d'énergie entre le faisceau laser et la molécule. L'énergie des photons absorbés engendre la sublimation des molécules de matrice puis l'expansion en phase gazeuse d'un nuage d'ions moléculaires. Durant cette désorption, l'ionisation des analytes se produit par un transfert de proton ( $H^+$ ) entre la matrice photo-excitée et l'analyte (figure 1.17). La dernière étape consiste à transférer les ions vers un spectromètre de masse.

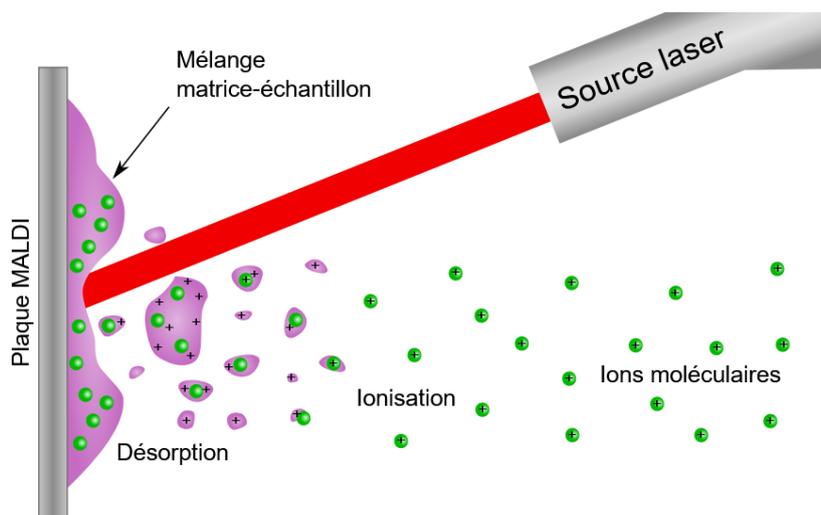


FIGURE 1.17 – Illustration de principe du MALDI. La désorption par laser permet de mettre les molécules en phase gazeuse. L'ionisation a lieu via un transfert de charge entre la matrice et l'analyte.

L'étape clé dans le MALDI est la phase de préparation de la matrice solide. Le composé à étudié (analyte) est dispersé dans une solution saturée de petites molécules (matrice) et l'ensemble est co-cristallisé par évaporation du solvant. Le choix de cette matrice dépend principalement de l'espèce à étudier. Par exemple, pour produire des espèces protonées, on utilise le plus souvent un acide (donneur de proton) comme l'acide  $\alpha$ -cyano-hydroxycinnanique (189 Da) utilisé dans l'analyse des peptides. L'étude des espèces déprotonées demande une matrice contenant une base (accepteuse de proton). Il est également possible d'étudier des espèces neutres, entraînées dans un jet supersonique et ionisées ensuite par un laser, en irradiant une matrice à base de poudre de graphite [24, 25].

La cible MALDI est irradiée par un laser dont la longueur d'onde est accordée sur l'absorption des molécules de la matrice. Dans le cas d'une matrice de composés aromatiques, il s'agit souvent d'irradiation par un laser impulsif émettant dans l'UV, typiquement entre 193 et 430 nm [26]. Par ailleurs, d'autres matrices composées de glace d'eau, de glycérol ou d'urée ont été irradiées avec succès par des laser IR [27, 28]. Dans tous les cas, l'irradiation laser de la matrice se passe sous vide poussé

(<math>10^{-6}</math> Torr) à l'aide d'impulsions courtes de quelques nanosecondes afin d'éviter la diffusion thermique de l'énergie directement vers la molécule.

Tout comme l'électrospray, la technique MALDI est considérée comme une source d'ionisation «douce». Elle a l'avantage de pouvoir produire de grandes biomolécules sous vide ce qui permet de réduire l'activation qui pourrait avoir lieu à pression atmosphérique en utilisant l'ESI. Bien que les taux de fragmentation puisse être importants dans le MALDI [29, 30], la tolérance à la présence des sels ioniques est un atout par rapport à l'ESI. Les ions produits en MALDI ont également de plus faibles états de charge. On obtient le plus souvent des molécules monochargées (simplement protonées ou déprotonées), ce qui est à la fois un problème pour la détection des molécules de grandes tailles en spectrométrie de masse, mais permet aussi de diminuer considérablement les effets de répulsions électrostatiques intramoléculaires et donc de mieux préserver la structure native en phase gazeuse [31].

Un autre inconvénient du MALDI est lié à la non reproductibilité du signal d'ions à cause de la faible homogénéité de l'échantillon initial irradié par laser selon la zone irradiée, on n'obtient pas le même signal. De plus, comme notre objectif final est de pouvoir étudier l'endommagement des biomolécules après leur irradiation en phase liquide (cf. annexe A) et d'étudier les processus de chimie radicalaire liés notamment à la migration des radicaux, cette technique est peu adaptée puisqu'on irradie une matrice solide.

### 1.3.4 Désorption laser sur jet liquide sous vide

Dans les années 90, des expériences de MALDI ont permis par l'irradiation laser IR de matrices de glaces d'eau de générer de petits peptides [32] et des protéines [33] en phase gazeuse. Ces matrices de glace d'eau produisaient des spectres de masses de faible rapport signal sur bruit et donc une mauvaise résolution [34]. Pour pallier ces problèmes de reproductibilité et de faible résolution rencontrés en MALDI, une nouvelle technique s'est développée, permettant de mettre en phase gazeuse des biomolécules par désorption laser sur un jet liquide [35–40]. Cette technique, combinant l'ionisation à la spectrométrie de masse par temps de vol a été mise en place par plusieurs groupes, dont Kondow et ses collaborateurs [41–43], ainsi que par Abel et al. qui ont travaillé sur la technique FL-MALDI (Free Liquid Matrix Assisted Laser Dispersion of Ions or Ionic aggregates) permettant de générer des ions moléculaires depuis un milieu aqueux directement sous vide [7, 44]. Aussi, l'équipe allemande de Brutschy et al. [45, 46] a développé en 1996 la technique de **LILBID** (Laser-Induced Liquid Beam Ionization/Desorption), utilisant un laser IR accordé sur le mode de vibration O-H de la molécule d'eau (2.7 -2.8  $\mu\text{m}$ ) permettant une désorption très douce d'agrégats protonés ou déprotonés à partir d'un jet liquide directement sous vide.

Le schéma de la figure (1.18) représente l'expérience de désorption laser sur jet liquide réalisée par le groupe d'Abel. Dans la plupart des expériences de LILBID, un jet liquide contenant le solvant et les molécules à étudier, est introduit sous vide à

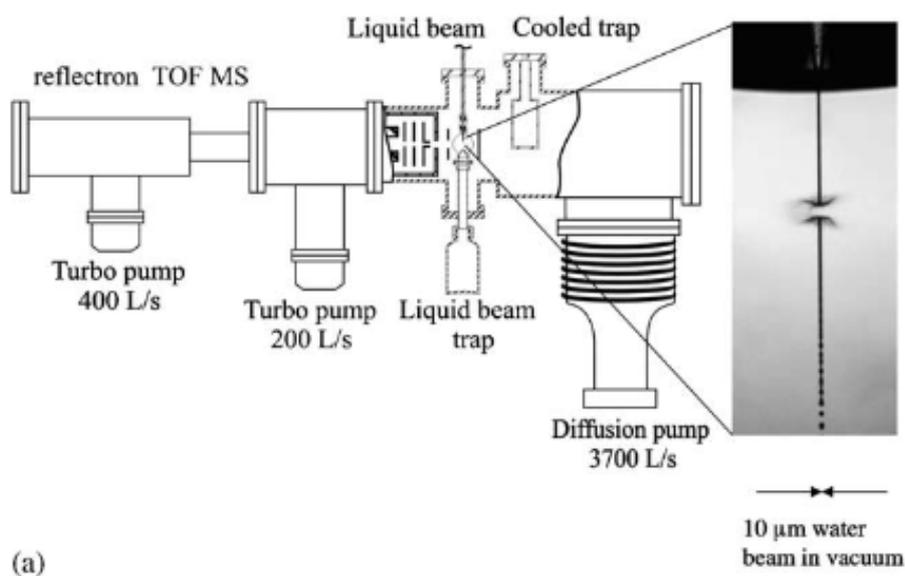


FIGURE 1.18 – Schéma de l'expérience de désorption laser sur jet liquide d'eau (Montage du groupe d'Abel [44]).

travers un orifice de diamètre de 10 à 20  $\mu\text{m}$  à des pressions de 10 à 100 Bar et des vitesses de propagation entre 10 et 100  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . La pression résiduelle dans la chambre de désorption laser est maintenue à une faible valeur ( $10^{-5}$  mbar). Un piège refroidi à l'azote liquide est situé en aval du jet permet le piégeage de ce dernier. À basse température, la mise en œuvre des jets liquide d'alcool est plus facile que les jets d'eau du fait de la faible température de fusion de l'alcool par rapport à celle de l'eau.

### Processus de désorption laser

Les mécanismes d'éjection des ions moléculaires sous vide diffèrent selon la longueur d'onde du laser utilisé. Horimoto et al. [47] ont expliqué le mécanisme de désorption des molécules d'aniline par irradiation d'un jet liquide de propanol (20  $\mu\text{m}$ , 0.2 ml/min) via l'absorption de deux photons venant de deux lasers différents (7.2 eV). Un premier photon émis par un laser UV à 266 nm, résonnant avec la transition  $S_0$ - $S_1$  de la molécule d'aniline. Le deuxième laser émettant à 500 nm, permet ensuite l'ionisation de la molécule. Le potentiel d'ionisation mesuré expérimentalement est de 6.3 eV pour une molécule d'aniline solvatée [48]. En effet, l'ionisation se traduit par l'éjection d'un électron de la surface du jet, en laissant une charge positive en surface. Le modèle d'éjection coulombienne suppose que l'ion est désorbé de la surface lorsque son énergie de répulsion électrostatique devient supérieure à son énergie de solvation. La vitesse de l'ion éjecté en phase gazeuse dépend de l'énergie du laser incidente. Des expériences de désorption sur un jet de molécules d'anisole dissoutes dans de l'éthanol pour des conditions similaires à celles notées ci-dessus pour l'expérience de Horimoto et al. mais par irradiation d'un seul laser UV montrent une vitesse d'éjection de l'ordre de 700  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  [49].

Dans le cas d'une irradiation par laser IR, l'énergie laser est accordée sur la bande d'absorption du solvant : autour de  $3 \mu\text{m}$  pour l'eau (vibration OH) et autour de  $10 \mu\text{m}$  pour les alcools (vibration COH), mais le mécanisme de désorption n'est toujours pas bien compris.

Brutschy [45, 50] a supposé qu'après l'absorption du rayonnement laser, une transition de phase (pour le solvant) a lieu au-delà du point supercritique, entraînant la vaporisation instantanée (au bout de quelque microsecondes). Durant cette vaporisation la densité du liquide décroît et la constante diélectrique devient égale à 1 (densité du vide). Les ions de charges opposées se recombinent pour produire des espèces neutres. Seuls les ions éjectés avec une énergie cinétique suffisante pour s'éloigner d'un contre ion, i.e. vaincre l'attraction coulombienne entre deux charges opposées, peuvent atteindre le détecteur, et être mesurés. Dans ce modèle nommé «*lucky survivor*», la puissance et la longueur d'onde du laser de désorption sont des paramètres qui gouvernent la profondeur de pénétration du laser dans le jet et donc déterminent le nombre d'ions désorbés de la surface liquide [51].

Abel et al. [7, 52] proposent un autre mécanisme pour expliquer cette désorption, en se basant, sur l'hypothèse suivante : l'absorption de l'impulsion laser provoque un processus thermique déclenché par une onde de choc qui permet le réchauffement local du liquide jusqu'à la dispersion de la zone irradiée en nanogouttelettes chargées. La tension de surface dans les nanogouttelettes devient plus faible que la répulsion coulombienne, conduisant à l'éjection des biomolécules chargées sous vide. De plus, il a été montré par les mêmes auteurs que dans ce modèle la dispersion du liquide est cohérente avec les mesures expérimentales. En effet, le nombre des ions détectés évoluent en fonction de la concentration initiale des molécules dans la solution [7]. Ce modèle est aussi soutenu par des simulations de dynamique moléculaire pour des clusters atomiques et moléculaires excités de manière impulsive [53, 54], par des mesures de vitesse d'amas d'eau produits à partir d'un jet liquide [55] et par l'étude de la distribution de états de charge des ions isolés en phase gazeuse après une désorption laser sous vide sur de gouttelettes liquides [56].

La technique LILBID regroupe les avantages de deux techniques d'ionisation cités ci-dessus, l'ESI et le MALDI, comme le montre le tableau récapitulatif (1.19). Elle permet de transférer de grande biomolécules en phase gazeuse sous vide par absorption d'une impulsion laser, créant des ions de faibles états de charges et avec de faible taux de fragmentation. Le fait de travailler en phase liquide permet d'avoir un milieu biologique pertinent pour nos études. En revanche, le rendement en ions est trop faible par rapport à la quantité du produit consommé. Pour résoudre ce problème et donc réduire la quantité du produit, une amélioration de la technique LILBID s'est développée. Il s'agit de la désorption laser sur des microgouttelettes sous vide, que nous décrirons dans le chapitre suivant.

<b>ESI</b>	<b>MALDI</b>	<b>LILBID</b>
Production des espèces multichargées	Production des espèces monochargées	Produit des espèces ioniques de faible états de charges
Forte répulsion électrostatique entre les charges créés (déploiement et changement de structure en phase liquide)	Faible répulsion coulombienne (conservation de la structure native)	Faible taux de fragmentation (structure native conservée)
Ionisation d'un échantillon liquide (pertinence pour les études d'intérêt biologiques)	Ionisation d'une matrice solide (environnement biologique impertinent)	Jet liquide (milieu biologique pertinent)
Faible consommation (quelques $\mu\text{l}$ de solution et $\mu\text{M}$ de concentration pour obtenir un spectre de masse)	Faible rendement d'ions (par rapport au produit consommé) Faible densité des ions éjectés	Forte consommation de produit (jet continu)
Incompatibilité avec l'ajout d'un sel ou d'un détergent en solution	Tolérance au sel et aux détergents dans la matrice	Tolérance au sel et aux détergents
Les ions sont produits à $P_{\text{atm}}$ (Fragmentation due à l'activation des molécules avec le gaz résiduel)	Les ions sont produits sous vide (pas d'activation)	Ionisation par désorption laser sous vide (pas d'activation)
Reproductibilité du signal d'ions	Faible reproductibilité	Reproductibilité du signal d'ions
Ionisation douce avec production des espèces protonés ou déprotonés.	Ionisation douce avec création des espèces positives, négatives ou neutres.	Ionisation douce Fonctionnement en deux modes positif et négatif
Couplage à un spectromètre de masse	Couplage à la spectrométrie de masse, le plus souvent un TOF	Couplage à un spectromètre de masse

FIGURE 1.19 – Tableau comparatif des avantages (cases vertes) et des inconvénients (cases oranges) des trois techniques de mise en phase gazeuse décrites précédemment : ESI, MALDI et LILBID, pour les études d'endommagement de biomolécules à l'échelle moléculaire.

Nous allons maintenant rappeler les principes de base de la spectrométrie de masse qui est la technique usuelle permettant de caractériser les espèces mises en phase gazeuse par les sources précédemment décrites.

## 1.4 Spectrométrie de masse : Aspects historiques

La découverte de la spectrométrie de masse remonte aux travaux d'Eugen Goldstein en 1886, qui ont permis la mise en évidence des ions positifs. L'étude de la déflexion des rayons anodiques par un champ magnétique a été observé par Wilhelm Wien en 1898. Cette étude révèle que les particules composant les rayons anodiques n'ont pas toutes la même masse. Les premiers spectres de masses ont été enregistré par J.J. Thomson en 1912 pour les molécules :  $N_2$ ,  $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $CO$ , etc [57]. L'année suivante, Thomson découvre les deux isotopes  $A = 20$  et  $A = 22$  du néon. La construction d'un spectromètre à focalisation en direction [58] était une innovation apporté par A. J. Dempster en 1918 conduisant à l'amélioration de la sensibilité des dispositifs. En 1922, le chimiste et physicien Francis William Aston a introduit le tri des ions en fonction de leur vitesse [59]. Cette idée lui a permis de mesurer les abondances isotopiques du néon. Une nouvelle découverte est arrivée en 1936 par F. Penning qui a proposé de piéger des ions dans un très faible volume, par la combinaison d'un champ électrique et un champ magnétique (piège de Penning). Un autre type de piégeage, sans avoir recours à un champ magnétique, a été mis en place par W. Paul entre les années 1953 et 1960. Ce piège qui lui a valu un prix Nobel en 1989 utilise un champ radiofréquence pour piéger les ions. Le piégeage des ions trouve un intérêt majeur en spectrométrie de masse.

En 1955, Wiley et McLaren [60] ont développé le spectromètre de masse à temps de vol qui a permis de séparer des particules chargées selon leur rapport masse/charge.

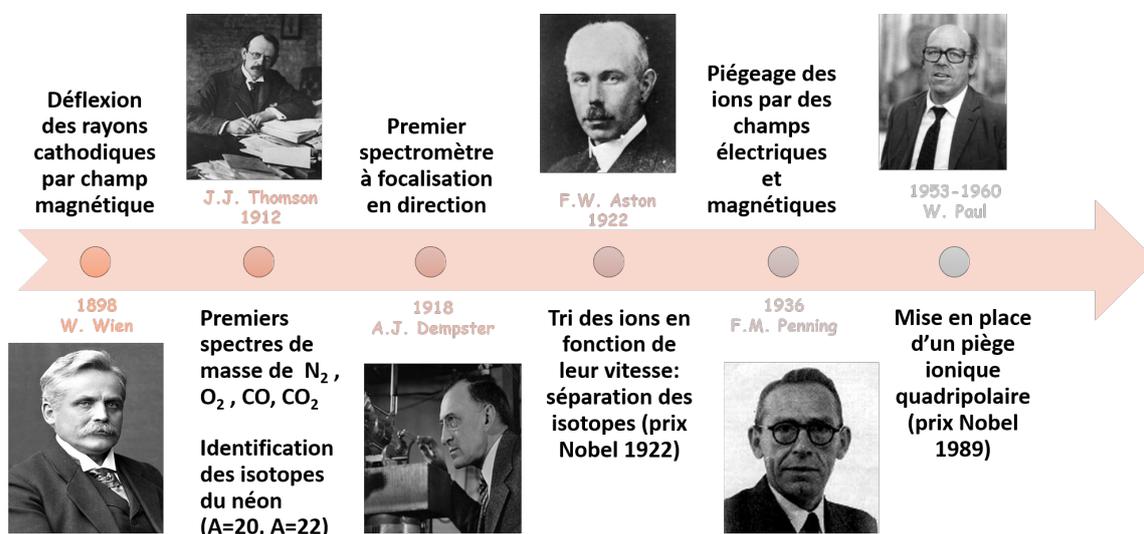


FIGURE 1.20 – Aspects historiques de l'évolution de la spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse est l'une des techniques les plus précises pour déterminer la masse molaire d'une molécule et ainsi identifier et caractériser sa composition chimique. Le principe consiste à séparer en phase gazeuse les ions moléculaires étudiés en fonction de la mesure de leur rapport masse sur charge. Cette technique

analytique est désormais un outil indispensable dans de nombreux domaines d'applications : l'astrophysique, le nucléaire, l'industrie chimique, la médecine et la biologie (par exemple l'analyse protéomique qui consiste à détecter et identifier une liste des peptides caractéristiques d'un virus par exemple, comme la COVID-19). Récemment la spectrométrie de masse a joué un rôle dans la recherche des infections virales SARS-CoV2 [61, 62], en utilisant une technique d'analyse par GC-MS (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) permettant la détection des composés organiques volatils (VOC) dans l'haleine de patients infectés (figure 1.21 - A). Une autre technique proposée par les mêmes auteurs, permet d'éviter les complications liées à l'analyse de la méthode (GC-MS) en utilisant des échantillons par prélèvement nasopharyngés qui seront déposés sur un papier ou une surface hydrophobe et élués avec un solvant puis vaporisés comme dans une source ESI. Un spectromètre de masse permet ensuite la détection des différents espèces moléculaires (figure 1.21 - B).

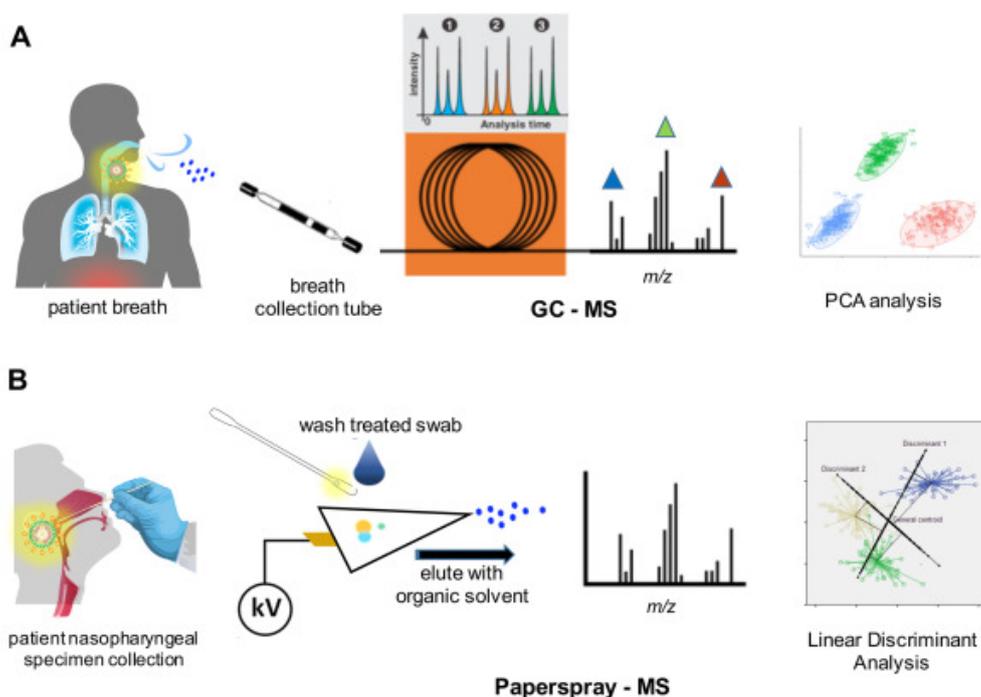


FIGURE 1.21 – Deux techniques utilisant la spectrométrie de masse pour la détection des infections virales SARS-CoV2 [61].

### 1.4.1 Structure d'un spectromètre de masse

Le résultat de la spectrométrie de masse est un histogramme qui représente selon l'axe des ordonnées l'intensité relative à l'abondance de chaque espèce, et selon l'axe des abscisses, la valeur du rapport  $m/z$ , où  $m$  représente la masse et  $z$  la charge de l'ion. Cette séparation des ions traduite par la séparation des pics repose sur le déplacement des particules chargées (ions positifs ou négatifs) dans un champ électromagnétique. Le spectromètre de masse se compose de trois parties distinctes :

1. Une source d'ionisation
2. Un analyseur
3. Un détecteur



FIGURE 1.22 – Structure d'un spectromètre de masse.

### 1) La source d'ionisation :

Le rôle de la chambre d'ionisation est de créer des ions en phase gazeuse. Nous avons décrit précédemment les sources de mise en phase gazeuse les plus communément utilisées (voir paragraphe 1.3). Ces sources permettent l'ionisation d'atomes, de molécules ou de clusters contenus dans un échantillon sous forme liquide (comme dans l'ionisation par électronébulisation et les jets liquides) ou solide (comme pour le MALDI). Le choix de la source dépend fortement de l'application souhaitée. En plus, de nombreux critères (par exemple la volatilité, la stabilité thermique du composé à analyser, la taille du système, les quantités de produit disponibles) ont une influence directe sur le choix de la technique d'ionisation la mieux adaptée.

Les sources d'ions peuvent fonctionner selon deux modes. Un mode positif (création des cations) et ou le mode négatif (création des anions). La façon d'obtenir des espèces ioniques n'est pas unique, elle dépend de chaque technique, on peut citer par exemple la protonation des sites basiques, la déprotonation des sites acides, la capture électronique, etc. D'autre sources permettent de travailler avec des espèces neutres, puis de les post-ioniser pour réaliser une spectrométrie de masse.

Il existe ainsi une multitude de façons d'obtenir des espèces en phase gazeuse, autres que les méthodes douces (flammes par exemple, utilisées pour produire des espèces en lien avec l'astrophysique). Cependant, on s'intéresse, dans le cas de notre développement expérimental, que je décrirai dans le chapitre (2), à une source douce de mise en phase gazeuse de type LILBID qui permet d'obtenir en phase gazeuse des espèces protonées ou déprotonées.

### 2) L'analyseur :

Les ions produits dans la source sont dirigés après mise en phase gazeuse dans l'analyseur sous l'action de champs électriques. Les analyseurs de masse permettent

Analyseurs	Résolution	Gamme $m/z$
Quadripôle (Q)	2 000	8 000
Magnétique (EB)	20 000	20 000
TOF	20 000	500 000
Trappe ionique	20 000	20 000
FT-ICR	1 000 000	4 000

TABLE 1.1 – Quelques ordres de grandeurs de la résolution en fonction de la gamme de masse pour plusieurs analyseurs.

de séparer les ions en fonction leur rapport  $m/z$ . Ainsi, la trajectoire d'un ion soumis à une force de Lorentz, appliquée sur l'ion situé dans un champ électrique et/ou magnétique, peut-être décrite à tout moment par le principe fondamental de la dynamique.

Il existe une multitude d'analyseurs de masse (voir 1.23). L'intensité du champ appliqué détermine la vitesse des ions dans l'analyseur. Cette intensité peut varier, selon le type d'analyseur utilisé, de quelques Volts (Quadripolaire, piège ionique, Résonance cyclotronique ionique) à plusieurs dizaines de kiloVolts (Temps de vol, Electrique, Magnétique).

Type d'analyseur	Acronyme	Principe de séparation
Secteur Electrique	E ou ESA	Energie cinétique
Secteur magnétique	B	Quantité de mouvement
Quadripolaire	Q	$m/z$ (stabilité de trajectoire)
Trappe d'ions	IT	$m/z$ (fréquence de résonance)
Temps de vol	TOF	vitesse des ions
Résonance cyclotronique	FT-ICR	$m/z$ (fréquence de résonance)

FIGURE 1.23 – Exemples de différents types d'analyseurs utilisés en spectrométrie de masse.

La sensibilité du spectromètre de masse varie selon le choix de l'analyseur. Un analyseur par temps de vol tel que nous le décrirons ultérieurement se situe parmi les analyseurs de haute résolution (20 000) pour une gamme de  $m/z$  de l'ordre de 500 000 (tableau 1.1).

### 3) Le détecteur :

Le rôle d'un détecteur est de compter le nombre des ions ayant été séparés par l'analyseur pour obtenir l'information finale sous forme d'un spectre de masse. Il existe plusieurs types de détecteurs (e.g : le cylindre de Faraday, le multiplicateur d'électrons, le multiplicateur de photons) qui reposent sur des principes de physique différents, mais avec le même rôle : celui d'amplifier le signal associé aux faibles courants d'ions incidents (de l'ordre de  $10^{-9}$  A) afin d'avoir un meilleur rendement en comptage.

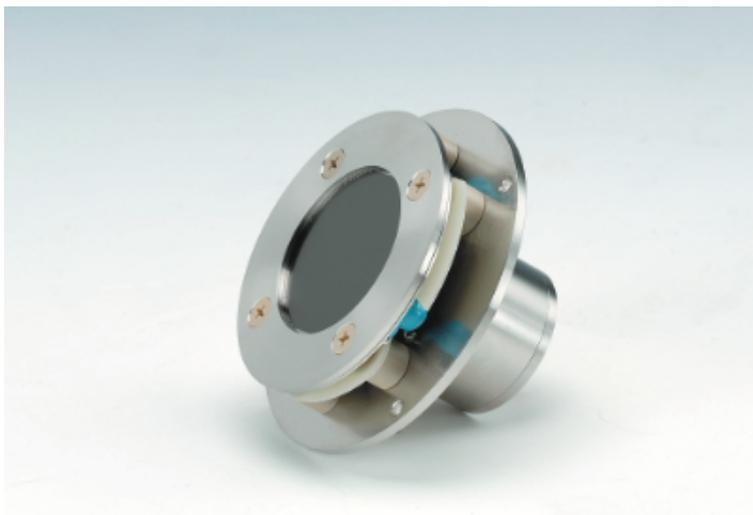


FIGURE 1.24 – photographie d'un détecteur à galettes à micro-canaux (MCP).

Pour notre expérience, nous avons utilisé un détecteur à galettes à micro-canaux (voir figure 1.24). Une galette à micro-canaux est un assemblage des multiplicateurs d'électrons placé sous vide. Il s'agit d'un réseau de  $10^4$  à  $10^6$  canaux situés parallèlement les uns par rapport aux autres. Chaque micro-canal fait un diamètre de  $10\ \mu\text{m}$  et une longueur de  $3\ \text{mm}$ . Ainsi, ce type de détecteur fonctionne de la manière suivante : une tension électrique appliquée entre la face arrière et la face avant de la galette permet de générer un champ électrique constant. Lorsqu'un ion atteint l'entrée du détecteur, celui-ci produira des électrons secondaires de plus faible énergie ; c'est le mécanisme d'émission secondaire.

Les électrons secondaires à leur tour vont être accélérés par le champ électrique et vont vers la seconde galette pour produire à nouveau le même mécanisme. Il en résulte une amplification du signal. Afin de produire un gain maximal, les micro-canaux peuvent être inclinés d'un petit angle (environ  $8^\circ$ ) par rapport à la surface de la galette pour que les ions puissent frapper les parois des micro-canaux et produire un maximum d'électrons secondaires. De plus, on peut associer par exemple deux galettes à micro-canaux assemblées en chevron.

Dans mon travail de thèse, j'ai travaillé sur différents types de spectromètres de masse. Ainsi, le travail de développement expérimental effectué au sein du LPL s'appuie sur un spectromètre de masse à temps de vol (voir section 1.4.2). C'est aussi un spectromètre de masse à temps de vol qui est utilisé à la station d'accueil 9 de FELIX (Free Electron Lasers for Infrared eXperiments) sur laquelle nous avons mené nos études structurales sur des cages moléculaires (cf. chapitre 5) et sur des complexes organométalliques (cf. chapitre 4). Une partie des études structurales a également été effectuée sur un FT-ICR (voir section 1.4.3) à CLIO (Centre laser infrarouge d'Orsay). Je vais décrire plus précisément le fonctionnement de ces deux types de spectromètres de masse dans la partie suivante.

### 1.4.2 Principe de fonctionnement de la spectrométrie de masse à temps de vol

Les différents analyseurs cités ci-dessus (figure 1.23) demandent des optiques ioniques qui sont parfois difficiles à mettre en œuvre. Le TOF (**Time-Of-Flight**) est l'analyseur dont la conception et le principe de fonctionnement reste le plus simple. Le faisceau d'ions quitte la source d'ionisation pour se diriger directement vers l'analyseur comme illustré sur la (Figure 1.25).

Le TOF est donc composé de deux parties. La «zone d'accélération» dans laquelle les ions seront accélérés sur une petite distance  $d$  sous l'action d'un champ électrique  $E$ . Il s'agit de deux électrodes qui sont portées à deux tensions différentes et constantes dans le temps, afin d'extraire ces ions dans la deuxième partie du TOF. Après cette accélération, les ions arrivent dans la deuxième partie du TOF appelée «zone libre de champs» où ils passent en ligne droite le long d'un tube de longueur  $L$  soumis à un vide poussé afin d'éviter les collisions avec le gaz résiduel. En l'absence de champs électriques ou magnétiques, les ions traversent cette zone de vol libre à une vitesse constante jusqu'au détecteur. Le temps  $t$  mis pour parcourir la distance  $L$  est proportionnel à  $\sqrt{m/z}$ , ce qui permet donc de séparer les ions suivant ce rapport masse sur charge et de déterminer ce rapport.

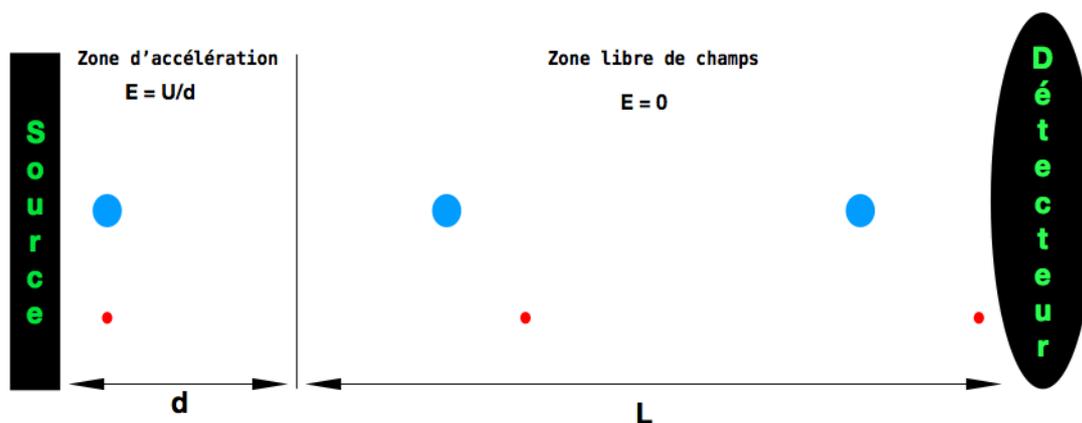


FIGURE 1.25 – Schématisation de la zone d'accélération suivie de la zone libre de champ. Les points rouge et bleu représentent deux ions de masse et de charge différentes.

L'énergie cinétique d'un ion de masse  $m$  et de charge  $q = ze$ , où  $e$  est la charge élémentaire, accélérée depuis le repos par un champ électrique de norme  $E$  sur une distance  $d$  est :

$$\frac{1}{2}mv^2 = zeEd \quad (1.2)$$

Or  $v$  est la vitesse de l'ion, elle s'exprime dans la zone libre de champs comme :

$$v = \frac{L}{t} \quad (1.3)$$

Ce qui donne :

$$t = L \left( \frac{m}{2zeEd} \right)^{1/2} \quad (1.4)$$

L'équation (1.4) montre que les ions de même rapport masse/charge arrivent en même temps au niveau du détecteur. En outre  $L$  et  $E$  sont fixes pour une expérience donnée, et le temps de vol,  $t$ , de l'ion est donc une mesure directe de son rapport  $m/z$ . Une réécriture de l'équation (1.4) donne :

$$\frac{m}{z} = 2eEd \left( \frac{t}{L} \right)^2 \quad (1.5)$$

La résolution en masse « $R_m$ » d'un spectromètre de masse à temps de vol est définie comme :

$$R_m = \frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t} \quad (1.6)$$

Avec  $\Delta t$  est la largeur en temps de vol mesurée expérimentalement par l'instrument. Cette résolution  $R_m$  définit la capacité à pouvoir séparer deux masses proches pour des ions de même charge  $q$ . Elle est proportionnelle au temps de vol. Une solution pour augmenter cette résolution consiste à allonger le tube de vol. Cependant, un tube de vol trop long diminue les performances des analyseurs du TOF à cause de la perte des ions après des collisions avec des molécules de gaz résiduel ou par dispersion angulaire du faisceau d'ions. Il est également possible d'augmenter le temps de vol en diminuant la tension dans la zone d'accélération mais ceci réduit la sensibilité de l'appareil. Par conséquent, la seule façon d'avoir à la fois une bonne résolution avec une bonne haute sensibilité est d'utiliser un long tube de vol d'une longueur de 1 à 2 m et une tension d'accélération de quelque dizaines de kiloVolt.

### Reflectron

Un autre moyen qui permet d'améliorer la résolution en masse d'un TOF est le reflectron. Ce système introduit par Mamyrin [63], permet de corriger la dispersion de l'énergie cinétique des ions quittant la source avec le même rapport  $m/z$ . D'ailleurs, la faible résolution d'un TOF dépend aussi de cette grande distribution d'énergie initiale des ions, de leur dispersion spatiale (point source) et temporelle. Le reflectron est une sorte de miroir électrostatique composé d'une série d'électrodes annulaires portées à des potentiels croissants, qui vont inverser la direction des trajectoires des particules chargées, afin de les focaliser sur le détecteur situé dans le même plan focal que la source (voir figure 1.26).

Lorsque deux ions de même rapport masse sur charge, quitte la source à des vitesses différentes, l'ion le plus rapide, pénètre plus profondément dans la zone de reflectron par rapport à l'ion le plus lent, qui rebrousse chemin plus rapidement. Donc

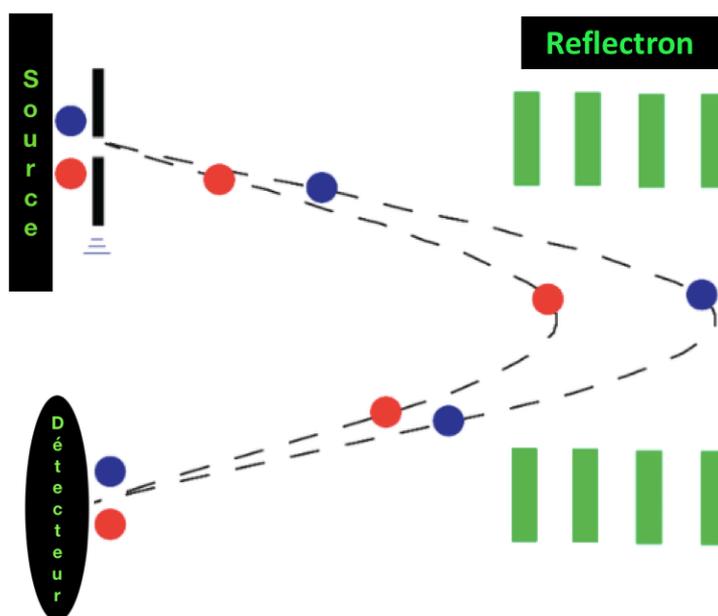


FIGURE 1.26 – Schématisation de la trajectoire de ions de même rapport  $m/z$  dans un reflectron. L'ion bleu est plus énergétique que l'ion rouge.

suite à cette focalisation, les deux ions arrivent en même temps sur le détecteur. On obtient ainsi une meilleure résolution. J'ai utilisé ce type de dispositif dans le montage de l'expérience de mobilité ionique à l'ILM pour l'étude des cages moléculaires (chapitre 5).

### 1.4.3 Spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR)

La résonance cyclotronique ionique (ICR) a été développée au début des années 1930 par Lawrence et ses collaborateurs [64, 65]. L'utilisation de cette technique en spectrométrie de masse a été introduite vers 1950 par Sommer et al [66, 67], et la combinaison avec la technique de transformation de Fourier (FT) a été développée par Comisarow et Marshall en 1974 [68]. En 1985, le couplage de sources externes à un analyseur FT-ICR a été réalisé pour la première fois [69, 70].

Les analyseurs de masse ICR sont capables de stocker des ions dans une cellule, comme dans le cas d'un piège à ions quadripolaire (tridimensionnelle ou linéaire). De manière générale, le piège à ions est destiné à accumuler des ions sur différentes échelles de temps. Ceci permet d'interroger le système piégé avec une sonde (lumière, électrons, ions...), d'améliorer la résolution d'un spectre (accumuler plus d'ions pour avoir plus de signal) ou de façonner le faisceau (pour avoir des paquets d'ions bien définis). Dans un piège à ions, les espèces chargées sont piégées en utilisant des champs électriques dynamiques (champ radiofréquence RF) et dans certains instruments par l'ajout d'un champ magnétique.

Dans une cellule ICR la géométrie varie d'un instrument à l'autre. Une cellule cylindrique est illustrée à la figure (1.27). Elle est constituée de trois paires de plaques opposées utilisées pour le piégeage, l'excitation et la détection. Le principe de séparation des ions dans cet analyseur repose sur la fréquence cyclotronique. Les ions de masse  $m$  et de charge  $z$  se déplaçant dans un champ magnétique spatialement uniforme d'intensité  $B$ , dirigé perpendiculairement à la direction de déplacement des ions, seront soumis à la force de Lorentz et circuleront dans la cellule avec une pulsation cyclotronique  $\omega_c$  selon :

$$\omega_c = 2\pi f_c = \frac{zB}{m} \propto \frac{1}{m/z} \quad (1.7)$$

L'équation (1.7) montre que tous les ions ayant la même fréquence cyclotronique  $f_c$ , indépendamment de leur vitesse initiale, sont de même rapport  $m/z$ . Par conséquent, la focalisation de l'énergie n'est pas essentielle pour la détermination précise de  $m/z$  comme dans un TOF. Les ions générés dans la source doivent être guidés dans la cellule.

Les ions peuvent être capturés dans la cellule en laissant entrer une petite quantité gaz dans la cellule de pression de l'ordre de ( $10^{-8}$  mbar). Lorsque les ions entrent en collision avec les molécules de gaz, ils changent de direction et sont donc affectés par le champ magnétique et commencent leur mouvement cyclotronique (un ion sans mouvement radial ne sera idéalement pas affecté par le champ magnétique). Cela augmente l'efficacité du piégeage et refroidit également les ions de la même manière que dans le piège à ions quadripolaire, les forçant ainsi à se rapprocher du centre de la cellule. Il existe une autre méthode de piégeage avec des électrodes sur lesquelles on applique des tensions continues permettant de convertir la composante d'énergie cinétique des ions parallèle au champ magnétique (c'est-à-dire dans la direction  $z$ ) en énergie cinétique perpendiculaire au champ magnétique. Comme il ne reste plus ou presque plus de composante de vitesse dans la direction  $z$ , les ions ne peuvent plus s'échapper du piège.

La méthode de détection des ions dans un instrument FTICR est différente de la majorité des autres spectromètres de masse, pour lequel les ions frappent un détecteur et sont donc perdus au cours du processus de détection. Pour détecter les ions piégés dans la cellule ICR, une tension RF est appliquée aux deux électrodes d'excitation figure (1.27). Les ions ayant la même fréquence ICR que la fréquence de la tension RF sont excités à un rayon orbital plus grand. Lorsque l'excitation est suffisamment élevée pour que les ions passent à proximité des plaques de détection, un petit courant est induit dans la plaque à chaque passage d'un ion. Comme les ions ont des fréquences ICR différentes en fonction de leur  $m/z$ , chaque fréquence de courant générée correspondra à un certain  $m/z$ .

Il est possible d'exciter non seulement un type d'ions, mais aussi les ions d'une certaine gamme  $m/z$  à un rayon orbital plus grand en appliquant aux plaques d'excitation une tension RF qui inclut toutes les fréquences correspondantes. Les électrodes du détecteur vont alors capter les signaux générés par tous les paquets d'ions qui tournent sur l'orbite excitée, ce qu'on appelle la détection à large bande. Chaque paquet induira un signal chaque fois qu'il passe devant l'une des électrodes et un

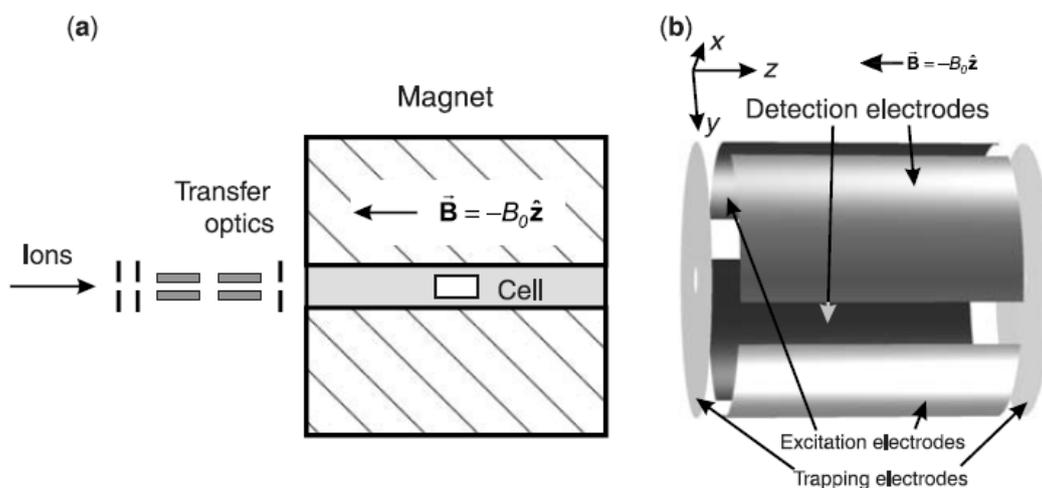


FIGURE 1.27 – (a) Schéma d'un spectromètre de masse à résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR). (b) cellule cylindrique. Image tirée de [71].

signal complexe dans le domaine temporel est acquis. Par transformation de Fourier du spectre temporel, on obtient un spectre de fréquence, qui peut à son tour être converti en un spectre de masse. Même si l'on enregistre pendant un temps très court, toutes les fréquences correspondant aux ions excités seront présentes dans les données transformées. Cependant, plus le temps d'acquisition est long, meilleure est la résolution.

## 1.5 Conclusion

La fonction biologique des biomolécules et la manière dont elles se reconnaissent sont intimement liées à leurs structures tridimensionnelles. Déterminer ces structures peut se révéler très complexe, et j'ai montré dans ce chapitre que les études menées en phase gazeuse présentent l'avantage important de travailler sur des systèmes bien déterminés, de stoechiométrie contrôlée. J'ai présenté les sources de mise en phase gazeuse "douces" les plus communément utilisées, notamment l'électrospray, que nous avons utilisée lors de nos études structurales sur des complexes organométalliques et sur des agrégats métalliques (chapitre 4), ainsi que lors de l'étude de cages moléculaires (chapitre 5), mais aussi le LILBID, qui est au coeur du développement expérimental que j'ai mené au sein de l'équipe BMS (chapitre 2). Coupler ces sources à des techniques d'analyse par spectrométrie de masse représente un outil puissant d'analyse physico-chimique, outil que j'ai utilisé en interrogeant au préalable les systèmes d'intérêt biologique étudiés avec des faisceaux IR. J'ai donc présenté plus en détail dans ce chapitre les deux types de spectromètres de masse avec lesquels j'ai été amené à travailler, le spectromètre de masse par temps de vol et le spectromètre de masse à résonance cyclotronique ionique. Avant de présenter ces études menées sur des dispositifs d'accueil, je vais présenter plus en détail dans le chapitre 2 le développement expérimental que j'ai réalisé sur une source de mise en phase gazeuse par désorption laser sur microgouttelettes. Outre l'intérêt que peut représenter cette source dans la

façon dont on peut préserver la structure native des biomolécules lors de leur mise en phase gazeuse, travailler sur des gouttelettes sous-vide ouvre des perspectives pour l'étude des phénomènes d'endommagement de biomolécules par des faisceaux d'ions (Annexe [A](#)).



## Chapitre 2

# Expérience de désorption laser sur microgouttelettes sous vide

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, il existe plusieurs techniques permettant d'obtenir des biomolécules en phase gazeuse, et la désorption laser en fait partie. Si dans le MALDI, la désorption se fait à partir d'une matrice solide, il est également possible de partir d'un milieu liquide (jet ou gouttelettes). Ceci présente plusieurs avantages : la distribution des biomolécules dans le liquide est plus homogène que dans une matrice solide, ce qui permet d'améliorer la reproductibilité expérimentale par rapport au MALDI. De plus, un milieu initial constitué d'eau liquide semble un bon point de départ pour l'étude de systèmes d'intérêt biologique. Partant de ces constats, le dispositif expérimental que j'ai contribué à développer est basé sur la désorption laser de microgouttelettes sous vide. Dans ce chapitre, je vais d'abord décrire le dispositif expérimental complet de l'expérience de désorption tel qu'il était quand j'ai commencé ma thèse. Je présenterai ensuite les différents développements et modifications que j'ai apportés à ce dispositif pendant ma thèse.

### 2.1 Description de l'expérience de désorption laser sur microgouttelettes

La figure (2.1) représente le schéma de l'expérience de désorption laser sur microgouttelettes sous vide telle qu'elle était lorsque j'ai commencé ma thèse. Cette expérience est inspirée de celle développée par l'équipe de Brutschy à Francfort [6] et par celle d'Abel à Göttingen [7].

L'expérience se divise en trois parties principales :

- une source de désorption permettant la mise en phase gazeuse des biomolécules,
- une zone d'extraction pour collecter les ions produits par la désorption,
- et un spectromètre de masse.

La source de mise en phase gazeuse se décrit de la manière suivante : les microgouttelettes contenant des biomolécules d'intérêt biologique sont générées à l'aide d'un distributeur commercial (voir paragraphe 2.1.1). Dans cette version de l'expérience, le

dispenseur était placé dans une enceinte (chambre 1 sur la figure 2.1) couplée à une pompe primaire pour maintenir la pression à environ 300 mbar. Une vanne à microfuite reliant cette enceinte à l'air atmosphérique permet d'ajuster la pression dans cette chambre pour respecter la pression minimale de fonctionnement du générateur qui est de 250 mbar.

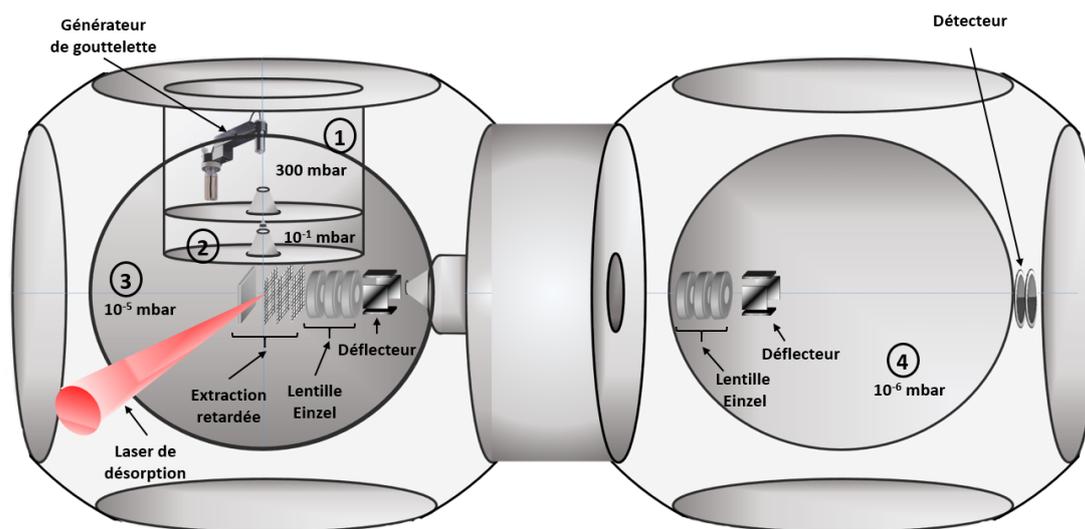


FIGURE 2.1 – Schéma de l'expérience de désorption laser sur microgouttelettes.

Les gouttelettes éjectées sont guidées sous vide à travers deux écorceurs. Le premier écorceur de 300  $\mu\text{m}$  de diamètre permet de séparer la chambre du générateur d'une chambre intermédiaire (chambre 2 sur la figure 2.1). Le second écorceur de diamètre 500  $\mu\text{m}$ , sépare la chambre intermédiaire de l'enceinte principale de désorption dans laquelle les gouttelettes sont irradiées par un laser IR. La longueur d'onde du laser de désorption est accordée sur la bande d'absorption du solvant utilisé. Le laser est donc focalisé sur les gouttelettes dans la chambre de désorption permettant de transférer les biomolécules instantanément en phase gazeuse sous vide. Cette enceinte est pompée par une pompe turbomoléculaire pour maintenir une pression de l'ordre de  $10^{-5}$  mbar. La chambre intermédiaire est pompée pour maintenir une pression inférieure à  $10^{-1}$  mbar au travers du second écorceur mais aussi directement par un pompage primaire.

La deuxième partie de cette expérience est constituée de la zone d'extraction. Les ions éjectés de la gouttelette sont collectés dans cette zone. La première zone d'extraction utilisée dans cette expérience était une zone d'extraction classique de type Wiley MacLaren [60]. Il s'agit de deux électrodes séparées d'une petite distance et placées sous vide. L'application d'une différence de potentiel entre les deux électrodes permet d'accélérer les particules chargées, qui sont ensuite analysées dans la troisième partie, celle du spectromètre de masse.

Lors de la désorption laser, les ions éjectés de la gouttelette possèdent une large

distribution de vitesses. Abel a mesuré des vitesses comprises entre 5000 et 8000 m.s<sup>-1</sup> pour des molécules éjectées d'un jet d'eau liquide par désorption laser IR [72]. Kohno et ses collaborateurs ont mis en évidence deux familles de vitesse, les ions rapides (1400 - 2300 m.s<sup>-1</sup>) et des ions lents (780 - 1500 m.s<sup>-1</sup>) obtenus par l'éjection d'agrégats d'aniline hydratés après irradiation d'un faisceau liquide par un laser IR dans la gamme d'énergie 0.5 - 8 mJ [55].

Cette grande distribution de vitesses se répercute sur la résolution des spectres de masse et conduit à des pics très élargis. Pour compenser cet élargissement, nous avons modifié la zone d'extraction pour utiliser, comme c'est couramment le cas en MALDI [73] une zone d'extraction retardée. Le système d'extraction retardée représenté sur le dispositif (figure 2.1) est formé d'un ensemble d'électrodes pulsées (voir sect. 3.3.3). Ce système permet de corriger les effets de la distribution de vitesses.

En effet, tous les ions arrivant entre les deux électrodes pulsées au moment d'une impulsion électrique, vont acquérir une énergie cinétique suffisante pour atteindre le détecteur. Par contre, ceux qui se trouvent en dehors de la zone d'extraction au moment du pulse ne bénéficient pas de cette énergie et donc ne seront pas détectés si leur énergie initiale est insuffisante pour arriver jusqu'au détecteur. Le rôle de cette extraction retardée est donc de faire une sélection en vitesse des ions en fonction de différents paramètres d'entrées (durée et délai du pulse notamment).

Les ions collectés dans la zone d'extraction sont ensuite analysés par spectrométrie de masse. Notre spectromètre de masse est un analyseur par temps de vol (TOF). Il contient des optiques ioniques (2 lentilles d'Einzel, 2 défecteurs) et un détecteur. Chacune des lentilles est formée de 4 plaques rectangulaires (voir figure 2.2) de la même dimension (71 mm × 41 mm × 2 mm). Les deux plaques extérieures sont toujours reliées à la masse. Elles sont percées d'un trou de 20 mm de diamètre. Tandis que les autres plaques sont percées d'un trou de 35 mm de diamètre et soumises à une tension non nulle.

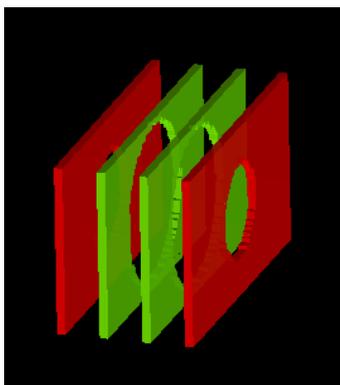


FIGURE 2.2 – Schéma représentatif de la lentille d'Einzel. Les plaques en rouge sont reliées à la masse et les deux autres (en vert) sont soumises à une tension non nulle.

Le rôle de ces lentilles est de collimater les ions au niveau du détecteur pour optimiser la transmission du spectromètre de masse. Le potentiel appliqué sur les

électrodes centrales de chaque lentille dépend donc des caractéristiques des ions qui les traversent.

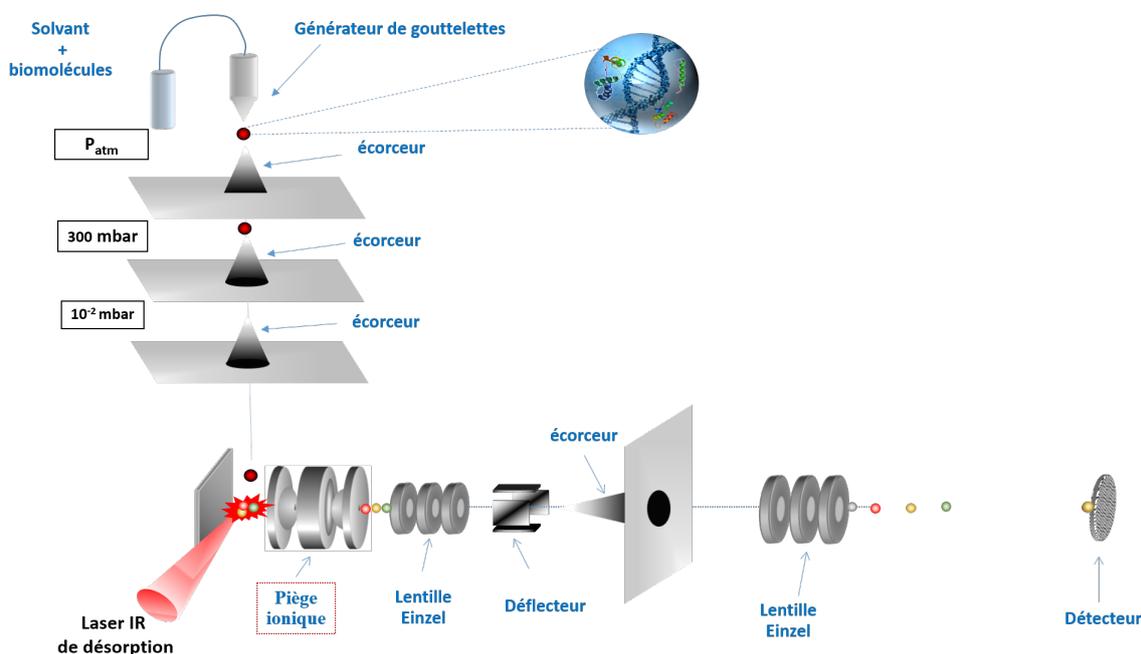


FIGURE 2.3 – Nouvelle source de désorption laser sur microgouttelettes sous vide.

Pendant ma thèse, j'ai effectué des changements ainsi que des développements expérimentaux de façon à optimiser cette source de désorption, avec plusieurs objectifs sous-jacents. Il s'agissait d'une part de rendre les réglages du dispenseur plus aisés (placé dans une enceinte sous vide, le dispenseur était peu accessible), et il s'agissait également de faire évoluer ce dispositif pour pouvoir l'utiliser à terme pour l'étude des effets indirects lors de l'endommagement de biomolécules par irradiation. La figure (2.3) représente le dispositif final permettant d'arriver à ce but.

Les grands changements par rapport à la première version de l'expérience étaient d'une part d'ajouter un étage de pompage différentiel pour pouvoir générer des gouttelettes à pression ambiante, en utilisant l'eau pure comme solvant<sup>1</sup>. En effet, dans le premier dispositif, il faut que la pression de vapeur saturante du solvant soit toujours plus faible que la pression de la chambre d'éjection. Pour pouvoir éjecter des gouttelettes d'eau, il faut que la pression dans la chambre reste au-dessus de 250 mbar, qui est la pression de vapeur saturante de l'eau à température ambiante (voir 2.1). Cette condition a été réalisée à l'aide d'une micro-fuite dont l'ouverture a permis d'ajuster la pression à environ 300 mbar. Cependant, les gouttelettes d'eau obtenues avec cette version du dispositif (figure 2.1) se sont révélées trop instables pour être guidées jusqu'à la chambre de désorption. Ceci est certainement lié à la faible viscosité de l'eau

1. Ceci n'était pas possible dans la première version de l'expérience, du fait de la tension de vapeur saturante élevée de l'eau. L'utilisation d'un solvant tel que le DiMéthylSulfOxyde était alors nécessaire.

qui rend l'éjection des micro-gouttelettes difficile, mais aussi à la conception du dispenseur qui est censé fonctionner à pression ambiante. Pour ces raisons d'instabilité, nous avons rajouté un solvant de DiMéthylSulfOxyde (DMSO) pour avoir un mélange (eau/DMSO) dans une proportion (1/4, 3/4). Ce solvant possède plusieurs caractéristiques. D'abord sa large bande d'absorption dans la gamme de longueur d'onde du laser de désorption, sa pression de vapeur saturante  $5.10^{-1}$  mbar bien adaptée aux conditions d'éjection et finalement son coût peu onéreux, ainsi que son efficacité pour dissoudre la plupart des composés organiques d'intérêt biologique.

Solvant	Pression de vapeur saturante (en mbar)	Viscosité dynamique (en Pa.s)
DMSO	$5,9.10^{-1}$	$2,14.10^{-3}$
H <sub>2</sub> O	23	$10^{-3}$

TABLE 2.1 – Comparaison des valeurs de la pression de vapeur saturante et de la viscosité entre l'eau et le diméthylsulfoxyde.

Un deuxième objectif de cette optimisation du dispositif était d'améliorer la résolution du spectromètre de masse en ajoutant un piège ionique de collection qui permettra à terme de mieux collecter les ions après la désorption mais aussi de définir un réel point source pour le TOF.

A plus long terme, une dernière modification serait un couplage de ce dispositif à une source d'ions atomiques monochargés permettant d'irradier les microgouttelettes en phase liquide pour étudier les effets de cette irradiation en phase gazeuse (voir Annexe A).

Tous ces changements ont demandé la conception et la fabrication de différents types de pièces mécaniques pour garantir le passage stable de la gouttelette sous vide à partir de l'atmosphère. Ce travail de développement instrumental, a ensuite nécessité de nombreux tests, qui pour le moment n'ont pas encore permis d'aboutir mais qui nous ont ouvert de nouvelles voies de développement pour cette optimisation. Je vais maintenant faire une description plus précise des différents éléments composant cette source, avant de présenter dans la suite plusieurs exemples de tests de caractérisation effectués pour son optimisation.

### 2.1.1 Génération des microgouttelettes

Le générateur de microgouttelettes est représenté sur la figure (2.4). Ce dispenseur commercial est fabriqué par la société allemande microdrop Technologies GmbH. Il fonctionne à pression atmosphérique à une fréquence allant de 1 à 6000 Hz. Il produit des microgouttelettes "à la demande" suite à une impulsion électrique. Le liquide contenant les biomolécules à étudier passe à travers un capillaire en verre d'un diamètre de 100  $\mu\text{m}$ , ce capillaire est entouré d'un matériau piézoélectrique (figure 2.5). Lorsqu'une impulsion électrique est appliquée sur ce dernier, un mouvement mécanique de contraction produit une onde de choc qui est transférée au liquide via

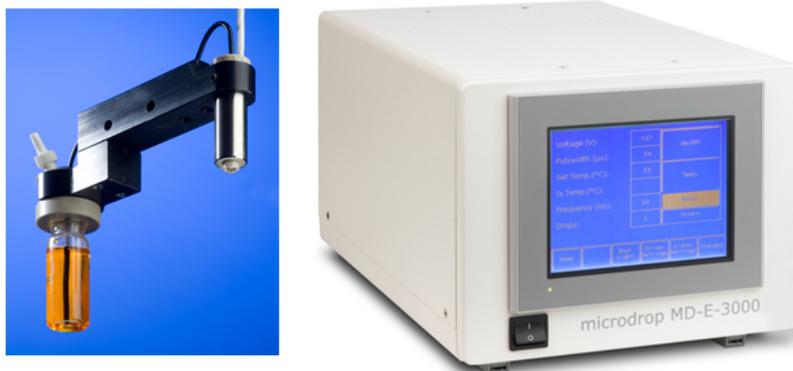


FIGURE 2.4 – À gauche : photo du dispenseur connecté au réservoir de 5 mL. À droite : générateur d'impulsion permettant d'ajuster les paramètres des impulsions électriques envoyés au dispenseur. Les images sont tirées du site [74].

le capillaire. Il en résulte, en sortie de ce capillaire, l'éjection d'une microgouttelette dont le diamètre et la vitesse dépendent des caractéristiques de l'impulsion et des caractéristiques géométriques de la sortie du capillaire.

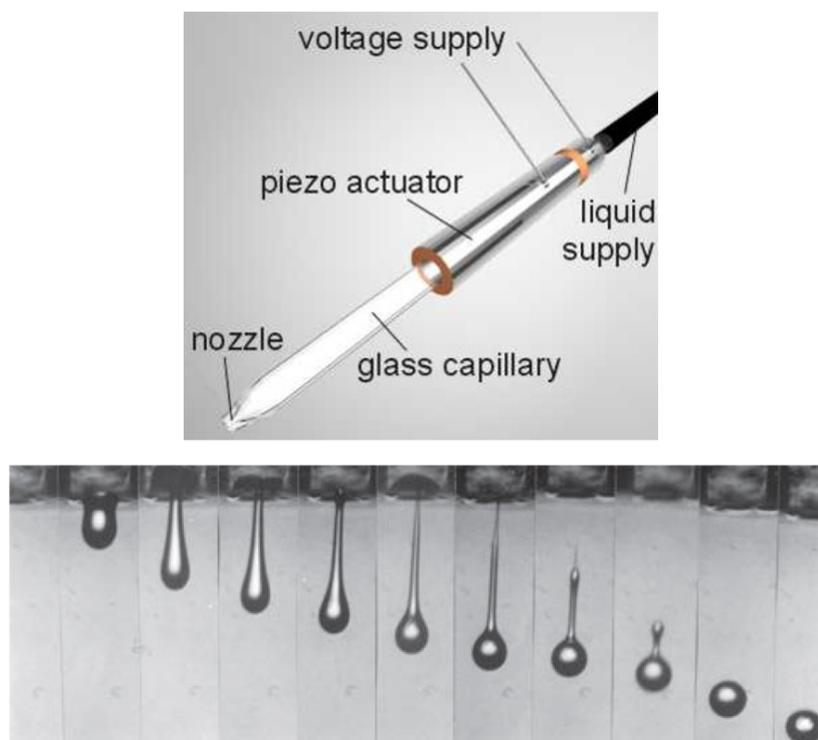


FIGURE 2.5 – En haut : schéma représentatif de principe du dispenseur Microdrop. En bas : la phase d'éjection d'une gouttelette par ce dispenseur.

Un générateur d'impulsion est aussi fabriqué par la même société. Il permet de choisir soigneusement la structure de l'impulsion électrique (figure 2.4) délivrée au piézoélectrique (forme du pulse : de 1 à 3 créneaux successifs, hauteur et largeur de chacun des créneaux). La forme de cette impulsion détermine en grande partie la forme des gouttelettes éjectées (taille, stabilité, vitesse), même si d'autres paramètres, tels que la viscosité et la température du solvant utilisé, peuvent aussi influencer la génération des gouttelettes. Ainsi, une nouvelle fonctionnalité de ce dispenseur, permet de contrôler la température de la buse. À ces réglages intrinsèques, s'ajoutent des réglages supplémentaires, liés au fait que dans notre expérience, le générateur de gouttelette est fixé sur des montures réglables en translation et en rotation. Il s'agit de platines piézo-électriques permettant des micromouvements dans les trois directions de l'espace, et des platines de rotation permettant un déplacement de quelques dizaines de degrés de grande précision, dans le but d'effectuer un alignement mécanique des gouttelettes le long de l'axe défini par les écorceurs.

### 2.1.2 Système d'imagerie *in situ* pour la visualisation des microgouttelettes

Un système de visualisation "miniature" a été mis en place *in-situ* à l'entrée de chacun des écorceurs séparant les différents étages du pompage différentiel, de façon à pouvoir suivre la trajectoire de la microgouttelette et optimiser son guidage depuis son éjection (figure 2.6) jusqu'à son arrivée au centre de la chambre de désorption. Les caméras utilisées sont des caméras CCD de petite taille (3.2 cm × 3.2 cm × 2.5 cm), et une diode pulsée est placée face à chaque caméra pour une visualisation par transmission et non par réflexion afin d'obtenir un meilleur contraste.

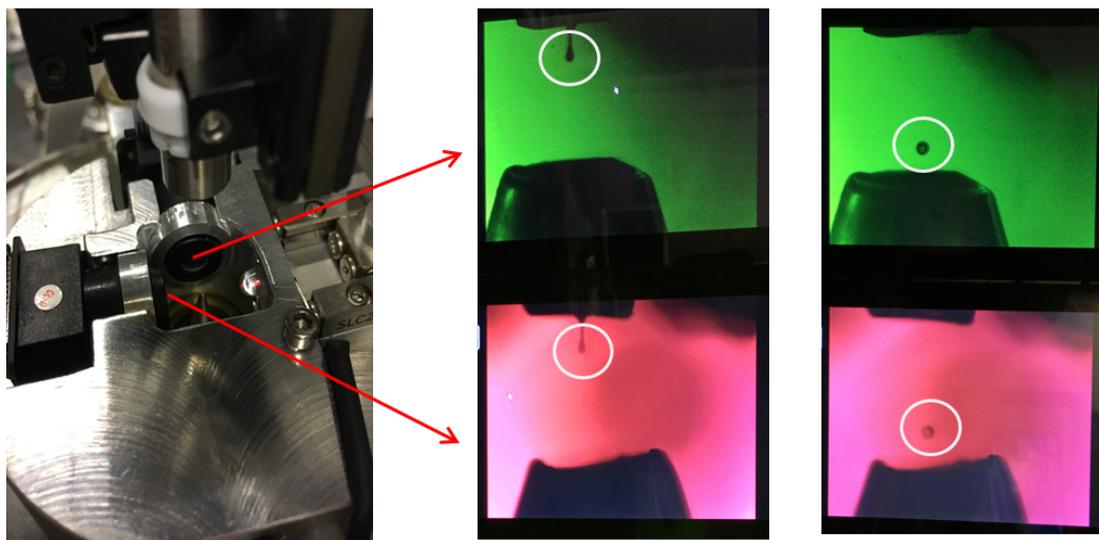


FIGURE 2.6 – Visualisation d'une gouttelette avec le système d'imagerie *in situ* à deux instants différents entre 0  $\mu$ s et 160  $\mu$ s. Le solvant utilisé dans ce test était du DMSO, le diamètre de la goutte est de 50  $\mu$ m.

Il y a au total dans la dernière version améliorée de notre expérience six caméras CCD : deux caméras orthogonales devant chaque écorceur. Le premier montage est celui représenté à gauche de la figure (2.6). Il permet de visualiser la micro-gouttelette de la sortie du capillaire jusqu'au sommet de l'écorceur 1 (image prise pour les deux instants  $t = 0$  et  $160 \mu\text{s}$ ) lors de son passage à pression ambiante. Ce système nous permet de contrôler la façon dont la gouttelette est éjectée (taille, forme, vitesse, direction) de façon à obtenir les gouttelettes les plus stables possibles. On peut également constater immédiatement un éventuel bouchage de la buse. Les autres montages ont été installés dans les autres enceintes sous vide. La taille miniature des caméras CCD est nécessaire du fait de l'espace réduit dans les différentes enceintes de pompage différentiel. En revanche, la mise au point d'un tel système est une tâche minutieuse à réaliser. Les caméras sont donc réglées et fixées manuellement pour donner une image nette de la goutte avec un bon grandissement dans un petit volume (figure 2.7). Les caméras sont toujours positionnées deux à deux de façon orthogonale pour vérifier la superposition de la gouttelette avec l'axe vertical défini par les ouvertures des trois écorceurs et le centre de la chambre de désorption. Une distance d'environ 9 mm sépare le haut de chaque écorceur de l'objectif de la caméra. Chacune des caméras CCD est reliée à un nano-ordinateur de la marque Raspberry Pi branché à un écran permettant la visualisation et l'acquisition des images.

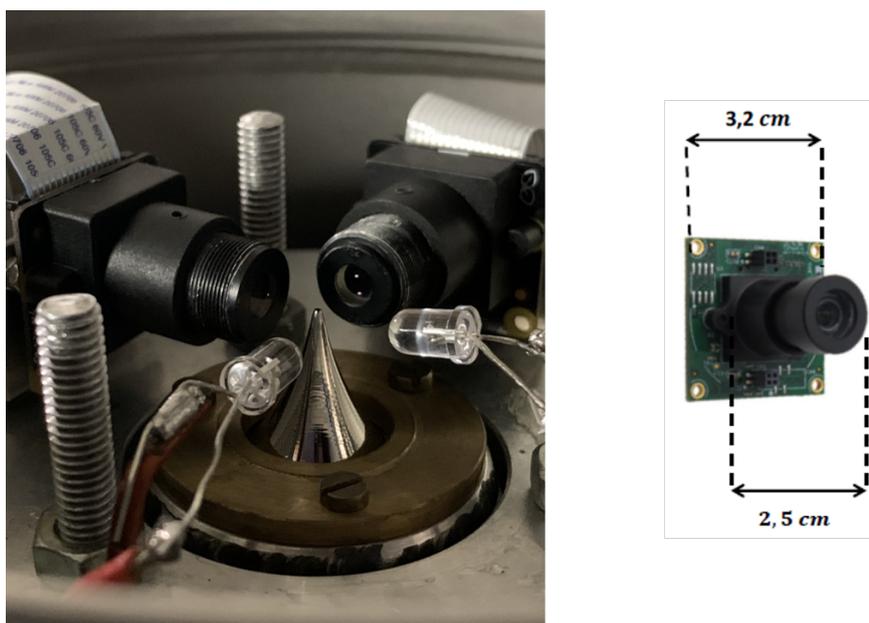


FIGURE 2.7 – À gauche : une photographie des caméras installées à 90 degrés l'une de l'autre avec une diode pulsée en face de chaque caméra CCD. Ce système d'imagerie est placée dans l'enceinte intermédiaire à 300 mbar. À droite : dimensions de la caméra CCD.

Lors du réglage du dispensateur, avant la mise en marche du laser permettant l'explosion des micro-gouttelettes, on travaille à une fréquence de 25 Hz. Ceci permet une observation confortable des gouttelettes par effet stroboscopique (la persistance rétinienne est de 50 ms). Lorsque le laser de désorption est en marche, c'est lui qui

impose la fréquence de fonctionnement de la source. Cette fréquence est de 20 Hz, et on observe alors un clignotement rapide des gouttelettes, qui n'entrave pas le suivi de la trajectoire mais qui est inconfortable et visuellement fatigant.



FIGURE 2.8 – Photographie du Générateur d'impulsions numérique informatisé.

La synchronisation de l'ensemble des impulsions électriques de l'expérience est une étape importante pour l'acquisition des données. Cette synchronisation est réalisée à l'aide d'une horloge produite grâce à un générateur d'impulsions numérique informatisé (figure 2.8) conçu et fabriqué par l'atelier électronique du laboratoire ISMO à Orsay et piloté par une interface Labview (figure 2.10). La fréquence de l'horloge détermine celle de fonctionnement de l'ensemble des appareils qui sont synchronisés sur elle, c'est-à-dire la fréquence d'éjection du dispenseur pour générer les gouttelettes, la fréquence des impulsions électriques envoyées sur toutes les diodes lasers pour produire les flashes lumineux et par la suite le déclenchement du laser de désorption ainsi que les alimentations électriques pulsées de la ligne d'extraction. En modifiant le délai entre l'impulsion d'une diode donnée et celle de déclenchement du dispenseur, on peut ainsi visualiser les gouttelettes à différents moments et donc à différents endroits dans la limite de la zone de mise au point de chaque caméra.

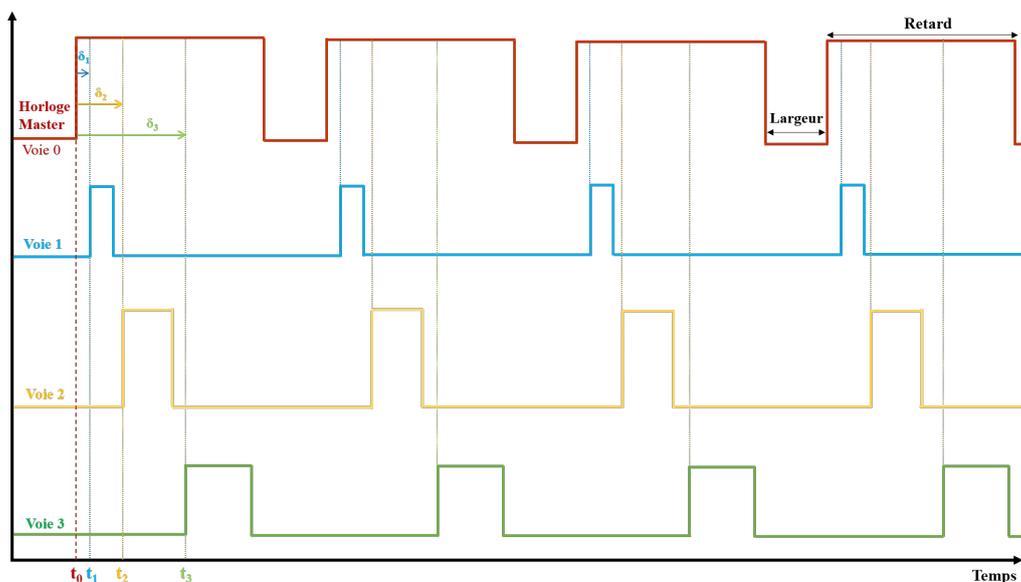


FIGURE 2.9 – Chronogramme représentatif d'une séquence temporelle des impulsions électriques envoyées aux diodes à différents délais et synchronisées par rapport à l'horloge maître. Pour mieux visualiser voir figure (2.30).

La figure (2.10) montre un exemple avec quelques paramètres utilisés en phase de réglage. Sur l'interface Labview qui permet de contrôler le GINI, la première colonne (voie 0) est dédiée au paramétrage de l'horloge. La fréquence choisie vaut 25 Hz, ce qui permet une observation confortable. Les 3 autres colonnes (voie 1, voie 2 et voie 3) correspondent chacune à l'impulsion délivrée au couple de diodes de chaque paire de caméras CCD, allant du première étage jusqu'au troisième étage. On choisit le délai (instant auquel on envoie l'impulsion électrique de la diode par rapport au zéro de l'horloge maître). La durée de cette impulsion (temps du flash lumineux) joue sur le contraste de l'image. Une valeur optimale pour un bon contraste varie entre 1 et 3  $\mu$ s. La figure (2.9) montre une schématisation de la séquence temporelle de la synchronisation des signaux réalisés par le GINI. Le dispensateur fonctionne à la même fréquence que l'horloge maître. Les différents délais ( $\delta_1$ ,  $\delta_2$  et  $\delta_3$ ) sont respectivement le temps séparant l'instant auquel on applique les impulsions sur chaque diode (voies 1, 2 et 3) par rapport à l'instant  $t_0$  du déclenchement de l'horloge maître.

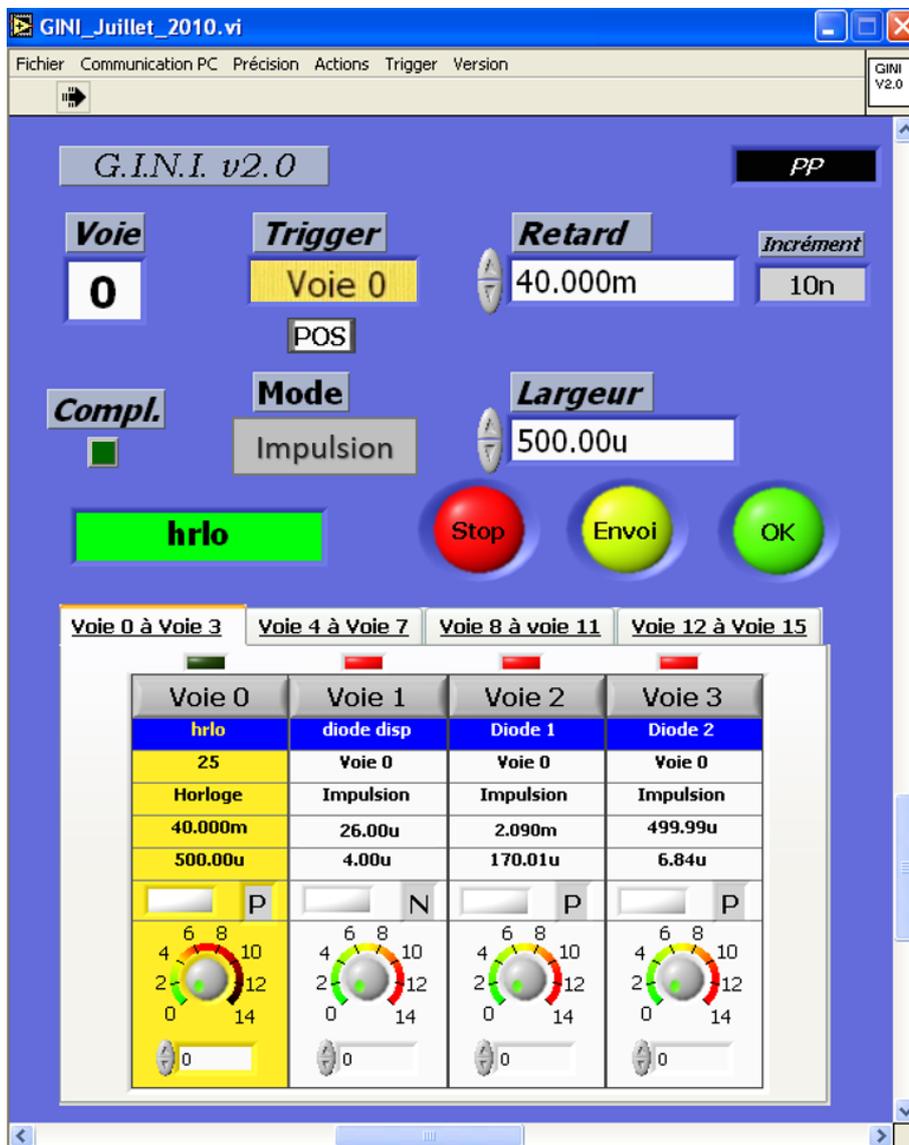


FIGURE 2.10 – Capture d'écran de l'interface Labview permettant le pilotage du GINI.

### 2.1.3 Laser de désorption : laser OPO

#### Principe de fonctionnement d'un laser OPO

Le laser utilisé pour effectuer la désorption des microgouttelettes sous vide est un laser OPO (Optical Parametric Oscillator). Il a été développé au sein de l'équipe BMS durant la thèse de Jean-Christophe Pouilly. Ce laser permet d'obtenir des impulsions brèves et intenses dans le domaine de l'IR autour de  $3 \mu\text{m}$  avec une densité de puissance de l'ordre de  $100 \text{ mW.cm}^{-2}$ . Cet ordre de grandeur de la puissance surfacique correspond à celui mesuré dans l'expérience de désorption laser sur microgouttelette [50]. Le fonctionnement de ce laser s'explique par un phénomène d'optique non-linéaire, contrairement aux lasers conventionnels basés sur le principe d'inversion de population réalisée dans un milieu amplificateur. Lorsqu'un milieu est traversé par un laser de pompe (Nd :YAG), l'émission de lumière par ce milieu est non linéaire, ce qui rend possible la création d'ondes à de nouvelles fréquences (doublées, triplées, etc...) différentes de celles du champ excitateur.

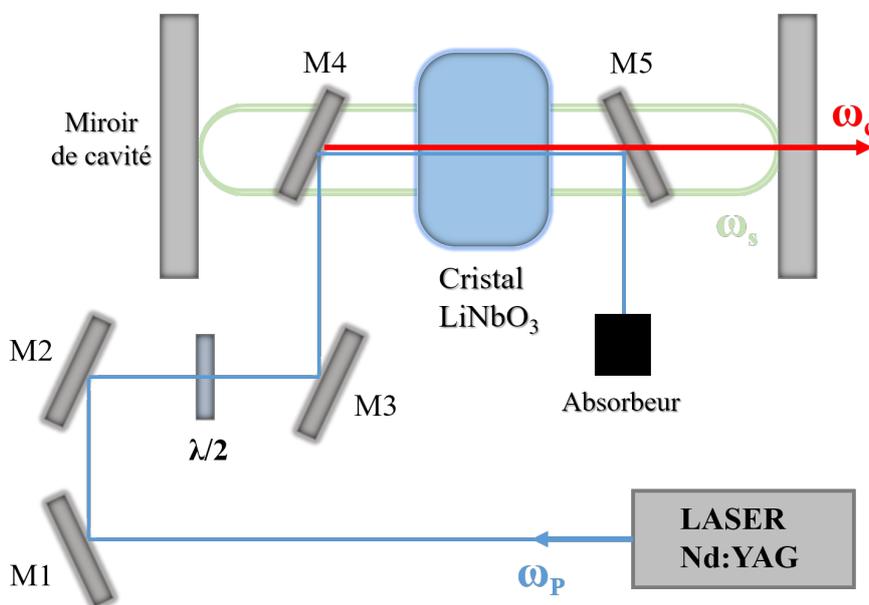


FIGURE 2.11 – Schéma de principe de notre oscillateur paramétrique optique (OPO). Le faisceau pompe  $\omega_p$  permet de générer deux autres faisceaux de pulsations  $\omega_s$  et  $\omega_c$ . Le laser de désorption IR à  $3 \mu\text{m}$  est celui représenté par une flèche rouge ( $\omega_c$ ).

Le cristal non-linéaire utilisé dans notre OPO est un cristal de Niobate de Lithium ( $\text{LiNbO}_3$ ) avec des propriétés de transparence aux longueurs d'ondes utilisées. Il est pompé par un laser Nd :YAG (Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet) impulsif nanoseconde à une longueur d'onde de  $1064 \text{ nm}$ . Le cristal non linéaire est placé dans une cavité formée de deux miroirs afin d'amplifier la lumière émise par le processus non-linéaire (voir figure 2.11). À l'issue de ce processus, deux nouvelles fréquences se rajoutent à la pompe. Il s'agit d'un photon dit signal et d'un autre photon dit complémentaire. On peut ainsi écrire l'équation de la conservation de l'énergie durant ce phénomène comme suit :

$$\omega_p = \omega_s + \omega_c \quad (2.1)$$

où  $\omega_p$ ,  $\omega_s$  et  $\omega_c$  sont respectivement les pulsations de chaque photon : pompe, signal et complémentaire. C'est le dernier de ces trois rayonnements qui nous intéresse. La condition de conservation de l'énergie (équation 2.1) est une condition nécessaire mais pas suffisante pour l'optimisation du faisceau. En effet, il faut également lors du processus non linéaire, que la quantité de mouvement de photons soit conservée. Cette deuxième condition s'appelle la condition «d'accord de phase» ou «quasi-accord de phase».

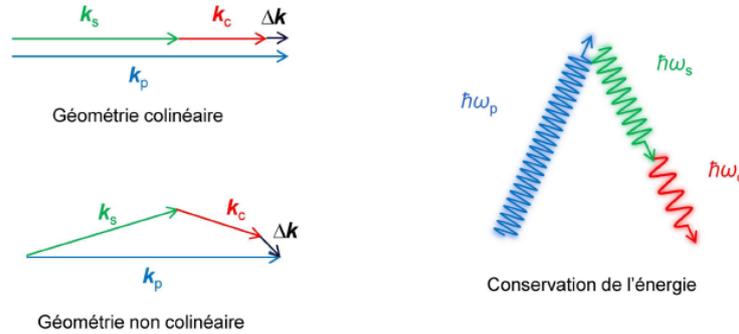


FIGURE 2.12 – Illustrations du désaccord de phase (cas colinéaire et non colinéaire) et de la condition de conservation de l'énergie dans le cas de l'interaction paramétrique optique (photo tirée de [75]).

Au fur et à mesure de la propagation dans le matériau d'épaisseur  $L$ , les ondes en interaction ne voient pas le même indice de réfraction, et donc n'ont pas la même vitesse de phase. Ce caractère dispersif, aboutit à un déphasage  $\Delta\Phi$  entre ces ondes (i.e. un déphasage entre les ondes générées et l'onde source). Selon le signe de déphasage ( $\Delta\Phi = \Delta k.L$ ), le transfert de l'énergie peut avoir lieu de la pompe vers les deux autres ondes ou vice versa, avec une période égale à  $2L_c$ , où  $L_c = \frac{\pi}{\Delta k}$  est la longueur de cohérence du processus, qui dépend de la relation du désaccord de phase ci-dessous (équation 2.2).

$$\Delta k = k_p - k_s - k_c = 2\pi\left(\frac{n_p}{\lambda_p} - \frac{n_s}{\lambda_s} - \frac{n_c}{\lambda_c}\right) \quad (2.2)$$

L'intensité des ondes mises en jeu dans le processus non linéaire détermine son efficacité. De plus, la condition d'accord de phase  $\Delta k = 0$ , permet de s'assurer que la phase relative conserve une valeur favorable à l'amplification paramétrique. Cette condition est réalisée en utilisant des cristaux biréfringents permettant de compenser la dispersion. En effet, on peut ajuster la valeur de l'indice optique vu par un faisceau en jouant sur son angle d'incidence et sur sa polarisation. La propagation de la lumière dans le cristal n'est pas la même selon les axes cristallographiques (axe ordinaire et axe extraordinaire) du matériau. Selon le premier axe, la variation d'angle d'incidence d'une lumière polarisée linéairement n'affectera pas l'indice. Par ailleurs, suivant l'autre direction, la même lumière polarisée perpendiculairement à la première, ne verra pas le même indice en fonction de l'angle d'incidence. Par conséquent, pour avoir un accord de phase, notre cristal est positionné sur une monture

de rotation, permettant de faire varier l'angle d'incidence, afin d'obtenir une superposition spatiale des trois faisceaux (voir la géométrie colinéaire de la figure 2.12).

La figure (2.11) montre le schéma de principe de notre OPO. Les miroirs (M1, M2, M3, M4 et M5) sont traités pour réfléchir la lumière de la pompe avec des pertes de l'ordre de 5%. La cavité entourant le cristal est aussi formée de deux miroirs ayant un coefficient de réflexion de 97% pour la gamme de longueurs d'onde entre 1,5 et 1,9  $\mu\text{m}$ . Elle est transparente pour le rayonnement à 3  $\mu\text{m}$ . La lame demi-onde ( $\lambda/2$ ) située avant (M3), permet de changer la polarisation de la pompe en une polarisation verticale pour assurer la condition d'accord de phase au sein du cristal. Le faisceau pompe ressortant du cristal est atténué par l'absorbeur.

La condition de conservation d'énergie (équation 2.1) possède une infinité de solutions qui permettent d'obtenir un couple de pulsations  $\omega_s$  et  $\omega_c$  dont la somme est égale à la pulsation du faisceau pompe  $\omega_p$ . En revanche, l'accordabilité finale d'un OPO est déterminée par la condition d'accord de phase. Dans le cas de notre laser, cette plage d'accordabilité varie entre 2,5  $\mu\text{m}$  et 4  $\mu\text{m}$ . Pour obtenir une fréquence précise du faisceau complémentaire  $\omega_c$ , il faut donc choisir l'angle d'incidence entre le faisceau pompe et le cristal, conduisant à la condition de l'accord de phase ( $\Delta k = 0$ ). Néanmoins, il existe une plage de fréquences, pour laquelle la condition de désaccord de phase est très faible et qui conduit en même temps à une conversion avec un gain non négligeable qui peut subsister dans la cavité. Dans ce cas, cette distribution de pulsations dite acceptation angulaire, produit un élargissement spectral du faisceau complémentaire qui est estimé à 50  $\text{cm}^{-1}$ , et qui dépend des propriétés du faisceau pompe, du cristal et de l'angle d'incidence entre les deux.

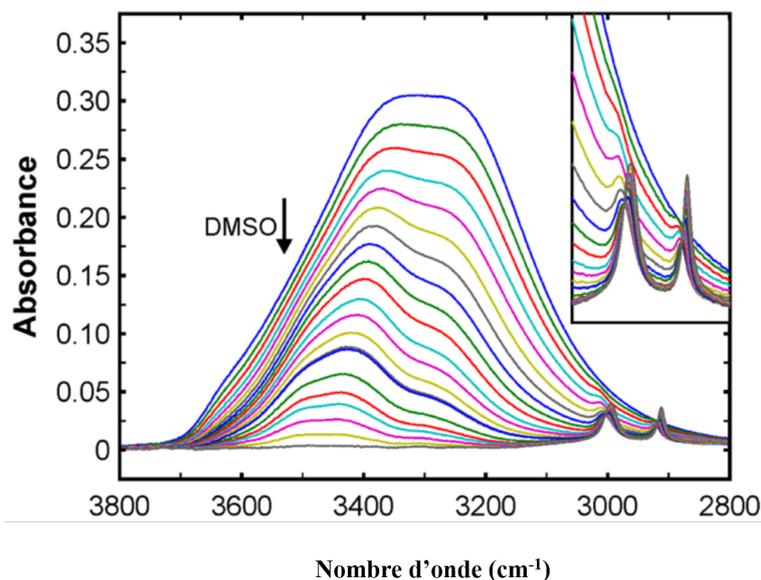


FIGURE 2.13 – Spectres d'absorption d'une solution eau-DMSO pour différentes proportions du mélange, entre 3800 - 2800  $\text{cm}^{-1}$  [76]. Cette gamme de longueur d'onde située entre 2,63 et 3,57  $\mu\text{m}$  correspond à la plage de notre laser OPO accordable autour de 3  $\mu\text{m}$ .

La large bande spectrale de notre laser de désorption n'est pas un inconvénient

pour la désorption des micro-gouttelettes sous vide, dans la mesure où l'on cherche simplement un recouvrement suffisant avec les bandes d'absorption du solvant utilisé, elles-mêmes assez larges. Comme expliqué précédemment, on utilise un mélange eau-DMSO pour des raisons de stabilité. La figure (2.13) présente les spectres d'absorption de mélanges eau/DMSO dans différentes proportions, ainsi que la gamme spectrale de notre OPO.

#### 2.1.4 Extraction et détection

Comme je l'ai évoqué dans le chapitre précédent (sect. 1.4.2), les ions générés par notre source de désorption laser sur microgouttelettes sont extraits et analysés en masse par un spectromètre de masse à temps de vol.

Dans un premier temps la ligne d'extraction installée dans ce TOF était une zone d'extraction "classique" composée de deux électrodes portées chacune à un potentiel constant. La différence de potentiel entre les électrodes permet de créer un champ électrique qui va accélérer les ions désorbés de la gouttelette qui se trouve irradiée entre ces deux plaques.

Nous avons été amenés par la suite à la remplacer par une ligne d'extraction dite "retardée" dont je détaillerai le fonctionnement dans le chapitre suivant. Brièvement cette ligne d'extraction retardée, telle que décrite par Wiley et McLaren [60] et communément utilisée en MALDI [73, 77], permet de corriger les effets d'élargissement des pics dus à la grande distribution de vitesse initiale et donc d'améliorer la résolution en masse (voir paragraphe 2.2.3). Pour ce faire, les tensions appliquées sur les électrodes d'une extraction retardée sont pulsées et peuvent être déclenchées après un délai temporel bien défini par rapport à l'impulsion laser.

Dans les deux cas, le faisceau d'ions est ensuite focalisé sur un écorceur qui sépare la chambre de désorption de la chambre de mesure, cette dernière contient un détecteur à galettes à micro-canaux qui permet la détection et le comptage des ions.

## 2.2 Résultats expérimentaux (caractérisation de l'ancien dispositif)

### 2.2.1 Mise en phase gazeuse d'un nonapeptide

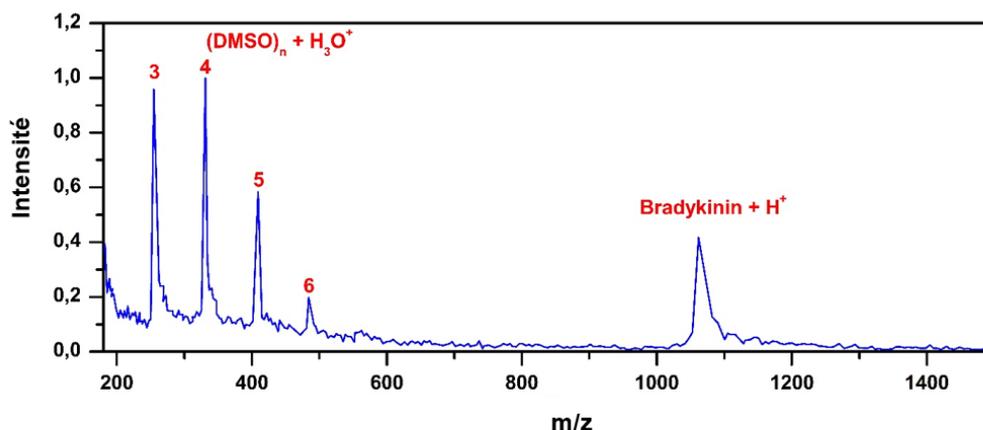


FIGURE 2.14 – Spectre de masse obtenu par désorption laser des microgouttelettes de bradykinine dans un mélange contenant de l'eau et du DMSO (1/4 - 3/4) pour une concentration de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . L'énergie du laser IR vaut 3 mJ.

La figure (2.14) représente le spectre de masse obtenu lors de la désorption de gouttelettes contenant de la bradykinine avec la première version de la source décrite en section (sect. 2.1) dans la figure (2.1). La bradykinine est un nonapeptide de masse molaire  $1060 \text{ g.mol}^{-1}$ . Elle est fabriquée sous l'action d'une enzyme libérée dans la sueur et joue le rôle d'un vasodilatateur (i.e. substance qui permet la dilatation des vaisseaux sanguins afin de diminuer la pression artérielle). Cette molécule dont la structure est représentée sur la figure (2.15) a été étudiée dans l'équipe à l'aide d'une source ESI.

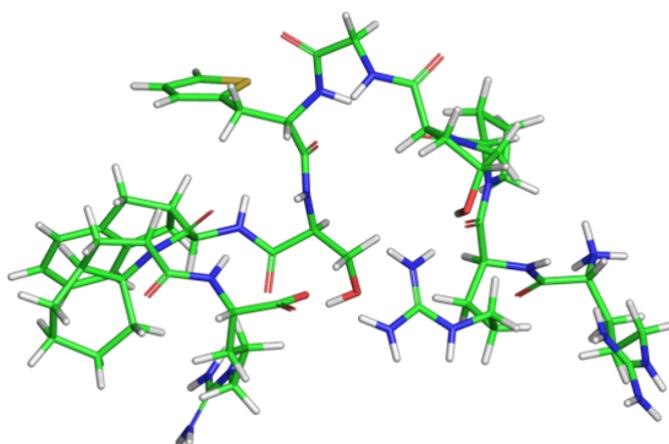


FIGURE 2.15 – Structure de la bradykinine.

Le laser de désorption (laser OPO à 3  $\mu\text{m}$ ) est focalisé sur la trajectoire des gouttelettes entre deux électrodes d'une extraction classique et les tensions sont choisies de façon à observer des espèces positives. Le spectre (2.14) montre la bradykinine protonée et les agrégats de solvant de petit rapport  $m/z$  tels que  $\text{H}_3\text{O}^+(\text{DMSO})_n$  avec  $n=3-6$ . Ces agrégats sont également observés dans des études menées sur la microhétérogénéité du mélange eau-DMSO [78].

La désorption des ions de la bradykinine sous vide a permis de mettre en évidence la capacité de notre source de désorption à mettre en phase gazeuse une molécule d'intérêt biologique sans fragmentation. De plus, le choix de ce nonapeptide contenant deux résidus basiques, montre également la capacité des techniques LILBID de produire des espèces de faible état de charge. D'après, Brutschy et al. [79] la raison pour laquelle les ions désorbés possèdent des faibles états de charge est la forte recombinaison ion-ion (neutralisation) au cours de la désorption.

### 2.2.2 Mise en phase gazeuse d'un complexe non covalent

Nous avons également étudié la capacité de notre source de désorption à préserver des interactions faibles lors de la mise en phase gazeuse, en réalisant la désorption d'un complexe non covalent. Nous avons choisi le complexe formé entre la vancomycine et un tripeptide analogue du précurseur membranaire sur lequel elle se fixe (figure 2.16). Cette molécule a été étudiée par l'équipe auparavant, en spectroscopie IRMPD (Infra Red Multi Photon Dissociation), dans le but d'obtenir des informations sur le site d'attachement du récepteur à la vancomycine. La mise en phase gazeuse dans cette étude antérieure s'est réalisée par une source ESI (sect. 1.3.2).

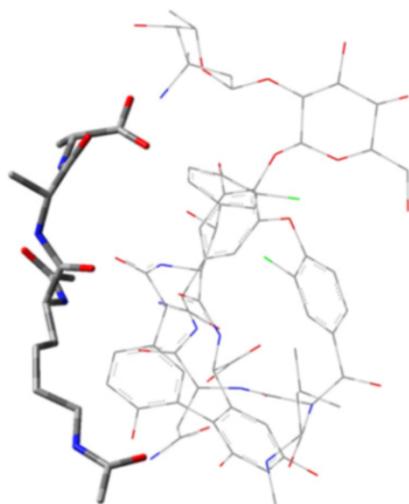


FIGURE 2.16 – Structure de la vancomycine et son récepteur membranaire.

Le spectre de masse de la figure (2.17), obtenu par notre source de désorption décrite précédemment (sect. 2.1), atteste par la présence du pic correspondant au complexe non covalent de la vancomycine  $\text{Ac}_2^{\text{L}}\text{K}^{\text{D}}\text{A}^{\text{D}}\text{A}$  du caractère "doux" de l'io-

nisation<sup>2</sup> lors de la mise en phase gazeuse de la molécule de vancomycine et son récepteur membranaire.

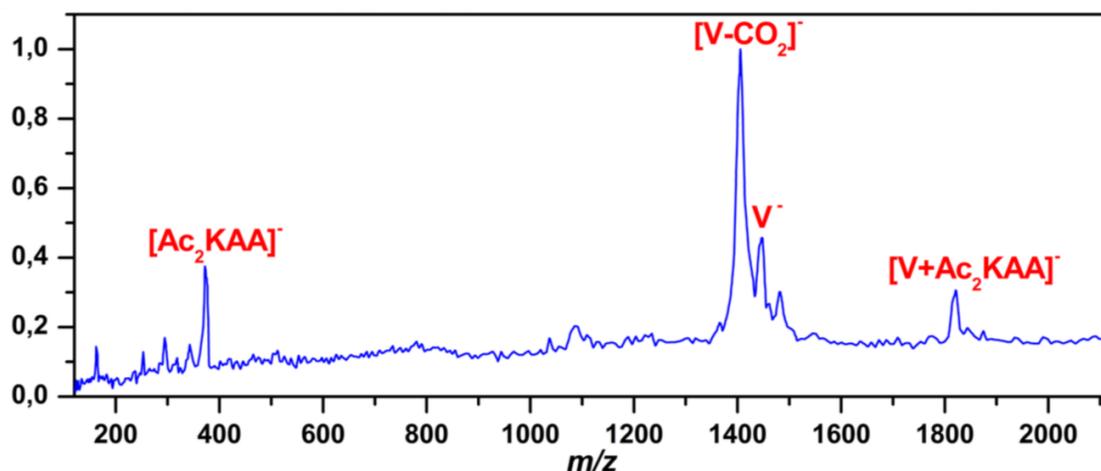


FIGURE 2.17 – Spectre de masse obtenu par désorption laser de microgouttelettes contenant de la vancomycine ( $V$ ) et le tripeptide  $Ac_2^L K^D A^D A$  dans un mélange d'eau et de DMSO ( $3/4 - 1/4$ ) pour une concentration de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . L'énergie du laser IR vaut  $3 \text{ mJ}$ . Le délai d'extraction est de  $8 \mu\text{s}$ .

D'autre part, cet exemple confirme que notre source nous permet d'obtenir des espèces de faible état de charge : on observe, sur le spectre, la vancomycine déprotonée une seule fois. Enfin, la vancomycine ayant tendance à perdre très facilement un groupement  $\text{CO}_2$ , l'utilisation de cette molécule est donc un test très sensible sur la capacité de la source à limiter la fragmentation lors de la mise en phase gazeuse. Afin de caractériser plus en détail cette capacité, l'influence de l'énergie laser sur la fragmentation sera discutée dans la partie (2.2.4).

### 2.2.3 Amélioration de la résolution en masse

#### Ligne d'extraction retardée

Le pouvoir de résolution associé aux spectres de masse précédents est assez faible. Il vaut environ  $m/\Delta m \approx 12$  pour un  $m/z$  de l'ordre de 1000. En effet, lors de la désorption, les ions éjectés par la gouttelette possèdent une large distribution de vitesses. Cette dispersion d'énergie cinétique initiale est l'une des causes de la dégradation de la résolution du spectromètre de masse par l'élargissement des pics.

La figure (2.18) montre l'effet du couplage d'un système d'extraction retardée à la source de désorption. En comparant les spectres de temps de vol de la bradykinine pour ces 2 types d'extraction, on constate une nette amélioration de la résolution en masse. Alors que le pouvoir de résolution est d'environ 18 à  $m = 1000 \text{ Da}$  ( $41 \mu\text{s}$ )

2. On peut également observer ce complexe non covalent en phase gazeuse via une mise en phase gazeuse par ESI mais sous des conditions de source assez tenues à réaliser.

sans extraction retardée (spectre du haut), il est amélioré par un facteur d'environ 5 par la présence d'extraction pulsée (spectre du bas) ; on retrouve pour la même masse ( $m = 1000$  Da) un pouvoir de résolution de 85.

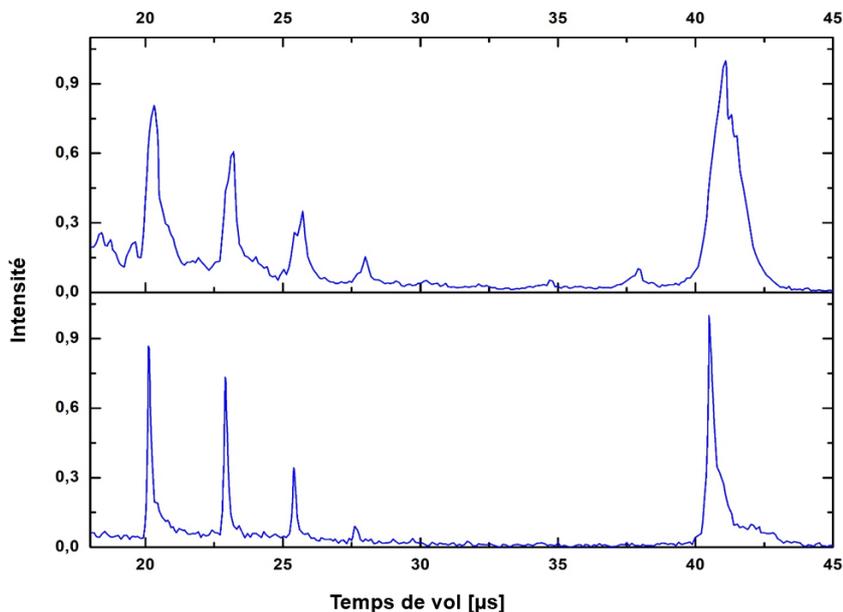


FIGURE 2.18 – Effet de l'extraction retardée sur la résolution des spectres de masse obtenu par désorption laser des microgouttelettes de bradykinine dans un mélange eau et DMSO ( $1/4 - 3/4$ ) pour une concentration de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . L'énergie du laser IR vaut 3 mJ

## 2.2.4 Influence de l'énergie laser sur les espèces désorbées

Le phénomène de désorption est très dépendant de l'énergie déposée par le laser, mais également de la longueur d'onde utilisée. Selon ces deux caractéristiques, l'explosion de la gouttelette peut être plus ou moins isotrope, et le signal d'ion récupéré dépend clairement de ce caractère isotrope. Un autre paramètre physique qui caractérise le processus de désorption est la profondeur de pénétration du laser au sein du solvant irradié. Nous reviendrons dans le chapitre (3) sur une description plus détaillée des différents modèles proposés pour l'explication du processus de désorption. Le chapitre (3) portera donc sur des simulations ayant pour but d'obtenir des informations sur ce processus de désorption encore mal compris.

En attendant, nous allons décrire une étude expérimentale de l'explosion d'une microgouttelette en fonction des caractéristiques du laser de désorption.

On observe, d'une part, le processus de vaporisation de la gouttelette sous vide (photographies de la figure 2.19) pour une désorption laser de faible énergie de 0.7 mJ. On obtient deux cas de figures selon la valeur de la longueur d'onde utilisée dans cette désorption. Le premier cas est une explosion isotrope obtenue lorsque la longueur d'onde est légèrement décalée vers le rouge par rapport à celle d'absorption du solvant. Cette désorption est visualisée par les trois images du haut de la figure (2.19) prises à différents instants. Le deuxième cas est celui d'une désintégration anisotrope

de la gouttelette (représentée par les images du bas de la figure 2.19) lorsque la longueur d'onde du laser est résonnante avec la bande d'absorption du solvant. Dans ce cas, la faible profondeur de pénétration ne permet pas d'avoir un signal d'ions. Tandis que l'expansion isotrope issue d'une forte profondeur de pénétration, nous permet d'extraire avec notre ligne d'extraction retardée, un signal d'ions mesurable.

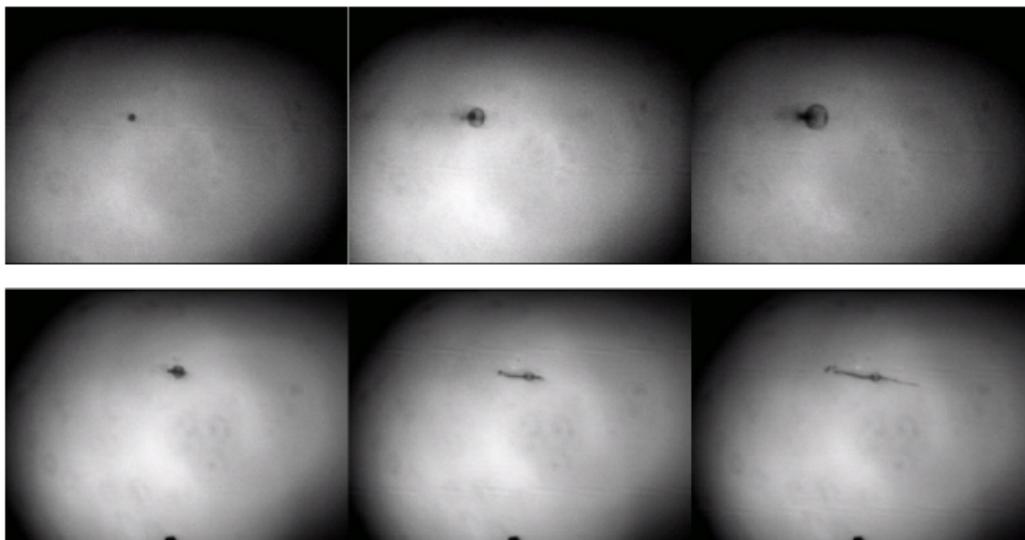


FIGURE 2.19 – Photographie de la gouttelette lors du processus de désorption dans l'ancien dispositif (cf. 2.1). L'évolution temporelle (séquence en haut) représente une expansion plus ou moins isotrope dans la direction perpendiculaire au pulse laser (le délai varie de  $\Delta t = 0 \mu s$ ,  $\Delta t = 2 \mu s$  et  $\Delta t = 20 \mu s$  de gauche à droite). En bas, la séquence représente une explosion anisotrope de la goutte pour les délais  $\Delta t = 0 \mu s$ ,  $\Delta t = 3 \mu s$  et  $\Delta t = 20 \mu s$ .

D'autre part, la figure (2.20) montre des spectres de temps de vol obtenus suite à la désorption de gouttelettes de DMSO contenant de la vancomycine (concentration de  $10^{-4}$  M), pour un délai d'extraction de  $8 \mu s$  (spectres obtenus avec la ligne d'extraction retardée). L'intensité du signal lié à la vancomycine dans ce spectre dépend de l'énergie laser. Il existe une énergie seuil de 1.5 mJ pour laquelle on observe l'apparition de l'anion ( $V^-$ ) avec peu de fragmentation. Lorsque l'énergie du laser de désorption augmente, l'intensité du pic de vancomycine augmente également mais le pic lié à la perte d'un groupement carboxyle augmente également fortement. À 3 mJ, on observe la saturation de l'intensité du pic de vancomycine et une intensité élevée du pic lié à la perte de  $CO_2$ . Par conséquent, l'énergie laser optimale permettant d'obtenir le signal le plus intense avec le moins de fragmentation se situe donc en dessous de 3 mJ.

Parallèlement, l'étude de cette molécule, comme nous l'avons déjà noté précédemment, est un bon test pour notre source, en tant que source d'ionisation douce (Soft ionization), du fait qu'elle a tendance à se fragmenter facilement par la perte d'un groupement carboxylique<sup>3</sup> ( $CO_2$ ).

3. Cette perte du groupement carboxylique du résidu dihydroxyphenylglycine correspond au produit le plus abondamment observé dans les spectres CID à basse énergie de la vancomycine [80].

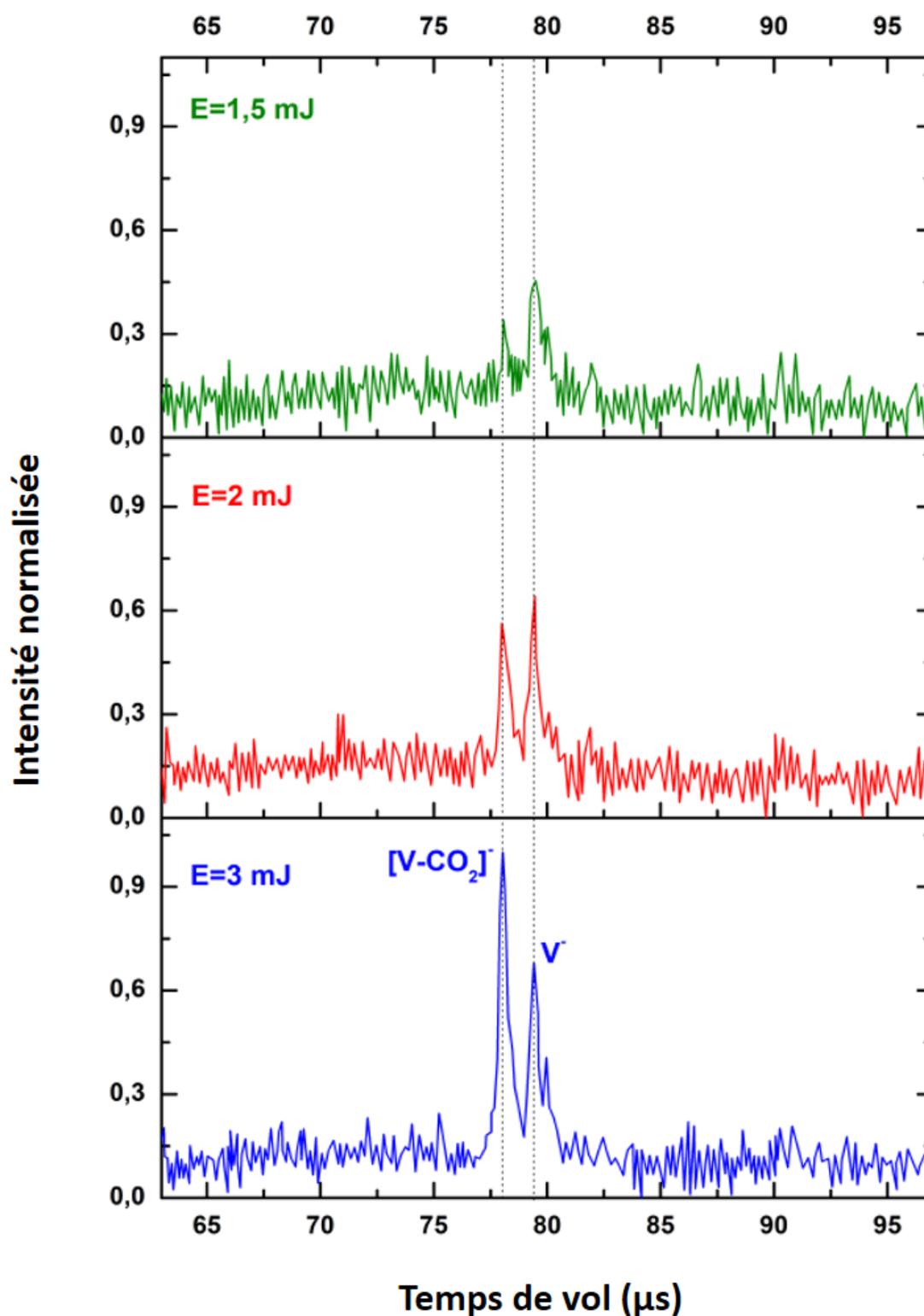


FIGURE 2.20 – TOF (temps de vol) des ions désorbés à partir d’une microgouttelette contenant de la Vancomycine ( $10^{-4} \text{ M}$ ), pour différentes énergies du laser de désorption, pour un délai de  $8 \mu\text{s}$ .

## 2.3 Développements instrumentaux

### 2.3.1 Objectifs et contraintes

Comme je l'ai indiqué précédemment, l'un des objectifs du développement instrumental que j'ai effectué pendant ma thèse est de pouvoir travailler avec le dispenseur à la pression atmosphérique par rapport à la première version de l'expérience où il était placé dans une enceinte à 300 mbar (figure 2.1). L'objectif de ce changement est de pouvoir former des microgouttelettes contenant uniquement de l'eau, qui est un solvant se rapprochant davantage d'un environnement biologique pour nos futures études d'endommagement de biomolécules, mais qui possède malheureusement une tension de vapeur ne permettant pas de travailler à des pressions inférieures à 300 mbar. L'autre avantage lié à ce changement est de pouvoir gérer le fonctionnement du dispenseur sans devoir ouvrir l'enceinte expérimentale et désaligner le montage : opération assez courante pour des raisons de remplissage du réservoir de solvant mais aussi pour le nettoyage de la buse en cas de bouchage, par exemple.

Cette évolution instrumentale est loin d'être anodine. La génération de gouttelettes directement à l'atmosphère engendre une modification du diagramme de pompage différentiel par l'ajout d'un étage à haute pression, impliquant un alignement mécanique plus strict à cause de l'ajout d'un écorceur supplémentaire. De plus, ce nouveau dispositif de pompage différentiel doit permettre de corriger les effets de turbulences engendrés lors du passage du premier écorceur à haute pression mais aussi de conserver les contraintes du schéma temporel : un passage de la région de hautes pressions jusqu'à la chambre principale de désorption à basse pression de la manière la plus rapide possible, afin d'éviter l'évaporation et/ou la congélation des gouttelettes.

De façon plus détaillée, ce nouveau pompage différentiel se réalise par l'intermédiaire des trois différents écorceurs ayant des ouvertures de faibles diamètres (entre 200  $\mu\text{m}$  et 500  $\mu\text{m}$ ) et qui sont positionnés à l'entrée de chaque enceinte (figure 2.21). L'alignement mécanique de ces écorceurs est une tâche importante qui s'est réalisée par des empreintes gravées au préalable sur chaque enceinte pour un meilleur centrage du cylindre qui porte chacun des écorceurs, mais aussi en utilisant un laser pour définir un axe commun pour ces écorceurs. La figure (2.21) schématise les différentes chambres avec leur pression respective. La gouttelette éjectée à pression ambiante traverse le premier écorceur, c'est le passage le plus délicat sur lequel il a fallu essayer de nombreuses pièces de taille et géométrie différentes, ainsi qu'optimiser le parcours de la gouttelette à l'air libre en réduisant la distance entre le dispenseur et le premier écorceur. Arrivant au niveau du deuxième écorceur situé à environ 10 cm du premier, la pression obtenue par une pompe primaire est de 300 mbar. La vitesse de la goutte augmente sous vide. La position de la microgouttelette est visualisée par les caméras CCD (voir partie 2.1.2). Cela permet de relever la vitesse de la gouttelette. Une chambre intermédiaire se situe entre la première chambre et la chambre de désorption. Un dernier écorceur sépare les deux chambres. Cette chambre intermédiaire est maintenue sous vide primaire à une pression de  $10^{-2}$  mbar. Le nouveau schéma de pompage différentiel destiné à guider les microgouttelettes sous vide dépend forte-

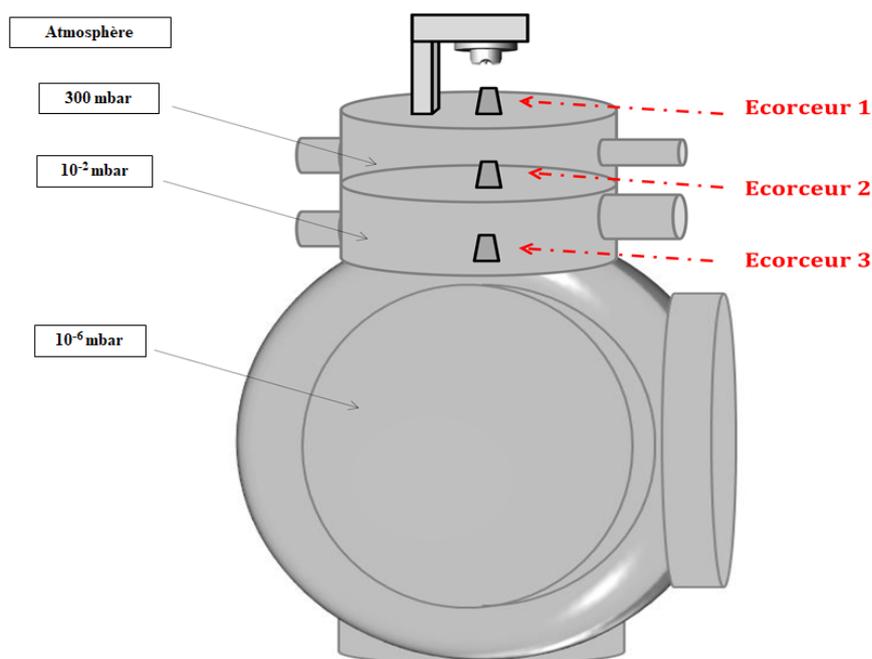


FIGURE 2.21 – Vue d’ensemble de la nouvelle source. Le dispenseur et l’écorceur 1 sont à pression atmosphérique.

ment de la géométrie du montage expérimental en question (diamètres des écorceurs, alignement mécanique, ...). Ainsi, la traversée de la goutte à pression atmosphérique est la partie la plus complexe à gérer.

Le parcours de la gouttelette à pression atmosphérique est ralenti par les collisions qu’elle subit avec les molécules d’air. En effet, lorsque des gouttelettes deviennent petites (de diamètre  $< 500 \mu\text{m}$ ), leur vitesse de chute dans l’air diminue et le nombre de Reynolds devient faible devant l’unité, c’est alors la force de friction visqueuse donnée par l’équation de Stokes (eqt. 2.3) qui domine le mouvement de la gouttelette dans l’air et qui s’exprime par la formule suivante :

$$F \sim 6\pi\eta_0RV \quad (2.3)$$

avec  $\eta_0$  la viscosité dynamique de l’air,  $R$  le rayon de la goutte et  $V$  sa vitesse en  $\text{m.s}^{-1}$ .

Le poids d’une gouttelette liquide, de forme sphérique et de masse volumique  $\rho$  subissant une accélération de pesanteur  $g$  s’écrit comme :

$$P = \frac{4}{3}\pi\rho gR^3 \quad (2.4)$$

À l’équilibre entre les deux forces (2.3) et (2.4), la vitesse de chute s’exprime comme :

$$V \sim \frac{2}{9}\frac{\rho g}{\eta_0}R^2 \quad (2.5)$$

La vitesse varie comme le carré de la taille de la goutte. La transition entre les régime inertiel et de freinage visqueux se fait pour un nombre de Reynolds d'ordre 1 :

$$Re = \frac{\rho_a V R}{\eta_0} \sim 1 \quad (2.6)$$

en considérant que  $\rho_a = 1,3 \text{ kg.m}^{-3}$  est la masse volumique de l'air.

Pour une gouttelette de DMSO de rayon  $R = 50 \text{ }\mu\text{m}$  éjectée dans l'air, la vitesse  $v$  estimée par la relation (2.5) est de l'ordre de  $0,3 \text{ m.s}^{-1}$ . Avec cette valeur de vitesse, on trouve un nombre de Reynolds proche de 1.

La faible taille de gouttelettes, avec lesquelles nous travaillons, rend leur transfert sous vide très complexe à cause de la présence des turbulences qui augmentent leur traînée de friction lors du mouvement.

Pour arriver à notre but, deux options pour le montage s'ouvrent donc à nous : un montage avec des écorceurs espacés, ce qui permet de mettre des caméras devant chaque écorceur et de suivre la trajectoire de la gouttelette au fur et à mesure, ou bien une version plus compacte, qui présente l'avantage de limiter très fortement les distances à parcourir dans les zones de turbulence, mais oblige à travailler à l'aveugle.

Dans ce qui suit, je présenterai, après la description de quelques nouveaux réglages apportés par le nouveau générateur d'impulsions qui commande le dispenseur de gouttelettes, une comparaison entre différents tests qui sont réalisés avec différents montages (géométries plus compactes ou à écorceurs espacés). Les résultats sur la stabilité de la gouttelette pour chaque cas sera discuté.

### 2.3.2 Nouveau générateur d'impulsions

Dans la nouvelle version du dispositif dans lequel les gouttelettes sont produites directement à l'atmosphère, nous avons investi dans un nouveau générateur d'impulsions qui permet un contrôle très fin de la structure du pulse électrique provoquant l'éjection. Le fonctionnement du dispenseur est décrit dans la partie (2.1.1). Selon les paramètres des pulses choisis, nous obtenons des gouttelettes de forme, de vitesse et de direction différentes. Je présente dans la suite des exemples de différents tests effectués à l'aide de différents types de pulses.

Le nouveau générateur d'impulsion permet également de contrôler en température la buse du dispenseur dans une plage qui varie entre 25 et 100 °C. L'effet de la température est en effet directement relié à la viscosité du solvant utilisé puisqu'elle varie en sens inverse de la température, comme le montre le tableau (2.2) pour l'exemple de diméthylsulfoxyde (DMSO).

C'est ce solvant que l'on a utilisé pour les tests présentés ci-dessous. Dans l'ensemble de ces tests, la température est réglée entre 25 et 31 °C. Dans cette gamme de températures la viscosité du DMSO varie très peu, ceci permet une souplesse du réglage, afin de retrouver la gouttelette à la même position lorsque la température ambiante varie d'un jour à l'autre ou pendant une manipulation<sup>4</sup>. A contrario pour

---

4. Pour les températures plus élevées, l'éjection d'une goutte n'est pas reproductible. On observe

Température (en °C)	Viscosité (en cP)
25	1.991
30	1.808
40	1.511
50	1.286
75	0.916
100	0.691
125	0.546

TABLE 2.2 – Viscosité du diméthylsulfoxyde (DMSO) comme fonction de la température.

étudier la stabilité de la goutte, j’ai choisi de fixer ce paramètre de température et de jouer avec les paramètres du pulse (amplitude et durée) qui ont également un fort impact sur la stabilité de l’éjection. Enfin pour le choix de la fréquence d’éjection, même si le but est de travailler à 20 Hz pour être synchrone avec la fréquence du laser de désorption, j’ai été amené parfois à faire fonctionner le dispenseur à des fréquences plus élevées autour de 100 Hz pour accélérer la recherche d’une goutte en partant du principe que j’ai une plus grande probabilité de voir la goutte en travaillant à haute fréquence.

Le tableau (2.3) donne les caractéristiques de l’impulsion (triple pulse) délivrée par le nouveau générateur d’impulsions dans le cas d’un test avec la configuration expérimentale représentée sur la figure (2.23) de la section suivante. La fréquence de fonctionnement du dispenseur était de 20 Hz. Les gouttes arrivent après 33,75 ms à l’entrée du deuxième écorceur, toujours dans une enceinte à une pression d’environ 300 mbar (figure 2.23).

Paramètres d’une impulsion triple	Tension (en V)	Largeur du pulse (en $\mu\text{s}$ )	Délai (en $\mu\text{s}$ )
$P_1$	124	39	42
$P_2$	73	67	19
$P_3$	-76	12	13

TABLE 2.3 – Les paramètres optimisés de l’impulsion à 3 créneaux ( $P_1$ ,  $P_2$  et  $P_3$ ) permettant l’obtention de micro-gouttelettes de DMSO stables sous vide (avec l’écorceur commercial).

On retrouve ces ordres de grandeurs pour les délais avec une configuration similaire (voir figure 2.24) dans laquelle nous avons simplement remplacé l’écorceur commercial du montage précédent par un autre “fait maison” d’une ouverture de 0.5 mm de diamètre. Les caractéristiques de cette pièce façonnée sur demande sont décrites dans le paragraphe suivant (cf. 2.3.3). Dans cette configuration, on observe avec les paramètres présentés dans le tableau (2.4) une goutte pour un délai de 250  $\mu\text{s}$  au

un changement de taille de la goutte et de direction d’éjection

niveau du premier écorceur situé à pression atmosphérique et pour un délai de 33 ms pour le deuxième écorceur dans une enceinte à 300 mbar.

En comparant ces deux tests, on trouve que la goutte arrive en avance au niveau du second écorceur pour le deuxième montage (figure 2.24), la différence de délai est de 0.75 ms, ce qui implique que les gouttes éjectées avec l'impulsion décrite ci-dessus conduisent à des gouttes plus rapides. L'ordre de grandeur de vitesse est estimée à  $1.8 \text{ m.s}^{-1}$ .

De plus, la différence de taille entre les écorceurs situés à pression ambiante dans chaque montage impacte la qualité du vide dans les chambres à vide avales. La goutte est plus fortement accélérée dans le second montage (2.24) puisque le diamètre de l'écorceur à pression atmosphérique est égal à la moitié de celui du premier montage, ce qui fait que le vide est meilleur. La goutte subit donc moins la force de traînée le long de sa trajectoire.

Paramètres d'une impulsion triple	Tension (en V)	Largeur du pulse (en $\mu\text{s}$ )	Délai (en $\mu\text{s}$ )
$P_1$	-115	27	16
$P_2$	-33	29	1
$P_3$	96	29	6

TABLE 2.4 – Les paramètres optimisés de l'impulsion à 3 créneaux ( $P_1$ ,  $P_2$  et  $P_3$ ) permettant l'obtention de micro-gouttelettes de DMSO stables sous vide (avec l'écorceur "fait maison").

Pour effectuer de nouveaux tests avec d'autres géométries utilisant des écorceurs de différentes tailles, il a fallu ré-adapter le système de visualisation, avec une mise au point compliquée dans un espace réduit. La figure (2.22) représente une photographie d'une gouttelette obtenue avec une nouvelle géométrie dans laquelle on visualise la goutte à deux instants différents entre  $t = 450 \mu\text{s}$  à l'entrée du premier écorceur ( $\phi_1 = 500 \mu\text{m}$ ) et à  $t = 11 \text{ ms}$  à l'entrée du deuxième ( $\phi_2 = 300 \mu\text{m}$ ). Dans ce test, la goutte de DMSO qui fait toujours  $50 \mu\text{m}$  de diamètre est nettement plus rapide, mais les écorceurs utilisés sont de plus faible diamètre en comparaison avec les deux configurations précédentes.

### 2.3.3 Conception d'un écorceur "maison"

Comme indiqué précédemment, la pièce qui couplait initialement le dispenseur situé à pression ambiante avec la première enceinte sous vide à 300 mbar était un écorceur commercial de 1 mm de diamètre (voir figure 2.23). Je présente quelques paramètres de l'impulsion (tableau 2.3) qui donnent une goutte stable sans pompage. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à suivre cette gouttelette jusqu'à la chambre de désorption. Pour cette raison, nous avons pensé à remplacer cet écorceur par une autre pièce façonnée différemment pour répondre à nos besoins. En effet, un désavantage de l'utilisation d'écorceurs commerciaux, qui sont destinés à une utilisation sous vide, est que leur état de surface se dégrade rapidement avec un

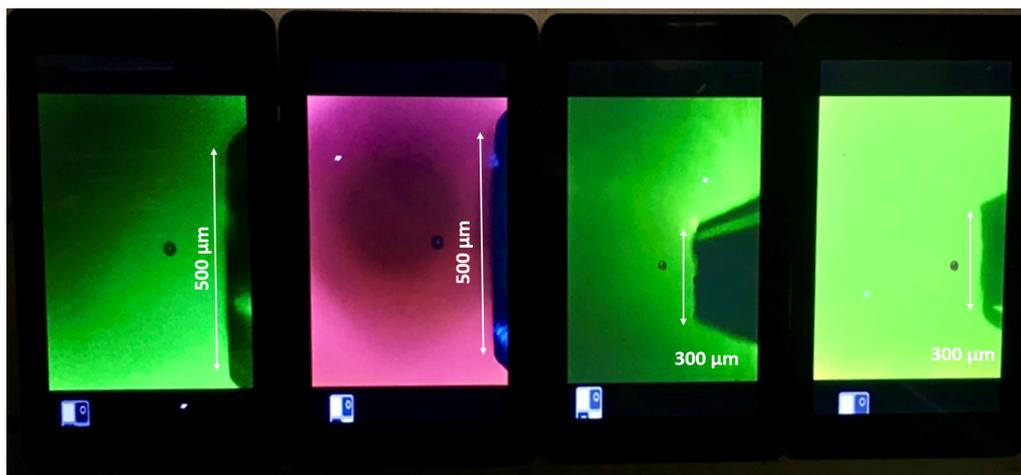


FIGURE 2.22 – Visualisation d’une gouttelette avec le système d’imagerie *in situ* à deux instants différents entre  $t = 450 \mu\text{s}$  à l’entrée du premier écorceur ( $\phi_1 = 500 \mu\text{m}$ ) et à  $t = 11 \text{ ms}$  à l’entrée du second écorceur ( $\phi_2 = 300 \mu\text{m}$ ). La solution est du DMSO. La goutte fait  $50 \mu\text{m}$  de diamètre.

flux important de gaz résultant d’un passage de l’atmosphère à un vide primaire : le remplacement fréquent de ce type d’écorceurs serait bien trop coûteux !

La première pièce “faite maison” que l’on a testée pour le passage sous vide à partir de la pression atmosphérique est représentée sur le montage de la figure (2.24). Cette pièce a été fabriquée à l’atelier mécanique de notre laboratoire. Elle possède une première partie conique avec une ouverture de  $0.5 \text{ mm}$  (entrée de la pièce) et une base de diamètre de  $1.5 \text{ cm}$  (coté du deuxième écorceur). La conception de cette pièce trouve plusieurs avantages. D’une part, le design de cette première partie conique avec une ouverture large en comparaison du diamètre d’une gouttelette, qui est d’environ  $50 \mu\text{m}$ , correspond aux critères recherchés avec un écorceur commercial tout en étant plus solide pour résister à un pompage à partir de la pression ambiante. Et d’autre part, la seconde partie de cette pièce qui prend une forme cylindrique de  $4 \text{ cm}$  de longueur rentre dans l’enceinte sous vide, afin de pouvoir guider la goutte jusqu’à la chambre suivante plus facilement. L’anneau central, que l’on observe sur la figure et qui entoure ce cylindre, est fait pour placer un joint torique qui garantira l’étanchéité.

Avec ce montage (2.24), on a visualisé une goutte stable au niveau du deuxième écorceur de  $1.5 \text{ mm}$  de diamètre. Cette goutte est obtenue à l’aide du nouveau dispenseur par le biais d’une impulsion de  $-114 \text{ V}$  d’amplitude et de largeur de  $31 \mu\text{s}$ . Le délai nécessaire pour cette observation était de  $69.89 \mu\text{s}$  (pour la diode 1) et  $21.6 \text{ ms}$  (pour la diode 2 qui se trouve devant le deuxième écorceur). Les valeurs de ces délais correspondent à un fonctionnement sans pompage. Or avec pompage, nous n’avons pas pu observer la gouttelette après le premier écorceur, en ayant bien entendu modifié au préalable les délais de visualisation qui ne sont évidemment pas les mêmes avec et sans pompage. Dans cette situation, sans repère visuel en sortie du

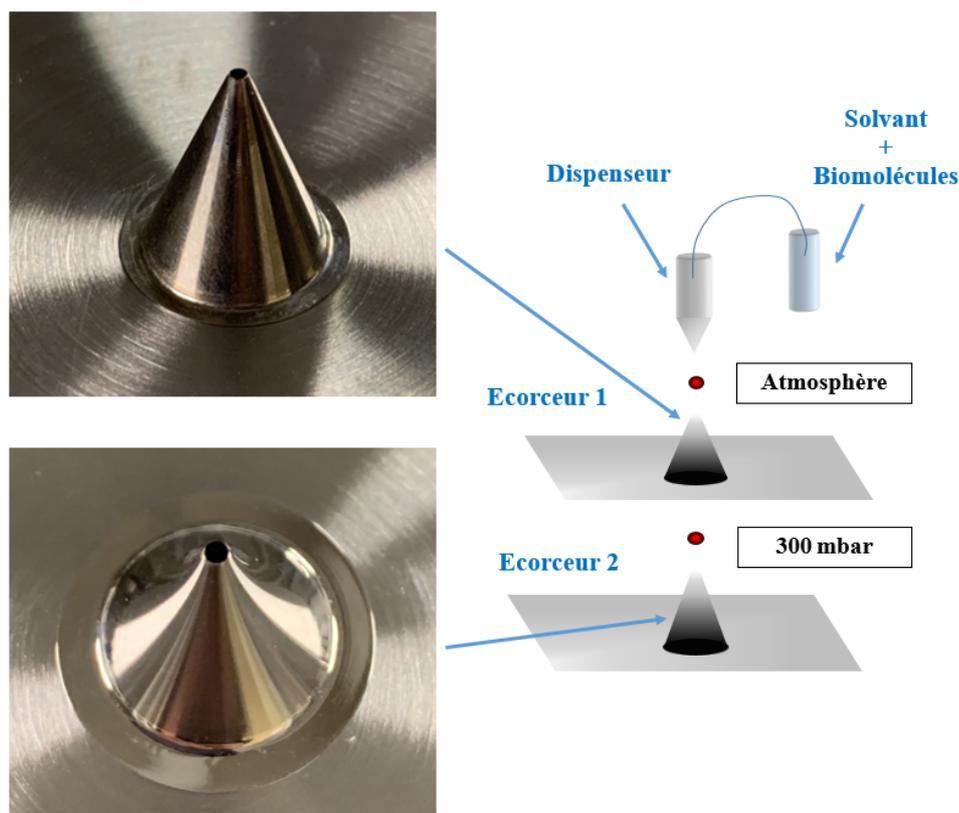


FIGURE 2.23 – À droite : le schéma représentatif du montage avec le dispenseur qui se situe à pression ambiante, en amont du premier écorceur ( $\phi_1 = 1$  mm). Le second écorceur ( $\phi_2 = 1.5$  mm) est placé dans une chambre à 300 mbar. À gauche : deux photographies des deux premiers écorceurs.

premier écorceur<sup>5</sup> et sans valeur ”de référence” connue<sup>6</sup>, nous nous retrouvons dans l'impossibilité de trancher entre le fait que la gouttelette se trouve à un délai qu'il s'avère trop fastidieux de déterminer ou que celle-ci ne passe pas le premier écorceur à cause d'un mauvais alignement ou de paramètres d'éjection inadaptés. De plus, cette recherche de délais se trouve entravée par les possibles instabilités du dispenseur au cours d'une manipulation de longue durée (changements dans l'éjection au cours du temps, bouchage de la buse ...)

Puisque dans ces conditions la stabilité de la goutte ne permet pas d'obtenir une reproductibilité d'un transfert sous vide permettant une désorption laser avec un rendement suffisant<sup>7</sup>, nous avons essayé une configuration avec deux écorceurs inversés.

5. La partie cylindrique du montage, qui à terme devait protéger la gouttelette des effets de turbulence du pompage, se trouve être extrêmement gênante pour réaliser une quelconque visualisation en sortie du premier écorceur.

6. Cette géométrie de montage étant nouvelle, aucune référence pour un délai en lien avec les versions antérieures du dispositif instrumental ne peut être extrapolée.

7. Une acquisition d'un spectre durant plusieurs minutes, avec une gouttelette toutes les 40 ms, il est nécessaire d'en vaporiser plusieurs centaines.

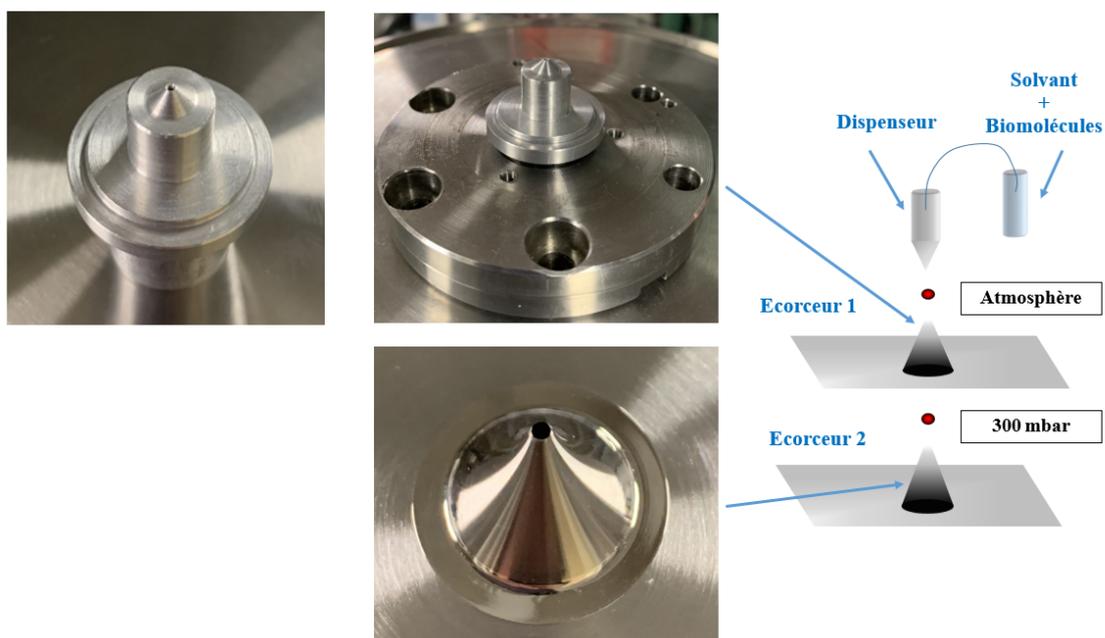


FIGURE 2.24 – À droite : le schéma représentatif du premier montage avec le dispenseur qui se situe à pression ambiante, en amont du premier écorceur ( $\phi_1 = 0.5$  mm). Le second écorceur ( $\phi_2 = 1.5$  mm) est placé dans une chambre à 300 mbar. À gauche : deux photographies des deux premiers écorceurs.

### 2.3.4 Montage avec deux écorceurs inversés

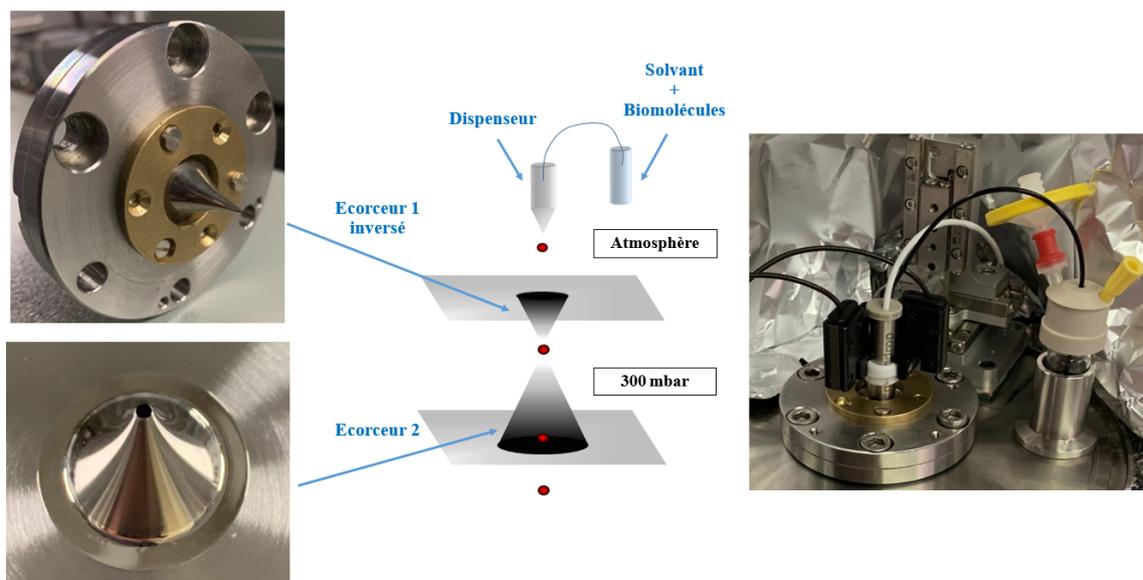


FIGURE 2.25 – Au milieu : le schéma représentatif du montage avec deux écorceurs inversés distants d'environ 1mm. Les trois photographies montrent : le dispenseur et la fiole contenant la solution (photo à droite), le premier écorceur ( $\phi_1 = 300$   $\mu\text{m}$ ) inversé (photo en haut) et le deuxième écorceur ( $\phi_2 = 1.5$  mm) placé sous vide (photo en bas).

Les nombreux tests que j'ai présentés ci-dessus et qui n'ont malheureusement pas abouti à une situation satisfaisante de stabilité, ont permis au moins d'obtenir quelques paramètres d'éjections pour le fonctionnement du nouveau générateur de gouttelette via plusieurs types d'impulsions (simple ou triple crêteaux). Par conséquent pour optimiser la stabilité de la gouttelette, nous avons pensé à réduire la distance qu'elle parcourt à pression atmosphérique. Nous avons donc étudié une nouvelle géométrie plus compacte à l'aide d'un écorceur inversé (voir figure 2.25). L'idée de cette géométrie est de simuler une sorte de lentille aérodynamique, qu'on retrouve dans les expériences sur des sources aérosols [81]. Sachant que la taille de nos gouttelettes sont au-delà des objets guidés par ces lentilles (ordre de grandeur de 2 micromètres de diamètre), nous avons essayé ce montage à écorceurs inversés pour étudier l'efficacité d'un tel guidage dans notre cas.

Cette nouvelle géométrie possède comme avantage principal de minimiser la distance parcourue par la goutte dans l'air, puisque le dispenseur est plus proche de l'écorceur ; donc moins sensible aux flux d'air. Ainsi, on augmente la probabilité de passage de la goutte sous vide.

Toutefois l'utilisation d'une telle géométrie est difficile à mettre en oeuvre. Le manque de repères visuels de la gouttelette en sortie de dispenseur rend difficile l'alignement de ce dernier avec l'axe des écorceurs, puisqu'on doit travailler en aveugle. De plus, la mise en place des caméras qui sont ajustées pour visualiser la sortie du premier écorceur, l'entrée du second et le passage de la gouttelette entre les deux, est assez laborieux au vu de l'encombrement dans cette chambre.

Nous avons travaillé avec un dispenseur dans cette configuration, qui éjecte des gouttelettes à l'aide d'une impulsion de -133 V et de durée de 30  $\mu$ s. La fréquence est de 100 Hz et la température de la buse est maintenue à 29 °C. Le premier écorceur de plus petite taille ( $\phi_1 = 300 \mu\text{m}$ ) est placé dans une position inversée (pointe du cône vers le bas) et l'écart entre la sortie du premier écorceur et l'entrée du seconde ( $\phi_2 = 1.5 \text{ mm}$ ) est de moins d'un millimètre. Pour ces tests, l'enceinte est pompée par une pompe primaire à travers le deuxième écorceur.

Dans cet essai, la goutte reste visible durant le pompage ce qui n'était pas toujours le cas dans les montages précédents. Le délai pour lequel on visualise la goutte varie naturellement lorsque l'on modifie la pression dans l'enceinte. Afin d'étudier l'effet de pompage sur la stabilité, j'ai connecté une vanne de micro-fuite à l'enceinte contenant les écorceurs inversés. En modifiant la pression, on observe l'évolution de la durée que met la goutte pour arriver entre les deux écorceurs en fonction de la pression dans la chambre. Les valeurs représentées dans le tableau (2.5) montrent que le délai diminue très légèrement lorsque la pression augmente.

Ce résultat semble contre-intuitif. On s'attendrait à voir une évolution inverse, c'est-à-dire une diminution du délai lorsque la pression diminue. En effet, la vitesse de la goutte devrait augmenter puisqu'elle subit moins de collisions avec les molécules d'air (meilleur vide) et donc elle devrait mettre moins de temps pour apparaître entre les deux écorceurs. Les variations de délai observées sont cependant très petites, et peuvent être liées au caractère plus ou moins turbulent de l'écoulement tout autant

Pression (en mbar)	Délai (en ms)
430	8.640
320	8.635
290	8.649
230	8.669
160	8.71
150	8.73

TABLE 2.5 – La variation de temps d'arrivée (délai en ms) d'une goutte de DMSO entre les deux écorceurs inversés (montage 2.25) en fonction de la pression (en mbar).

qu'à l'effet d'aspiration.

Toutefois, cette configuration compacte semble être mieux adaptée au transfert des gouttelettes sous vide. C'est pour cela que nous avons effectué une nouvelle amélioration de notre source de gouttelettes (figure 2.26) s'appuyant sur la configuration avec un écorceur inversé.

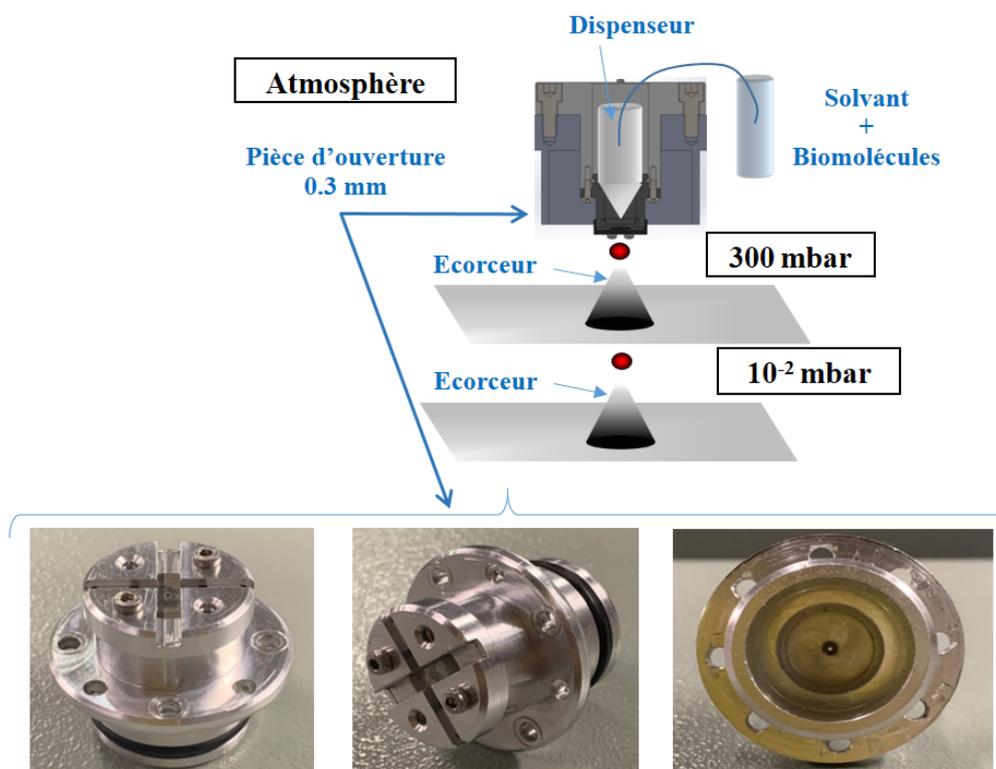


FIGURE 2.26 – Schéma représentatif de la nouvelle configuration d'écorceur inversé avec une pièce "faite maison". Les trois photographies montrent cette pièce située à pression atmosphérique. Elle joue le même rôle que l'écorceur inversé et permet d'optimiser la distance séparant le dispenseur et le deuxième écorceur.

Le montage de la figure (2.26) montre la dernière version que j'ai pu réaliser pour l'optimisation de la source de gouttelettes. La pièce photographiée sur cette figure a été conçue et fabriquée à l'atelier mécanique du Laboratoire de Physique des Lasers. Le rôle principal de cette pièce en forme d'écorceur inversé est de protéger le dispenseur situé à pression atmosphérique en positionnant la buse de celui-ci au plus près de l'ouverture. Dans ce cas, le parcours qu'effectue la goutte à l'atmosphère est bien plus court que dans les autres configurations.

L'autre avantage est que la taille de l'ouverture peut être modifiée puisqu'il s'agit d'une pastille interchangeable de forme circulaire en acier inoxydable de 2 mm de diamètre, qui se fixe au bout de cette nouvelle pièce protectrice. L'ouverture dépend donc de la taille du trou percé dans cette pastille. Dans l'exemple représenté ici, l'ouverture fait 0.3 mm de diamètre. La distance séparant la sortie de la pièce avec l'entrée du deuxième écorceur est d'environ 1 mm. Dans ce cas aussi, la visualisation de la goutte n'est malheureusement possible qu'à l'entrée du second écorceur et on n'a pas d'image de la goutte à la sortie du dispenseur.

Cette amélioration n'a malheureusement pas donné de meilleurs résultats que le système précédent à écorceurs inversés. Néanmoins, ces différentes évolutions ont permis à l'équipe de mieux comprendre les problématiques liées à ce passage sous vide depuis l'atmosphère. Une configuration poursuivant l'évolution entamée vers un montage plus compact va donc être proposé (voir figure 2.27). Il s'agit d'un dispositif avec des écorceurs imbriqués les uns dans les autres pour minimiser la distance parcourue par les gouttes, limiter les possibilités que la goutte s'écarte de l'axe formé par les écorceurs, et améliorer la qualité du vide en utilisant des enceintes plus compacte. Ce nouveau montage est en cours d'exécution, il sera étudié pendant la thèse d'Ayoub Badri dans l'équipe.

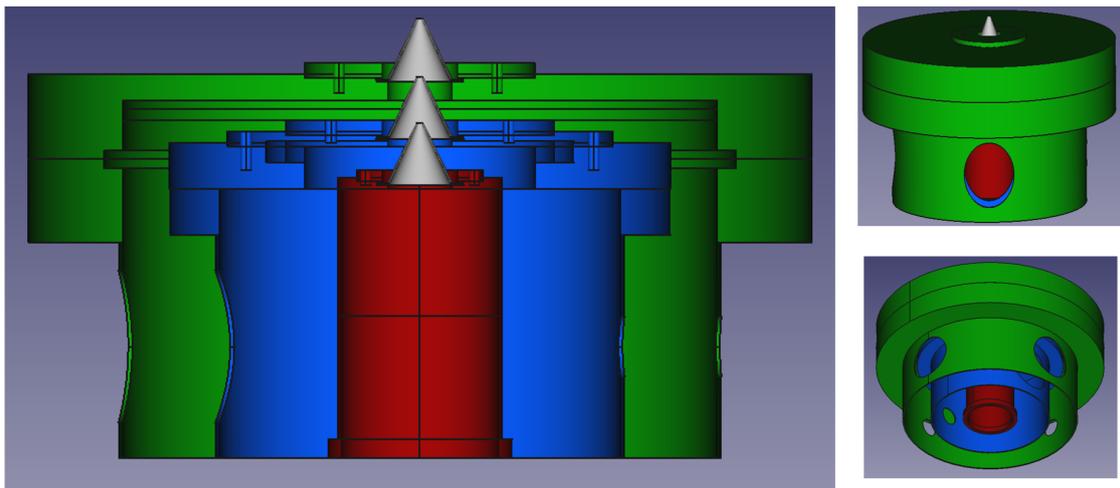


FIGURE 2.27 – Schématisation réalisée sur FreeCAD de la nouvelle configuration compacte de la source de gouttelette avec des écorceurs rapprochés.

## 2.4 Couplage avec un piège de Paul

### 2.4.1 Piège ionique (piège de Paul)

Le deuxième grand changement envisagé sur notre dispositif expérimental après le passage du dispenseur à pression ambiante consiste en l'ajout d'un piège ionique dans le spectromètre de masse. La résolution en masse obtenue en utilisant le système d'extraction retardée s'avère insuffisante pour nos études. C'est la distribution de vitesse inhérente au processus de désorption des gouttelettes, qui est la cause de cette limitation en résolution. Pour résoudre ce problème, nous rajoutons un piège de Paul à notre dispositif expérimental (voir figure 2.28). L'objectif principal de ce piège est de définir un nouveau point source, réduisant considérablement la distribution de vitesses. De plus, ce piège, dit de collection, va permettre de gagner en intensité et en transmission.

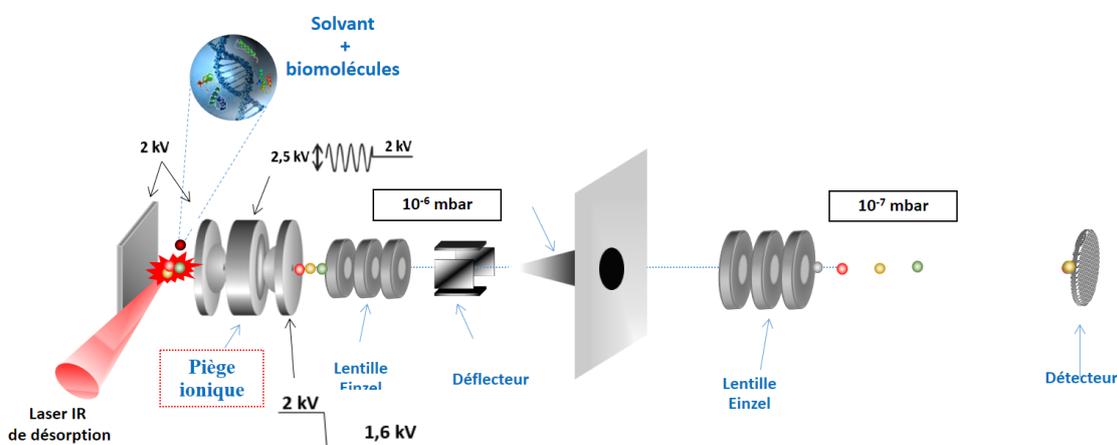


FIGURE 2.28 – Schématisation du piège ionique (piège de Paul) dans le spectromètre de masse par temps de vol. La première plaque ainsi que l'électrode d'entrée du piège (de part et d'autre de la zone de désorption) sont portées à environ 2000 V. Les autres valeurs indiquées sont celles de l'extraction, du piégeage et de la détection. Cet exemple permet d'étudier des ions positifs mais ce dispositif est également fonctionnel en mode négatif pour étudier des anions.

En présence du piège, le spectre de masse est ici mieux résolu en masse. Ceci est montré sur le spectre de la bradykine (2.29) obtenu pour des gouttelettes avec le même solvant composé d'eau et de DMSO dans les proportions (1/4,3/4) et une concentration de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , en comparaison avec celui de la figure (2.14). L'effet du piège se traduit par un pic mieux résolu de la bradykinine protonée, ainsi que par l'apparition de nombreux agrégats de  $(\text{DMSO})_n(\text{H}_2\text{O})_m$  qui sont présents sans piège mais en petite quantité. Ces agrégats peuvent être issus de la désorption (ce qui serait un signe encourageant quant à la capacité de cette source à préserver la structure native des biomolécules étudiées) ou bien ils peuvent être formés dans le piège. La présence du piège provoque également une faible fragmentation de la bradykine : on observe les ions  $y_8^+$  et  $b_8^+$  correspondant à une perte de l'arginine en C-terminal ou en

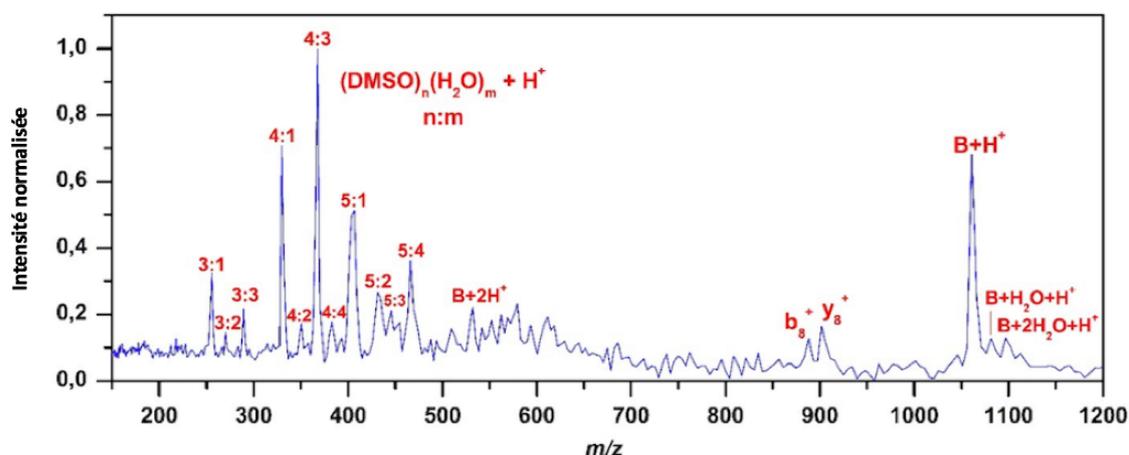


FIGURE 2.29 – Effet du piégeage sur la résolution des spectres de masse obtenus par désorption laser des microgouttelettes de bradykinine de concentration de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  dans un mélange eau et DMSO (1/4 - 3/4). L'énergie du laser IR vaut 3 mJ. La durée de piégeage est de 10 ms.

N-terminal. Ces fragments observés dans certains spectres CID de la bradykinine [82] sont probablement issus des collisions avec le gaz tampon à l'entrée du piège. En effet, ces fragments ne sont pas observés dans la configuration de spectromètre de masse avec seulement la ligne d'extraction retardée.

## 2.5 Conclusion

Dans ce chapitre j'ai présenté notre source de désorption laser sur microgouttelettes unique en France et qui fait partie des sources "douces" d'ionisation décrites dans le chapitre (1). J'ai présenté en détail le dispositif expérimental ainsi que les résultats de la désorption de molécules d'intérêt biologique telles que la vancomycine et la bradykinine obtenues par la première version de l'expérience telle qu'elle était à mon arrivé dans l'équipe. Ensuite, j'ai décrit les différents tests réalisés sur le dispositif afin de le faire évoluer pour pouvoir étudier l'endommagement de biomolécules. Les deux grands changements nécessaires à ce projet sont l'éjection des gouttelettes à partir de la pression atmosphérique et le couplage d'une source d'irradiation à l'expérience. Pour le moment, les développements expérimentaux réalisés n'ont pas permis d'obtenir de gouttes stables sous vide, mais ils donnent des indications sur les futures modifications à envisager. On se ré-orienté ainsi vers une géométrie plus compacte, en acceptant l'idée de ne pas pouvoir visualiser la trajectoire des gouttelettes au fur et à mesure de leur chute. En parallèle on remonte l'ancien dispositif, qui ne permettra pas la perspective irradiation mais qui permettra d'analyser le processus de désorption LILBID (objectif du chapitre 3), et de faire des études structurales avec cette source pour comparer les structures obtenues avec celles des autres sources classiques.

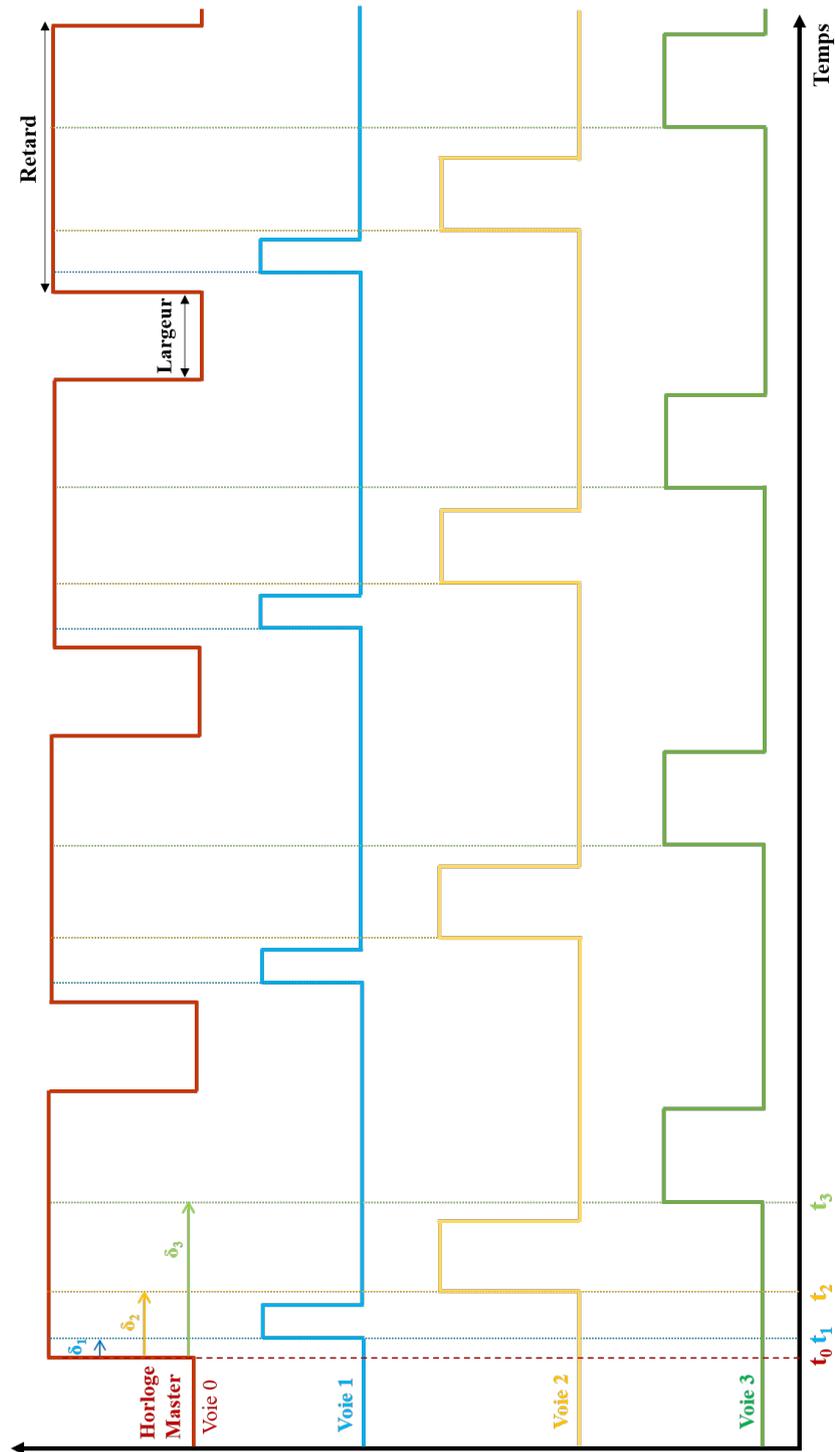


FIGURE 2.30 – Agrandissement de la figure 2.9 représentant une séquence temporelle des impulsions électriques.

# Chapitre 3

## Exploration des processus physiques dans le phénomène de désorption des microgouttelettes par simulations sous SIMION

### 3.1 Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons vu l'importance de coupler un piège ionique à notre source de désorption en terme d'amélioration sur la résolution en masse des spectres expérimentaux. Néanmoins, l'utilisation d'un tel piège ne permet pas de comprendre comment les molécules d'intérêt sont passées en phase gazeuse lors du processus de désorption. Le piégeage efface en effet toute mémoire sur les conditions initiales de désorption. Pour pouvoir caractériser cette désorption et étudier les caractéristiques des espèces désorbées après l'excitation du laser, on a choisi d'utiliser le système d'extraction retardée présenté précédemment. Dans ce chapitre, je vous présente les informations que l'on pourrait obtenir avec ce procédé d'extraction via des simulations numériques. Ces simulations montrent la possibilité d'explorer la désorption des gouttelettes par l'analyse de plusieurs distributions énergétiques et angulaires d'un système donné pour reproduire les résultats expérimentaux. Elles apportent des informations essentielles pour la compréhension de cette désorption, et également des informations qui permettent de mieux adapter les paramètres expérimentaux pour garantir le caractère doux de la mise en phase gazeuse et ainsi permettre la préservation de la phase native des biomolécules étudiées.

### 3.2 Processus de désorption laser

La mise en phase gazeuse par désorption laser IR sur un jet liquide ou des microgouttelettes n'est pas totalement comprise. Parmi les deux grandes hypothèses expliquant ce qui se passe lors de cette vaporisation, un mécanisme de nature thermique lié à un chauffage local du liquide, ou bien un mécanisme mécanique due à la propagation d'une onde de choc [72, 83] sont évoqués.

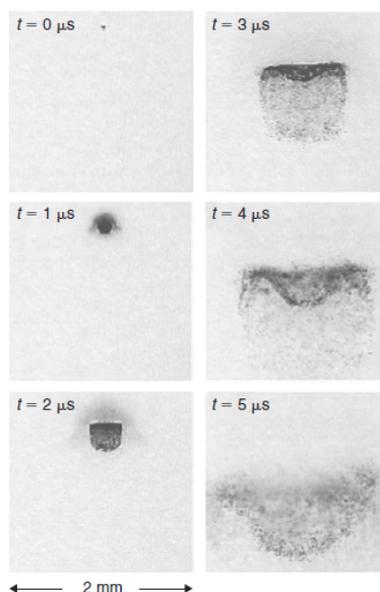


FIGURE 3.1 – Séquence d’images prises à différents instants de l’explosion d’une gouttelette d’eau par désorption laser ( $\lambda=3 \mu\text{m}$ ,  $E_{\text{laser}} = 10 \text{ mJ}$ ,  $T_{\text{Pulse}} = 6 \text{ ns}$ ). Selon ce processus de désorption décrit par Brutschy [6], les ions détectés sont ceux éjectés sous vide de la partie supérieure de la goutte (le laser traverse de quelques micromètres la goutte en provenant par-dessus perpendiculairement à l’axe de la détection).

Le modèle proposé par Brutschy [6] est l’un des modèles de désorption reposant sur un mécanisme thermique. Ce modèle suggère que la mise en phase gazeuse après l’absorption de l’énergie laser<sup>1</sup> par un liquide est la conséquence d’une transition de phase rapide au-delà du point supercritique du solvant irradié. Dans ce passage en phase gazeuse, la diminution de la densité du liquide est suivie par une décroissance de la constante diélectrique du milieu, ainsi les ions de charges opposées formeront des espèces neutres (après recombinaison). Par conséquent, seuls les ions, ayant une énergie cinétique suffisante pour se retrouver dans une zone éloignée d’un contre-ion vont être détectés par spectrométrie de masse (modèle du ”lucky survivor”). La figure (3.1) montre des images de la désorption d’une gouttelette d’eau prises à différents instants. Les ions détectés dans ce modèle sont ceux qui sont éjectés de la surface irradiée après l’absorption du laser.

Abel et ses collaborateurs ont suggéré l’existence de différents régimes de désorption selon l’énergie et la longueur de pénétration du laser employé dans ce processus. Ainsi, ils observent par l’usage d’un système HSVS (High speed video stroboscopy), la désintégration d’un jet d’eau liquide par désorption laser IR. L’éjection des ions de grandes vitesses (régime de faible profondeur de pénétration :  $\lambda_{IR} = 2.8 \mu\text{m}$ ) se réalise suite à un dépôt d’énergie en surface du liquide. Cette énergie absorbée permet de générer une onde de choc qui aboutit à l’explosion thermique du liquide [44]. Il résulte de cette dispersion (explosion asymétrique) de petites gouttelettes chargées ayant une tension de surface en surcharge. Ceci conduit à la libération de molécules

1. Le rayonnement laser pénètre la goutte de quelques micromètres provenant du côté supérieur perpendiculairement à la détection (figure 3.1).

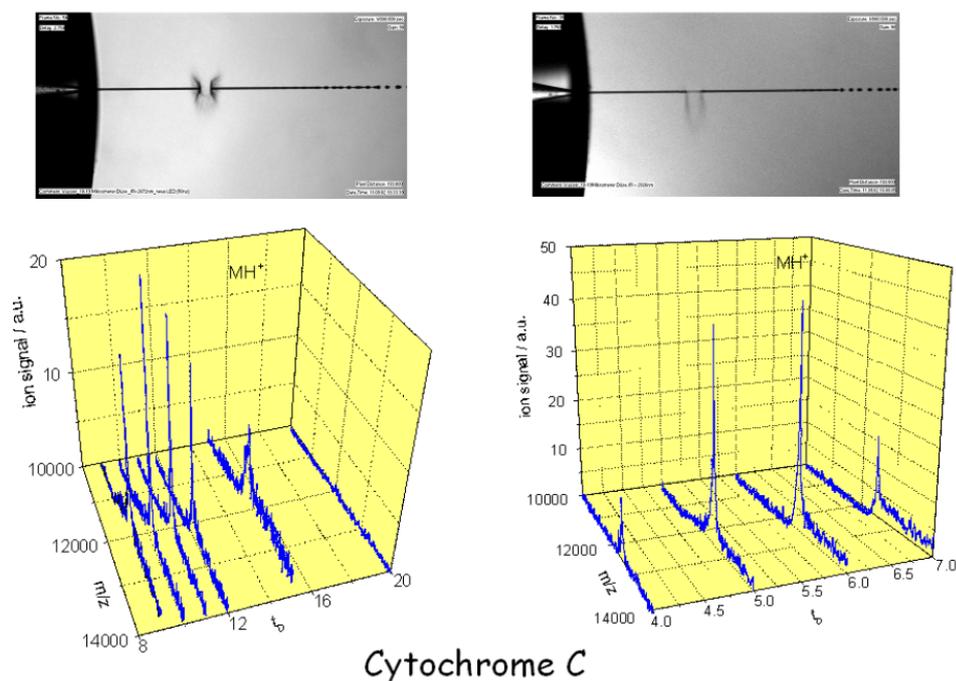


FIGURE 3.2 – Processus de désorption décrit par Abel [72]. Mesures de vitesses des ions éjectés par désorption laser sur un jet d'eau pour deux longueurs d'onde différentes (gauche :  $2.6 \mu\text{m}$ , droite :  $2.8 \mu\text{m}$ ). L'axe  $t_d$  représente le délai de l'optique ionique exprimé en  $\mu\text{s}$ .

sous vide. Lorsque la longueur d'onde utilisée est faiblement absorbée (régime de forte profondeur de pénétration :  $\lambda_{IR} = 2.6 \mu\text{m}$ ), les temps d'arrivés ( $t_d$ ) mesurés dans l'expérience sont plus longs et donc on a affaire à des ions éjectés moins rapides que dans le cas précédent (voir figure 3.2). Le modèle d'Abel est conforté par certaines simulations de dynamique moléculaire réalisées sur des systèmes d'agrégats atomiques ou moléculaires excités de manière impulsionnelle [53, 54], par des expériences similaires de mesures de vitesse sur des agrégats d'eau produits à partir d'un jet liquide [55], et par l'étude de la distribution de charge en phase gazeuse suite à l'ablation laser de microgouttelettes [56].

Une meilleure compréhension du processus de désorption est donc nécessaire pour mieux caractériser les espèces désorbées. Il est également important de connaître les vitesses des ions éjectés d'une gouttelette pour bien choisir les potentiels appliqués sur les électrodes dans le spectromètre de masse (système d'extraction retardée, lentille de Einzel, ...) qui vont déterminer la trajectoire des ions dans ce dernier avec pour objectif d'obtenir la meilleure résolution avec une transmission maximale au niveau du détecteur. Un des outils qui permet d'étudier l'effet des paramètres expérimentaux sur la transmission du spectromètre de masse consiste en la simulation de la trajectoire des ions en faisant varier certains paramètres. Le logiciel sur lequel j'ai réalisé mes simulations est présenté dans le paragraphe suivant.

## 3.3 Simulations SIMION

### 3.3.1 Introduction

SIMION est un logiciel principalement utilisé pour calculer les champs électriques ou magnétiques et les trajectoires des particules chargées dans ces champs lorsque l'on définit notamment une configuration d'électrodes avec des tensions et des conditions initiales de particules. Il s'agit de résoudre les équations de Laplace en tout point de la géométrie définie au préalable, afin de simuler les trajectoires des ions et d'obtenir les spectres de masse théoriques.

La simulation commence par la configuration de la géométrie du spectromètre de masse, c.à.d. la création d'une zone nommé "workbench". Dans cette zone on définit l'ensemble des électrodes avec leur forme géométrique. Le logiciel permet de produire cette tâche via deux moyens : le premier consiste à définir «manuellement» les électrodes en utilisant les fonctions présentes sur SIMION pour dessiner (Box, Line, Circle, ...). Souvent cette méthode est lente pour définir des géométries complexes. Le deuxième moyen, qui est plus efficace, consiste à définir la géométrie via un fichier .GEM, qui nous permet de modéliser l'ensemble de l'expérience ainsi que les différentes cotes nécessaires pour définir les plans de masse. Elle facilite énormément les possibilités de modifications futures de la géométrie actuelle si on le souhaite. A titre d'exemple, j'ai pu rajouter facilement un tube pour voir l'effet de la position du détecteur sur le temps de vol des ions, j'ai aussi ajusté la distance entre les différentes électrodes.

Une fois la géométrie définie, le logiciel résout l'équation de Laplace, en tenant compte des tensions appliquées sur les différentes électrodes pour obtenir les potentiels en tous points du volume. L'équation de Laplace est une équation aux dérivées partielles qui s'exprime par

$$\Delta V = \frac{\partial^2 V}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 V}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 V}{\partial z^2} = 0 \quad (3.1)$$

En l'absence de charge, l'équation bidimensionnelle devient  $\frac{\partial^2 V}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 V}{\partial y^2} = 0$ . C'est cette équation que SIMION va résoudre numériquement par la méthode des différences finies. Cela revient à mailler le plan sur lequel nous cherchons le potentiel en question, par une grille dont les mailles sont très petites, de dimension  $\Delta x$  et  $\Delta y$ . La discrétisation de l'équation de Laplace donne une bonne approximation du potentiel en chaque point de la grille. Ce potentiel est égal à la moyenne des potentiels des quatres voisins

$$V[i, j] = \frac{V[i - 1, j] + V[i + 1, j] + V[i, j + 1] + V[i, j - 1]}{4} \quad (3.2)$$

La précision des calculs croît avec le nombre de points dans le maillage. Cependant, ce nombre est toujours limité par la mémoire vive de la machine qui fait ce calcul. Pour avoir un ordre de grandeur de ce coût en mémoire vive, la reproduction des

dimensions de notre dispositif avec une échelle de 1 mm = 1 unit donne : 1400 mm selon (Ox), 401 mm selon (Oy) et 401 selon (Oz). Or, un point utilise 10 bytes de RAM. Donc 2.25 Gbytes étaient nécessaires pour simuler la trajectoire des ions dans un tel volume.

En plus de la possibilité de configurer la géométrie, SIMION fournit d'autres fonctionnalités importantes pour nos simulations. On peut citer notamment la possibilité d'introduire un code pour faire varier les potentiels appliqués sur une ou plusieurs électrodes au cours du temps (voir 3.3.3), ou la modélisation des collisions entre les particules. Il permet aussi l'enregistrement des données et la visualisation des géométries, des trajectoires et du potentiel ressenti par les ions.

### 3.3.2 Modélisation de la géométrie du spectromètre de masse

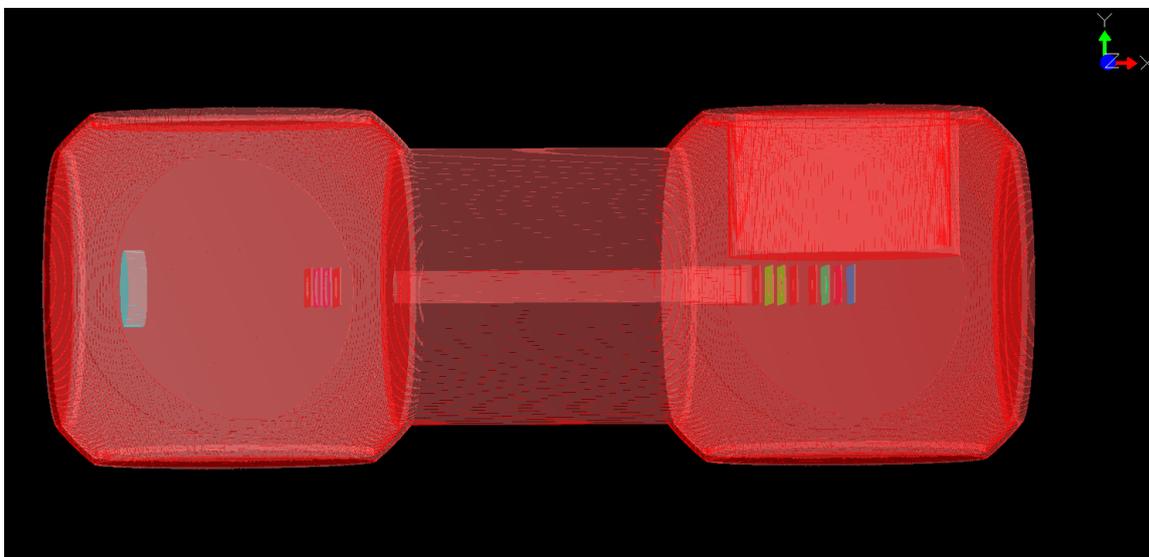


FIGURE 3.3 – Schéma représentatif de l'expérience de désorption.

Comme je l'ai indiqué ci-dessus, j'ai opté pour l'option la plus rapide pour modéliser intégralement l'expérience, celle du fichier GEM prédéfini au préalable à l'aide d'un fichier texte. La figure (3.3) représente le schéma de l'expérience de désorption à 3 dimensions. On retrouve sur cette géométrie l'ensemble des deux enceintes sous vide reliées par un tube. Pour visualiser de plus près les dimensions du dispositif, je représente sur la figure (3.4) une coupe à 2D dans le plan (x,z). La désorption laser aura lieu dans la première enceinte, qui se trouve à droite sur ce schéma. Cette enceinte contient l'électrode soumise à un potentiel constant, à droite de la goutte, et les plaques d'extraction retardée et la première lentille d'Einzel à gauche. La seconde enceinte contient une deuxième lentille d'Einzel et les galettes de détection du spectromètre de masse. L'ensemble des électrodes rectangulaires du dispositif possèdent la même dimension (71mm x 41mm x 2mm).

L'électrode  $E_3$  de la figure (3.4) représente la première plaque de l'extraction

retardée. Elle est constituée d'une grille de dimensions (60mm x 27mm x 1mm). La deuxième plaque  $E_4$  et la dernière plaque de l'extraction retardée sont percées d'une grille circulaire au centre, de diamètres de 15 mm et 10 mm respectivement. Chacune des lentilles Einzel 1 et Einzel 2 contient 4 plaques. Les deux plaques extérieures sont toujours reliées à la masse et les deux autres sont percées d'un trou de 20 mm et 35 mm respectivement. Le rôle de ces lentilles est de collimater le faisceau d'ions au niveau du détecteur pour optimiser la transmission. Le potentiel appliqué sur les électrodes centrales de chaque lentille dépend donc des caractéristiques des ions que l'on souhaite détecter.

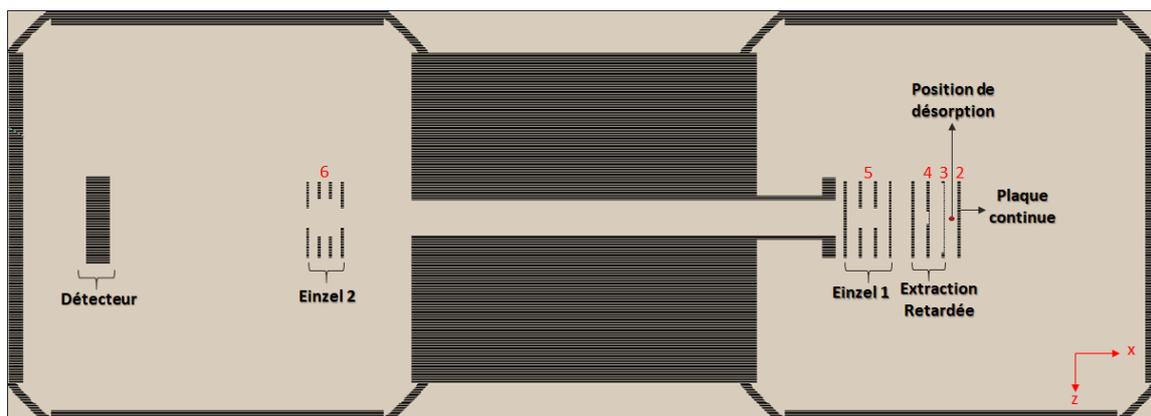


FIGURE 3.4 – Coupe 2D de l'expérience de désorption (vue de dessus).

### 3.3.3 Programmation sous SIMION : extraction retardée

L'option de programmation sur SIMION permet de contrôler les tensions des électrodes, de définir ou modifier les champs et d'agir sur la trajectoire des ions pendant leurs vols. Pour faire tout cela, un programme d'extraction retardée a été écrit avec le langage Lua. Ce programme est décrit en détail dans la thèse de Serge-Daniel Leite [84]. Il permet de pulser les électrodes  $E_3$  et  $E_4$  (voir figure 3.4). Ces deux plaques sont donc pulsées pendant un certain temps (durée d'extraction) et après un certain délai (délai d'extraction) par rapport à l'instant de création des ions, qui lui aussi peut être défini dans la simulation.

La large distribution de vitesses des ions désorbés est un inconvénient pour la résolution du spectromètre de masse qui peut se traduire par des pics très élargis. Pour compenser cet élargissement, on utilise une zone d'extraction dite "d'extraction retardée". Ce système est formé de différentes électrodes pulsées. Elle permet de faire une sélection en vitesse, et également d'accélérer les ions lents et de ralentir les ions rapides. Par exemple, un ion de faible vitesse, aura moins progressé entre les deux électrodes pulsées qu'un ion rapide, et va donc subir une accélération plus importante du fait de la force électrique dans la région qu'il traverse. Il quitte donc cette région avec une énergie cinétique plus importante, lui permettant de rattraper les autres ions plus rapides de même masse et charge, ce qui permet d'améliorer la résolution.

**Exemple de fonctionnement de l'extraction retardée**

Pour mieux comprendre le fonctionnement du programme dans la simulation, je présente ci-dessous un exemple simple pour un anion de la molécule de Vancomycine de masse ( $m = 1449$  u) et de charge ( $q = -e$ ). Selon l'énergie cinétique initiale de l'ion, différents effets de l'extraction retardée sur la trajectoire de l'ion peuvent être observés. Pour les deux cas représentés, l'ion part de la position de désorption avec une énergie initiale nulle (figure 3.5) et une énergie de 10 eV (figure 3.8). La différence de potentiel entre la plaque continue  $E_2$  (-222 V) et la plaque  $E_3$  (0 V) va accélérer l'ion. Cette accélération se traduit par une énergie cinétique gagnée par l'ion.

Lorsque le temps de vol de l'ion devient égal au délai d'extraction défini dans le programme ( $t = 9$   $\mu$ s pour cet exemple), le programme va porter les potentiels des électrodes  $E_3$  et  $E_4$  à une valeur non nulle. Un potentiel de -2900 V et -2200 V sont appliqués respectivement sur  $E_3$  et  $E_4$  pendant une microseconde (durée d'extraction).

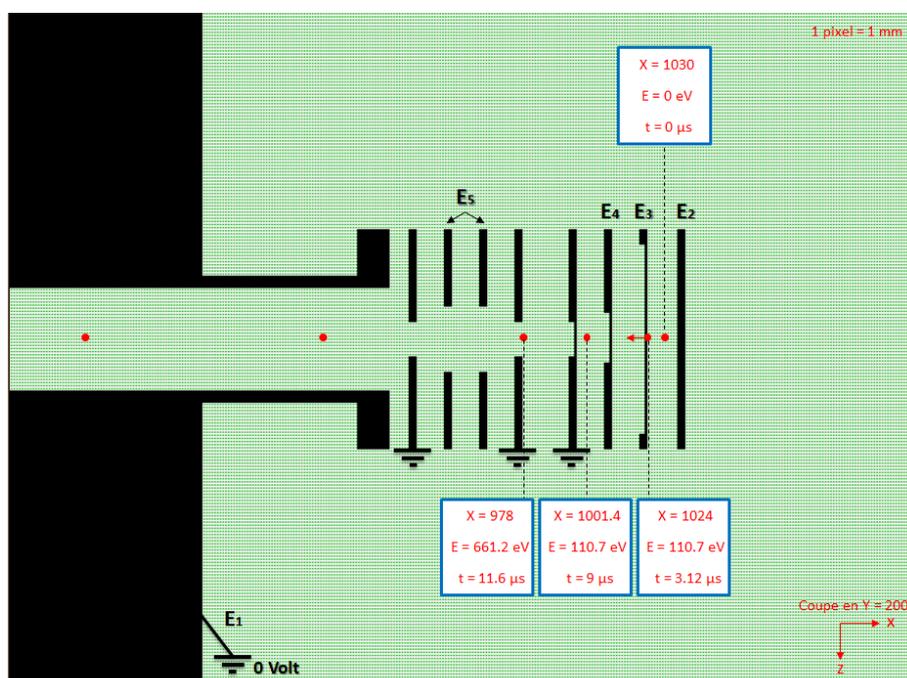


FIGURE 3.5 – Positions stratégiques d'un ion ( $m=1449$  u,  $q=-e$ ) dans la première enceinte (énergie initiale nulle). Vue bidimensionnelle ( $y = 200$  pixels) de l'extraction retardée, suivie de la première lentille d'Einzel. Le délai d'extraction des électrodes  $E_3$  et  $E_4$  est de 9  $\mu$ s.

La trajectoire suivie par l'ion à partir de l'instant où l'on applique le pulse d'extraction dépend fortement de la position et de l'énergie de l'ion à cet instant. La figure (3.5) représente quelques points stratégiques de la position de l'ion en fonction de son énergie et de son temps de vol. L'ion part de la position de désorption en  $x = 1030$  dans cette géométrie, il arrive au niveau de l'électrode  $E_3$  après un temps  $t = 3.12$   $\mu$ s, son énergie augmente de 0 à 110.7 eV. Il continue ensuite son chemin avec cette même énergie dans un mouvement rectiligne sans accélération. Après 9  $\mu$ s, il se trouve entre les deux dernières plaques de l'extraction retardée, ce qui correspond à  $x = 1001$ . À cet instant ( $t = 9$   $\mu$ s) le programme va porter les électrodes de l'extraction

retardée à un potentiel non nul. L'ion doit de nouveau subir une accélération dans la même direction et le même sens que celui de sa vitesse. L'effet de la lentille d'Einzel 1 est ressenti par l'ion dès sa sortie de la zone d'extraction retardée située à 18 mm de cette lentille. Cet effet a pour conséquence de freiner l'ion le long de sa trajectoire vers cette dernière. La décélération est due à l'absence d'homogénéité du champ électrique dans cette région, puisque la première plaque de la lentille d'Einzel (reliée à la masse) n'est pas une plaque pleine mais elle est percée au centre (figure 2.2). En effet, l'ion ressent un gradient de potentiel créé par les autres plaques qui sont à des potentiels non nuls. La figure (3.6) montre la variation du potentiel électrique en fonction de la position sur la première plaque centrale de la première lentille d'Einzel (voir  $E_5$  sur la figure (3.5)). Cette surface à deux dimensions montre que le potentiel reste constant partout sur la plaque (-832 V) hormis la zone percée au centre de la plaque où la valeur du potentiel diminue linéairement. Le trou de l'électrode  $E_5$  d'Einzel 1 n'avait pas de grille comme dans le cas des plaques de la zone d'extraction retardée, puisque son rôle était de collimater le faisceau des ions. On remarque que la valeur minimale du potentiel vaut 630 V au centre du trou de l'électrode  $E_5$  (figure 3.6). L'ion possède une énergie de 661 eV à l'entrée de la lentille en  $x = 978$ , ce qui lui permet de franchir la barrière de potentiel de la lentille pour atteindre le détecteur.

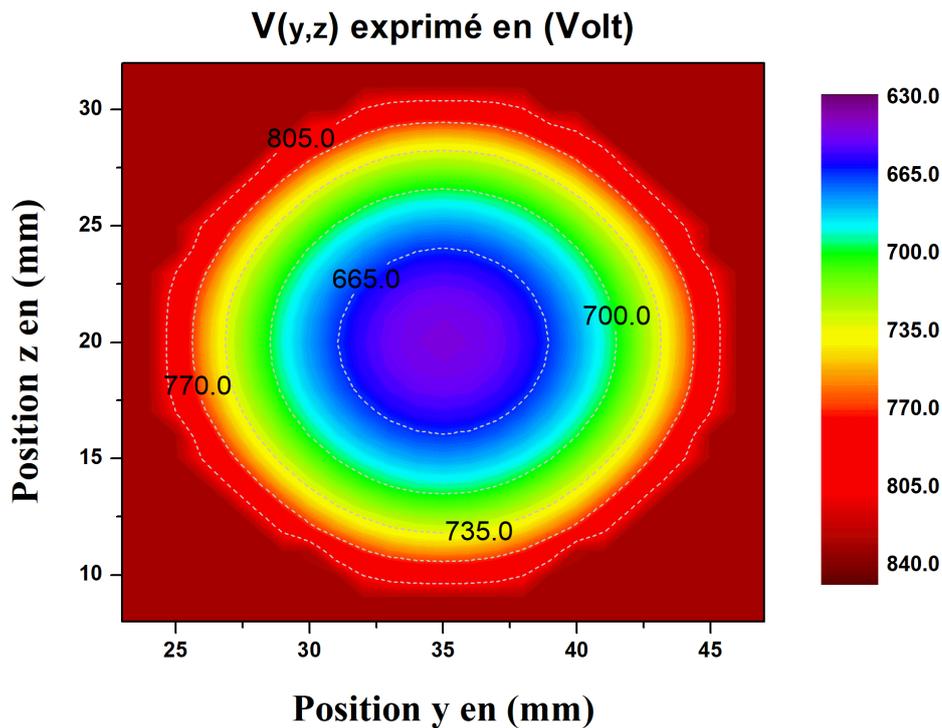


FIGURE 3.6 – Variation du potentiel électrique en fonction de la position  $(y,z)$  sur la première plaque centrale de la première lentille d'Einzel (voir  $E_5$  sur la figure 3.5).

Le deuxième cas est représenté sur la figure (3.8), il s'agit du même ion (même masse et même charge), qui part dans la même direction que celui de la figure (3.5) mais avec une énergie initiale de 10 eV. Ce dernier ne bénéficie pas de l'accélération de l'extraction retardée puisqu'à  $t = 9 \mu\text{s}$  il se trouve en dehors de cette zone. Il voit

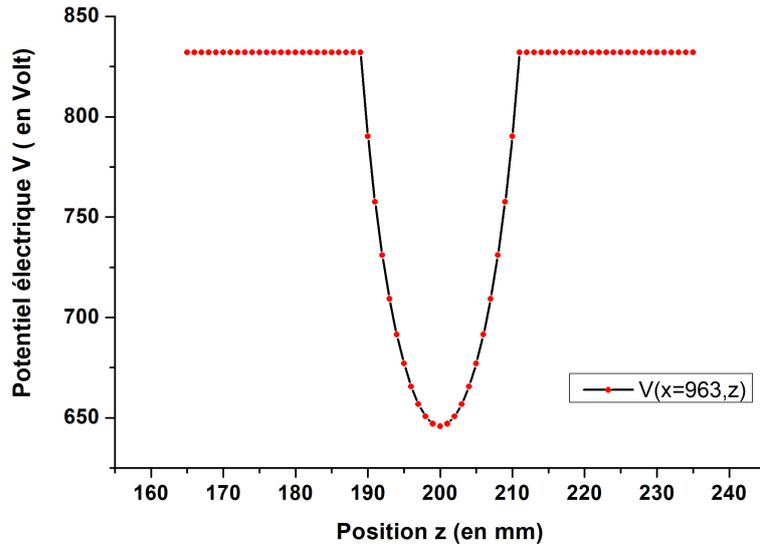


FIGURE 3.7 – Profil du potentiel électrique au niveau du trou percé dans la plaque  $E_5$  en fonction de la coordonnée  $z$ . Le minimum de potentiel se trouve en  $Z = 200$  pixels (centre de la plaque) puis il décroît symétriquement en s'éloignant du centre.

ensuite le potentiel de la lentille pour atteindre à l'entrée de la lentille d'Einzel en  $x = 978$  une énergie égale à 61.61 eV, qui est nettement insuffisante dans ce cas pour franchir la lentille. L'ion n'atteindra pas le détecteur, il rebrousse chemin.

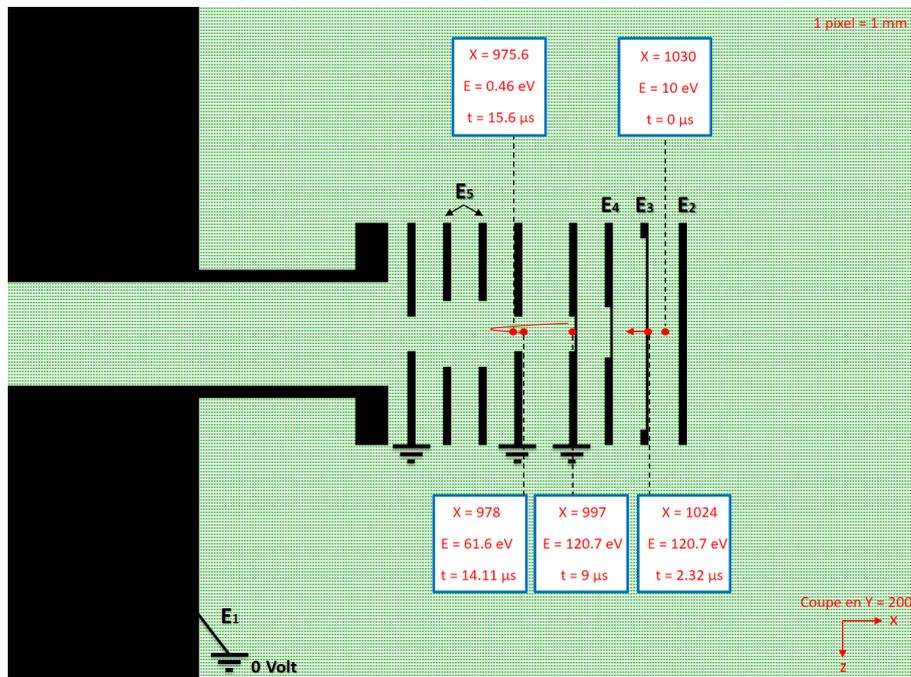


FIGURE 3.8 – Positions stratégiques d'un ion ( $m=1449 u$ ,  $q = -e$ ) dans la première enceinte partant avec une énergie initiale de 10 eV. Vue bidimensionnelle ( $y = 200$  pixels) de l'extraction retardée suivie de la première lentille d'Einzel. Le délai d'extraction des électrodes  $E_3$  et  $E_4$  est de 9  $\mu s$ .

On voit donc que suivant les conditions d'extraction, des ions « rapides » peuvent ne pas être détectés, ou bien arriver plus tard que des ions initialement plus lents, qui auront été plus accélérés. Les simulations menées vont notamment permettre de déterminer quelles sont les gammes d'énergie transmises en fonction des paramètres expérimentaux.

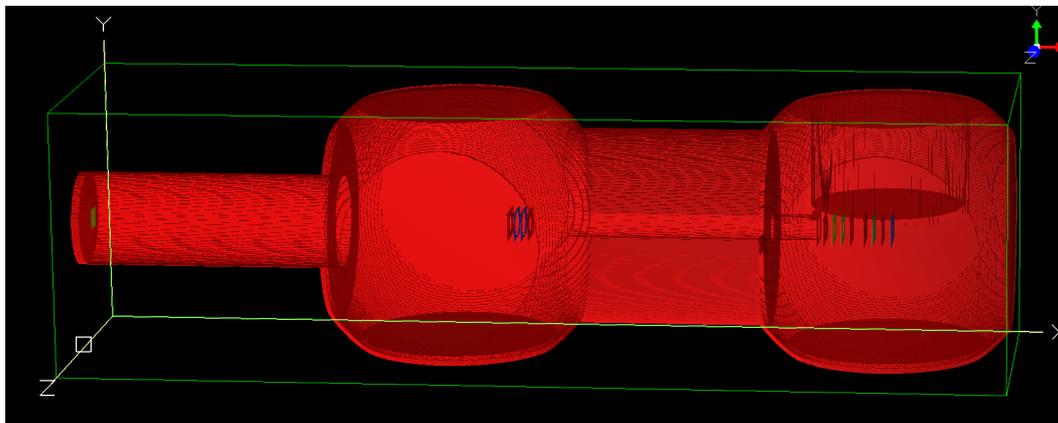


FIGURE 3.9 – Schéma représentatif de l'expérience de désorption sous SIMION.

## 3.4 Résultats des simulations

### 3.4.1 Système et paramètres de simulation

Dans la partie suivante, je vais présenter les résultats des simulations réalisées sous SIMION à l'aide du dispositif d'extraction retardée décrit ci-dessus. Le système étudié est la molécule de vancomycine ( $1449 \text{ g.mol}^{-1}$ ) qui a été étudiée expérimentalement avec notre source de désorption décrite dans le chapitre précédent. Son spectre de masse est représenté sur la figure (2.20).

Lors du processus de désorption laser, différents phénomènes peuvent avoir lieu. Les caractéristiques des ions éjectés de la goutte (distribution de vitesses initiales, masse, énergie, etc) sont en lien étroit avec le processus de désorption. Afin d'obtenir des informations sur cette désorption, j'ai réalisé plusieurs simulations en modifiant les paramètres de l'extraction retardée (délai et durée) séparément dans le but de comprendre l'effet de chacun. J'ai également modifié les paramètres des ions simulés. Ces paramètres sont principalement les distributions des vitesses initiales et de leurs orientations. J'ai choisi pour la première simulation une distribution d'énergie initiale comprise entre 0 et 5 eV. Cette gamme d'énergie correspond à une large distribution de vitesses comprises entre 0 et  $800 \text{ m.s}^{-1}$ , ce qui est de l'ordre de grandeur des vitesses expérimentales mesurées par Teraski et ses collaborateurs [54] qui estiment les vitesses des ions éjectés d'une goutte d'éthanol par irradiation avec un laser IR ( $2.96 \mu\text{m}$ , 8 mJ) à  $1000 \pm 300 \text{ m.s}^{-1}$ . D'autres gammes de vitesses sont mesurées par Kohno et al. [49] lors d'une désorption laser sur un jet liquide d'aniline. Selon eux, suivant l'énergie du laser IR de désorption (0.5 - 8 mJ), on peut distinguer deux régimes de vitesses : les ions rapides ( $1400 - 2300 \text{ m.s}^{-1}$ ) et les lents ( $780 - 1500$

m.s<sup>-1</sup>). Abel et al. [72] ont mesuré, pour la désorption d'un jet d'eau liquide à l'aide d'un laser IR (0.5 mJ, 2.8 μm), des vitesses plus grandes d'un ordre de grandeur (5000-8000 m.s<sup>-1</sup>) par rapport à celles que j'ai simulées.

La gamme de vitesse que j'ai choisie correspond donc plutôt à des ions lents, et pourra être étendu dans des études ultérieures. Les simulations que j'ai réalisées permettent d'étudier l'effet de ces distributions de vitesses sur la distribution des temps de vol et sur la transmission du spectromètre de masse. D'autres simulations sont réalisées en prenant des énergies constantes et une distribution angulaire de vecteurs vitesses (de norme constante) et seront également discutées ci-dessous.

### 3.4.2 Transmission du spectromètre de masse

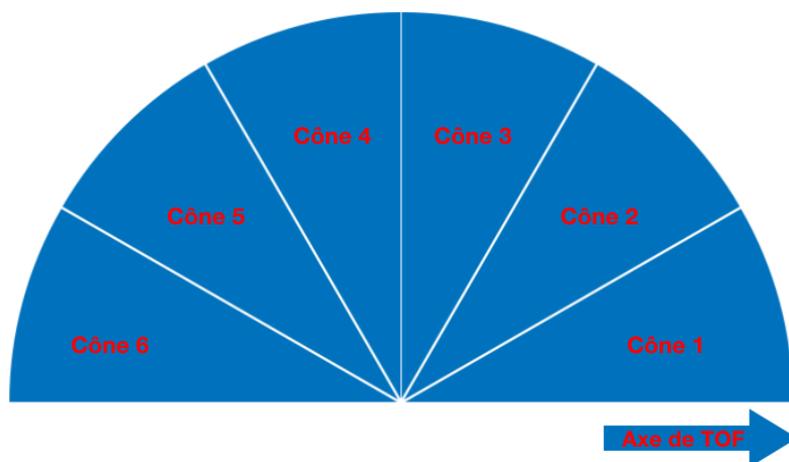


FIGURE 3.10 – Schématisation de six cônes remplissant un demi espace pour des simulations de la désorption de gouttelette sous SIMION. Chaque cône de demi angle de 15° est simulé avec  $10^{+6}$  à  $10^{+7}$  ions de vancomycine ayant suivant les cas ou bien une même énergie cinétique initiale ou bien suivant une distribution uniforme d'énergies initiales.

Le graphique polaire de chacune des trois figures suivantes (3.11), (3.12) et (3.13) représente le pourcentage de la transmission globale ( $\frac{\text{Ions détectés}}{\text{Ions simulés}} \times 100$ ) de notre spectromètre de masse schématisé sur la figure (3.9). Cette transmission est simulée pour les trois délais 6, 7 et 8 μs avec une durée d'extraction fixée à une microseconde dans les premières simulations réalisées, puis d'autres valeurs seront discutées à fin de ce chapitre. Les délais simulés représentent la gamme pour laquelle le système étudié ( $10^{+7}$  ions par cône avec une distribution d'énergie initiale entre 0 et 5 eV par pas de 0.01 eV pour chacun) permet d'obtenir un seuil de transmission globale supérieur à 1%. Pour les délais inférieurs à 5 μs ou bien supérieurs à 9 μs la transmission est nulle. Nous avons donc simulé (pour chaque délai) 6 cônes de demi angle 15° remplissant au total un demi-espace pour représenter l'éjection des ions d'une gouttelette.

La première figure (3.11) correspond au plus petit délai. Cette simulation montre que la majorité des ions arrivant sur le détecteur parmi l'ensemble des ions simulés sont principalement ceux qui partent dans la direction du détecteur. C'est la distribution du cône 1 qui donne une transmission autour de 16.13 %, tandis que les autres

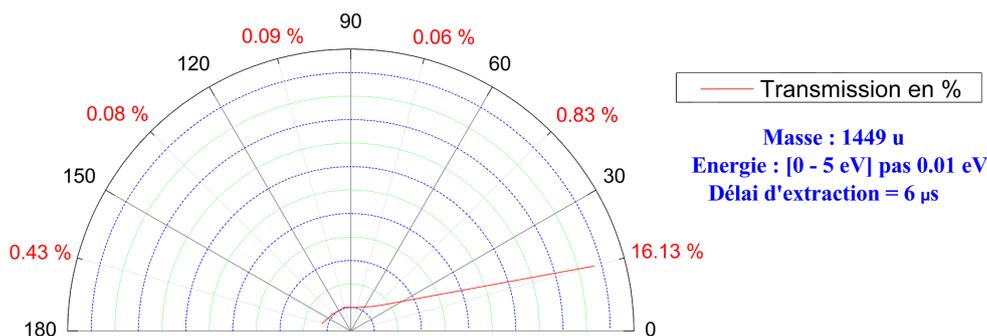


FIGURE 3.11 – Simulations SIMION de la transmission de spectromètre de masse. Chaque cône de demi angle  $15^\circ$  est simulé avec  $10^{+7}$  ions de vancomycine dont la distribution d'énergie cinétique vaut (0 - 5 eV par pas de 0.01 eV). Le délai d'extraction pour chacun de six cônes simulés est de  $6 \mu\text{s}$ , et la durée d'extraction est de  $1 \mu\text{s}$ .

directions, y compris celles où les ions partent sur l'axe mais dans le sens opposé (i.e. cône 6) ne sont pas transmis pour ce délai.

Pour  $7 \mu\text{s}$ , la transmission est nettement plus efficace par rapport à  $6 \mu\text{s}$  pour les directions entre les cônes 2 à 6 (figure 3.12). Néanmoins tous les ions ayant de grandes composantes de vitesses perpendiculaires à la trajectoire de l'axe de temps de vol (TOF), c.à.d. ceux qui partent entre  $60^\circ$  et  $120^\circ$ , sont moins bien transmis que les autres. Les ions qui se dirigent vers la plaque continue située à droite de la position source (voir figure 3.4) et qui est portée à un potentiel fixe de  $-222 \text{ V}$ , rebroussement chemin afin d'arriver dans la zone de l'extraction retardée au moment du pulse d'extraction. Ceci permet de les accélérer pour atteindre le détecteur, ce qui explique que l'on obtient un taux de transmission égal à  $15.68\%$  pour le cône 6, comparable à celui de la direction opposée.

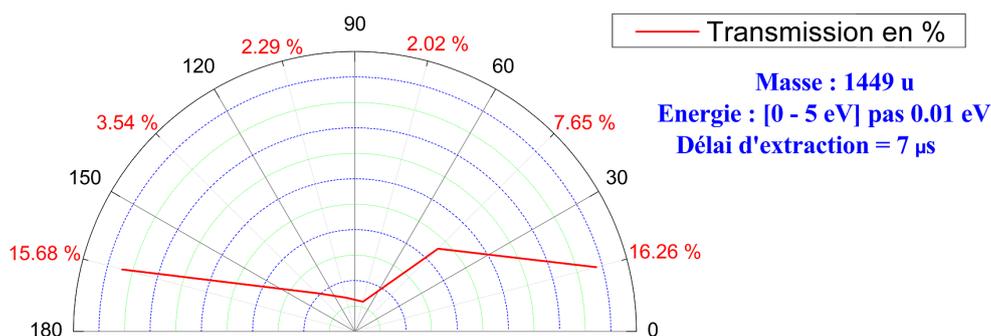


FIGURE 3.12 – Simulations SIMION de la transmission de spectromètre de masse. Chaque cône de demi angle  $15^\circ$  est simulé avec  $10^{+7}$  ions de vancomycine dont la distribution d'énergie cinétique vaut (0 - 5 eV; par pas de 0.01 eV). Le délai d'extraction pour chacun de six cônes simulés est de  $7 \mu\text{s}$ , et la durée d'extraction est de  $1 \mu\text{s}$ .

En revanche, à  $8 \mu\text{s}$  (figure 3.13) la transmission entre  $0^\circ$  et  $30^\circ$  est plus faible que celle de la direction similaire pour les deux délais précédents. En effet, seulement  $5.87 \%$  sont transmis. Après un délai de  $8 \mu\text{s}$ , les ions du cône 1 sont au niveau de la dernière plaque de l'extraction retardée portée à la masse et donc ne bénéficient

pas du champ électrique censé les accélérer. C'est pour cette raison qu'on récupère mieux les ions qui vont dans la direction du cône 6 : ces ions sont repoussés par l'électrode à tension continue et arrivent dans la zone d'accélération au moment où le pulse d'extraction est appliqué.

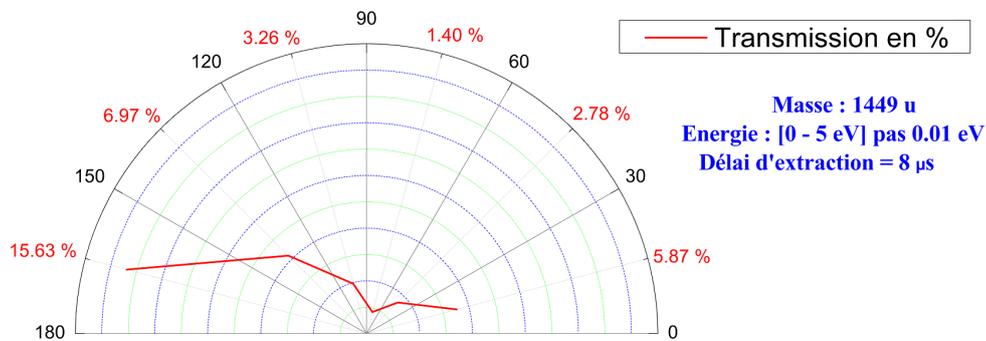


FIGURE 3.13 – Simulations SIMION de la transmission de spectromètre de masse. Chaque cône de demi angle  $15^\circ$  est simulé avec  $10^{+7}$  ions de vancomycine dont la distribution d'énergie cinétique vaut (0 - 5 eV ; par pas de 0.01 eV). Le délai d'extraction pour chacun de six cônes simulés est de 8  $\mu$ s, et la durée d'extraction est de 1  $\mu$ s.

En résumé des trois simulations précédentes, la transmission globale des ions en fonction du délai d'extraction (sélectionné afin d'obtenir une transmission moyenne supérieure à 1% pour le système étudié), montre par la simulation de  $6.10^7$  ions de vancomycine remplissant un demi espace que l'extraction retardée avec un délai de 7  $\mu$ s permet une meilleure transmission (environ 8 %, par rapport à 3 % pour le délai 6  $\mu$ s et 6 % pour 8  $\mu$ s).

Cette analyse angulaire à l'aide des distributions des ions d'énergie différentes dans six cônes montre la sensibilité de la transmission vis à vis la direction des vecteurs vitesses qui partent tous d'un point source simulant la position de la gouttelette. Cette transmission est d'autant plus faible que les ions désorbés possèdent de plus grandes composantes de vecteur vitesse perpendiculaires à l'axe du détecteur (quelque soit le délai d'extraction utilisé).

Dans le cas d'une désorption anisotrope, les vecteurs vitesses dépendent de la direction considérée. Dans cette configuration d'anisotropie, l'ouverture angulaire<sup>2</sup> de la lentille de Einzel vaut 0.111 sr pour une distance de 52 mm séparant la lentille de la position de désorption. Si on rapproche cette lentille le plus près possible de la sortie de la zone d'extraction retardée (par exemple à 3 mm), l'ouverture angulaire devient 0.213 sr, ce qui permet de mieux refocaliser le faisceau. Autrement, l'utilisation d'un piège ionique trouve tout son importance. Ce piège sera situé en aval de la zone de désorption comme cela a été indiqué dans le chapitre précédent, afin de collecter le plus grand nombre d'ions pour gagner ensuite en intensité et améliorer le rapport signal/bruit par l'augmentation du nombre de particules transmises. Des expériences

2. L'angle solide sous lequel le faisceau des ions voit la lentille de Einzel.

de désorption laser réalisées par Teraski et al. [54] sur des gouttelettes d'éthanol ( $\phi$  70  $\mu\text{m}$ ) montrent que la puissance laser joue un rôle prépondérant dans la détermination d'un caractère anisotrope ou pas de la désorption. Notamment lorsque cette puissance est supérieure à un seuil de  $3 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ , l'explosion de la gouttelette est totalement anisotrope (voir figure 3.14).

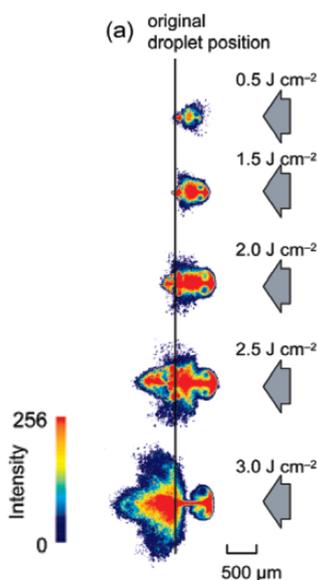


FIGURE 3.14 – Images CCD obtenues après  $10 \mu\text{s}$  de l'irradiation d'une gouttelette d'éthanol ( $\phi$  70  $\mu\text{m}$ ) pour plusieurs densité d'énergie du laser d'excitation ( $2,96 \mu\text{m}$ ). Les couleurs indiquent l'intensité de la lumière diffusée par la sonde ( $532 \text{ nm}$ ). Le détecteur est saturé dans la région rouge. À  $3 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  la désorption est complètement anisotrope. Figure tirée de [54].

La direction du laser de désorption par rapport à l'axe de détection est l'un des paramètres expérimentaux qui déterminent l'angle solide sous lequel les ions sont éjectés. Dans l'exemple de la figure (3.14) l'irradiation de la goutte se réalise du côté droit de cette dernière comme l'indique le sens de la flèche grise. L'imagerie du plan de la goutte contenant le laser de désorption montre que les ions sont entièrement émis vers l'avant avec la densité d'énergie de  $3 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . En revanche, pour  $0.5 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  les ions partent dans le sens contraire à celui du faisceau. Ainsi, dans la première version de notre expérience de désorption (cf. 2.1) le laser était focalisé perpendiculairement à l'axe de la goutte et à l'axe de temps de vol. En tenant compte des simulations, et afin de favoriser une désorption axiale, c.à.d. une désorption maximale des ions dans la direction de l'axe de TOF qui permet d'obtenir une meilleure transmission, il pourrait être pertinent d'envisager de modifier l'orientation de ce laser de désorption, par exemple en irradiant parallèlement à l'axe de TOF ou à des faibles angles avec cet axe. Ainsi, selon la puissance utilisée, l'irradiation permettra d'éjecter des ions dans la même direction que celle du laser ou dans le sens inverse (faible densité d'énergie) comme dans le cas du Maldi (cf. 1.17) où les espèces désorbées sont éjectées dans le sens contraire à la direction du laser. Ceci soulève cependant plusieurs difficultés techniques (la première plaque du dispositif d'extraction est une plaque pleine, il

faudrait courber la trajectoire des ions après désorption pour que le détecteur ne se trouve pas sur la trajectoire du faisceau laser, de plus pour pouvoir irradier il faut percer cette plaque pleine, ce qui aura comme effet de modifier l'homogénéité du champ électrique dans la zone d'extraction retardée).

### Transmission en fonction de l'énergie cinétique

Dans ce qui suit, on se place dans le cas d'une distribution angulaire selon le cône 1 (voir figure 3.10). Ce choix est fait en raison de la grande transmission obtenue dans cette direction. La figure (3.15) montre la transmission du spectromètre de masse à temps de vol en fonction de l'énergie cinétique des ions pour différents délais d'extraction allant de 5  $\mu\text{s}$  à 9  $\mu\text{s}$  avec une durée fixe à 1  $\mu\text{s}$ . Chaque point est obtenu par simulation de  $10^6$  ions de vancomycine ayant tous une même énergie initiale. Les différentes énergies simulées sont comprises dans la gamme (0 - 5eV) représentée ci-dessus pour les transmissions en fonction des angles et discutée dans la partie suivante dans le cas d'une distribution d'énergie. Deux valeurs supplémentaires (7 eV et 10 eV) sont simulées afin de voir l'évolution de la transmission après 5 eV.

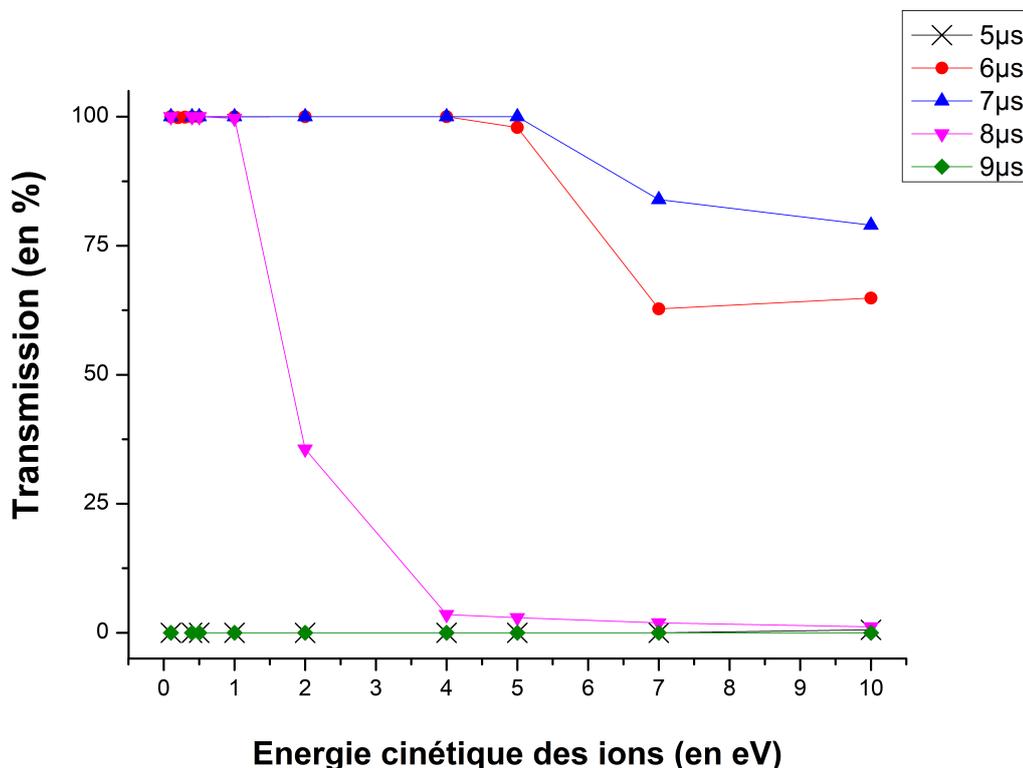


FIGURE 3.15 – Transmission du spectromètre de masse à temps de vol en fonction de l'énergie cinétique des ions pour différents délais d'extraction avec une durée d'extraction de 1  $\mu\text{s}$ . Chaque point est obtenu par simulation du cône 1 avec  $10^6$  ions de vancomycine avec une charge négative et une masse de 1449 u.

Les ions extraits à 5 ou 9  $\mu\text{s}$  n'atteignent pas le détecteur, ce qui donne une transmission nulle. Par contre, pour les délais d'extraction 6 et 7  $\mu\text{s}$ , les ions éjectés à des énergies cinétiques entre 0 et 5 eV (voir figure 3.16) sont tous transmis<sup>3</sup>. Les énergies supérieures à 5 eV sont également transmises. Pour le délai de 8  $\mu\text{s}$  la majorité des ions qui arrivent sur le détecteur sont des ions ayant une énergie cinétique initiale inférieure à 1 eV.

Ces simulations montrent que le délai d'extraction joue le rôle d'un filtre d'énergie pour les ions. En appliquant un délai d'extraction de 6 ou 7  $\mu\text{s}$ , nous pouvons extraire une large gamme d'énergie, notamment les ions les plus énergétiques (au-delà de 5 eV). Ces ions énergétiques arrivent en premier dans la zone de champs pulsé par rapport à ceux de faible énergie s'ils sont créés en même temps (la prise en compte de différents temps de création des ions après désorption rajoute un paramètre supplémentaire qu'on n'a pas discuté dans ces simulations et qui pourrait avoir une influence sur la transmission). En revanche, l'extraction avec un délai de 8  $\mu\text{s}$  ne permet pas d'accélérer ces ions énergétiques qui sont alors écartés puisqu'ils n'arrivent pas sur le détecteur. Nous pouvons, en choisissant finement le délai d'extraction expérimental, sélectionner la tranche d'énergie à transmettre parmi une large distribution d'énergie initiale des espèces désorbées. La précision en temps sur le délai est fixé par le GINI (figure 2.8), qui a une précision de l'ordre de la nanoseconde, et de la durée du front montant, qui est de 100 à 200 ns. Avec la sélection en énergie, on peut ensuite envisager d'isoler les ions dans un piège ionique placé en aval du système d'extraction retardée afin de les interroger par spectroscopie IR par exemple. Ceci pourrait permettre de réaliser des études structurales pour étudier l'effet de l'énergie initiale sur la conservation de la structure native par exemple.

### Transmission en fonction de la distribution angulaire (cas d'une distribution d'énergie)

Les histogrammes de la figure (3.16) montrent le nombre d'ions transmis pour le premier cône simulé avec une distribution angulaire entre  $0^\circ$  et  $30^\circ$  à trois délais différents. L'axe d'ordonnée des histogrammes représente le nombre d'ions détectés qui déterminent les taux de transmission qui sont présentés sur les graphiques polaires ci-dessus. Ainsi dans cet exemple, les délais 6 et 7  $\mu\text{s}$  permettent comme dans le cas des énergies constantes (voir figure 3.15) de transmettre toute la gamme de la distribution d'énergie entre 0 et 5 eV. Il en est de même pour le délai de 8  $\mu\text{s}$ , pour lequel seuls les ions de faible énergie sont efficacement transmis.

Le récapitulatif de la distribution des énergies cinétiques initiales des ions transmis en fonction des angles<sup>4</sup> entre le vecteur vitesse initiale et l'axe de temps de vol est représenté sur les deux figures (3.17) et (3.18) pour trois délais d'extraction (6, 7 et 8  $\mu\text{s}$ ) et une durée d'extraction de 1  $\mu\text{s}$ . La largeur de la distribution d'énergie est

---

3. Une énergie de 5 eV d'un ion de vancomycine correspond à vitesse de  $800 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$

4. Chaque distribution angulaire représente la simulation d'un cône de demi angle de  $30^\circ$ . Les angles représentés sur l'axe horizontal des figures (3.18) et (3.17) représentent l'angle entre l'axe de chaque cône et l'axe de temps de vol dirigé vers détecteur.

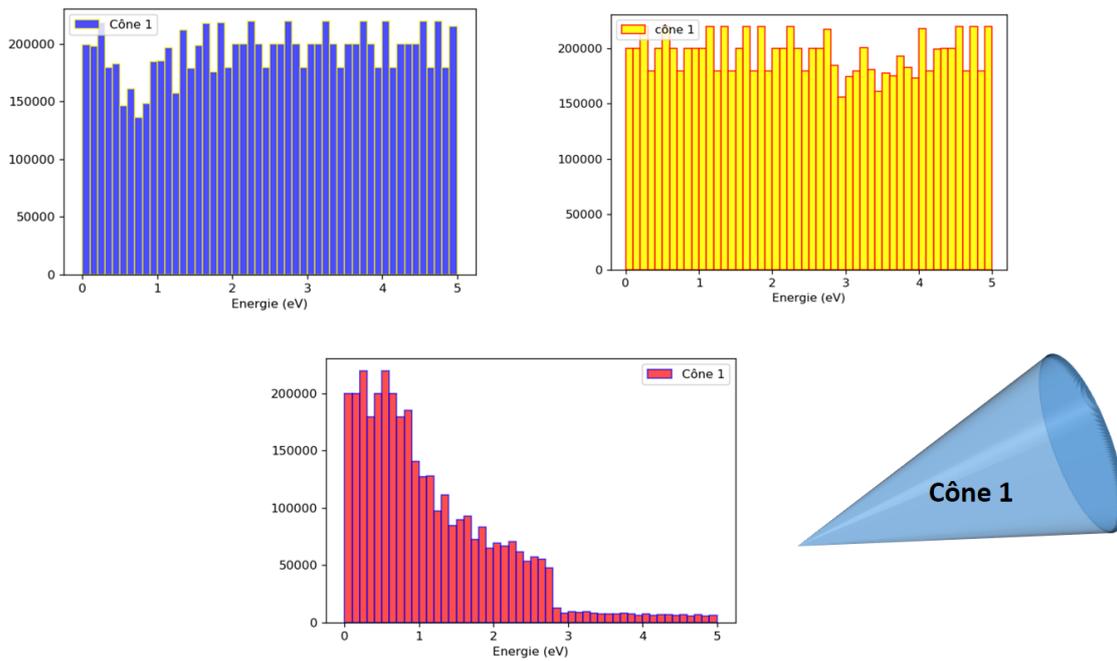


FIGURE 3.16 – Nombre des ions arrivant au niveau du détecteur en fonction de leur énergie initiale pour le cône 1. Les délais d'extraction sont respectivement  $6 \mu\text{s}$  (histo bleu),  $7 \mu\text{s}$  (histo jaune) et  $8 \mu\text{s}$  (histo magenta).

mesurée à partir d'un seuil de 50 % du nombre maximal des ions transmis avec les trois délais 6, 7 et 8  $\mu\text{s}$  pour chaque cône.

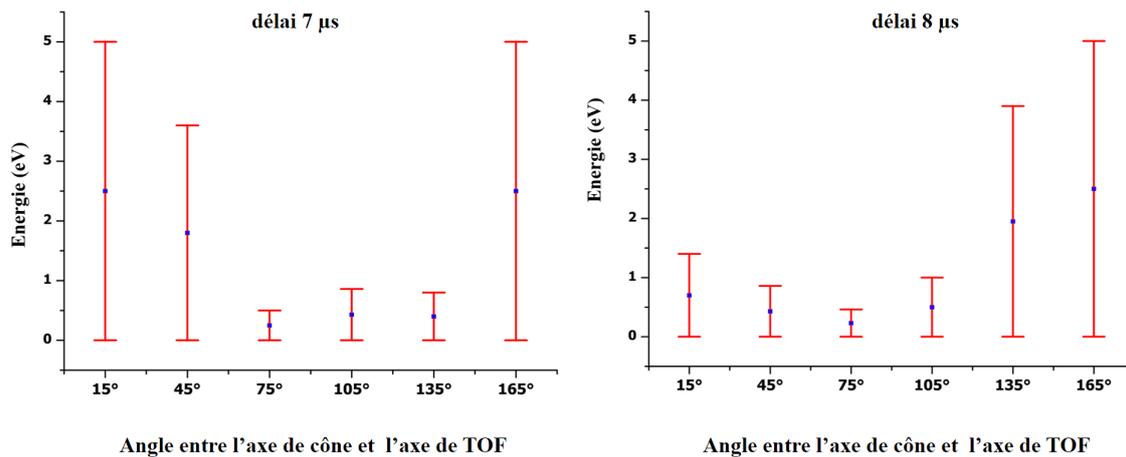


FIGURE 3.17 – Énergie cinétique initiale des ions transmis pour un délai de  $7 \mu\text{s}$  (à gauche) et  $8 \mu\text{s}$  (à droite) en fonction de la distribution angulaire (cônes de demi angle de  $30^\circ$ ). La durée d'extraction est de  $1 \mu\text{s}$ .

À  $7 \mu\text{s}$  (voir figure 3.17), toutes les énergies entre 0 et 5 eV sont transmises pour

les directions du cône pointant vers le détecteur (cône à  $15^\circ$ ) et pour celui à  $165^\circ$  (dans le sens opposé au détecteur (figure 3.10)), et la transmission est maximale comme vu précédemment (figure 3.12). Au fur et à mesure que la composante de vitesse orthogonale à l'axe de temps de vol augmente, on observe une chute de la transmission, qui s'explique par la perte des ions les plus énergétiques. En effet, les seuls ions transmis sont ceux qui possèdent une faible énergie de départ. C'est le cas également pour le délai de  $8 \mu\text{s}$  (figure 3.17), avec plutôt une meilleure transmission des vecteurs vitesses ayant des angles élevés avec l'axe de temps de vol (direction opposée du détecteur).

Pour le délai de  $6 \mu\text{s}$ , toute la gamme d'énergie initiale simulée entre 0 et 5 eV est transmise pour les angles de  $0^\circ$  à  $30^\circ$  (voir figure 3.18). Par contre, pour le reste des directions (entre  $30^\circ$  et  $180^\circ$ ) seules les faibles énergies (moins de 1 eV pour  $45^\circ$ , et même moins de 0.5 eV pour les autres directions) sont transmises. En prenant un seuil plus bas (à 10% du nombre maximal des ions transmis) qui correspond à un nombre d'ions d'environ  $10^{+5}$ , toutes les énergies simulées entre  $0^\circ$  et  $105^\circ$  sont transmises. Seules les deux dernières directions ( $135^\circ$  et  $165^\circ$ ) restent inchangées avec les mêmes largeurs mesurées pour un seuil de 50 %.

La distribution d'énergie se réduit aux faibles énergies pour le reste des directions entre  $30^\circ$  et  $180^\circ$ . On n'observe pas un ré-élargissement de la gamme d'énergies transmises pour un angle de  $165^\circ$  comme pour les deux délais précédents, car les ions partant dans la direction opposée au détecteur n'ont pas le temps d'arriver dans la zone d'accélération pulsée pour ce délai d'extraction plus court.

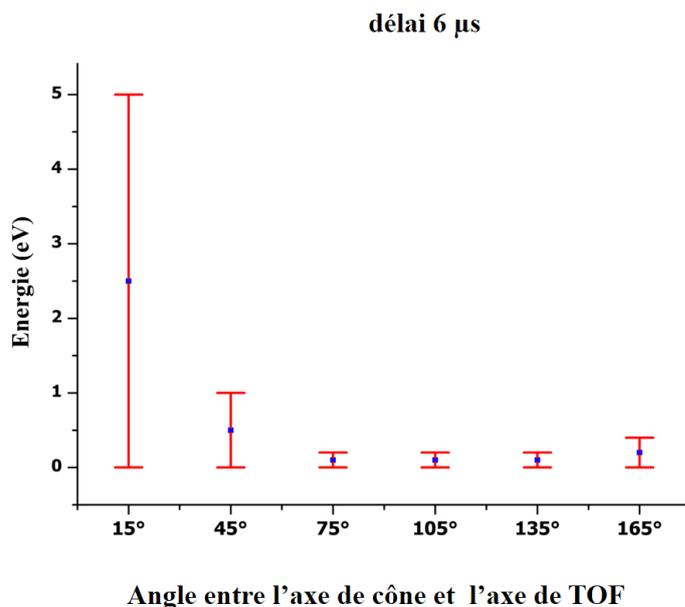


FIGURE 3.18 – Énergie cinétique initiale des ions transmis par un délai de  $6 \mu\text{s}$  en fonction de la distribution angulaire simulé par des cônes de demi angle de  $30^\circ$ . La durée d'extraction est de  $1 \mu\text{s}$ .

La chute de la transmission dans les directions entre  $60^\circ$  et  $120^\circ$  est due à la perte des ions les plus énergétiques quelque soit le délai d'extraction utilisé. Les ions s'éloignant rapidement hors axe sont en effet plus difficiles à collecter. Améliorer cette collection nécessiterait de travailler avec une zone d'extraction plus resserrée, de façon à ce que les ions disposent de moins de temps pour s'écarter de l'axe avant d'être accélérés vers le détecteur. Cependant, cela impliquerait de travailler avec des potentiels électriques élevés dans une zone assez dense, du fait de l'explosion de la gouttelette. Il faudrait également rapprocher la première lentille de Einzel de façon à augmenter son acceptation. Enfin, cette étude de l'effet de la distribution angulaire sur la gamme d'énergies transmises pourrait être couplée à une étude expérimentale plus poussée du caractère plus ou moins isotrope de l'explosion de la gouttelette (l'étude menée pour le moment se limitait à la visualisation de l'explosion dans un plan), et à l'effet de l'orientation du laser de désorption par rapport à l'axe de détection sur le nombre d'ions détectés.

### 3.4.3 Distribution de temps de vol en fonction du délai d'extraction

#### Simulations à énergie constante (0.4 eV) et angle variable ( $0^\circ - 30^\circ$ )

Afin d'étudier l'effet des délais d'extraction sur les distributions de temps de vol des ions, on présente sur la figure (3.19) une comparaison entre deux distributions de temps de vol obtenues pour les délais d'extraction 6 et 7  $\mu\text{s}$  pour l'énergie 0.4 eV discutée précédemment (voir figure 3.15). La distribution angulaire des ions a été simulée par un cône d'ouverture angulaire  $15^\circ$  et dont l'axe fait  $15^\circ$  avec l'axe de temps de vol (cône 1), pour un nombre de  $10^{+6}$  particules de vancomycine.

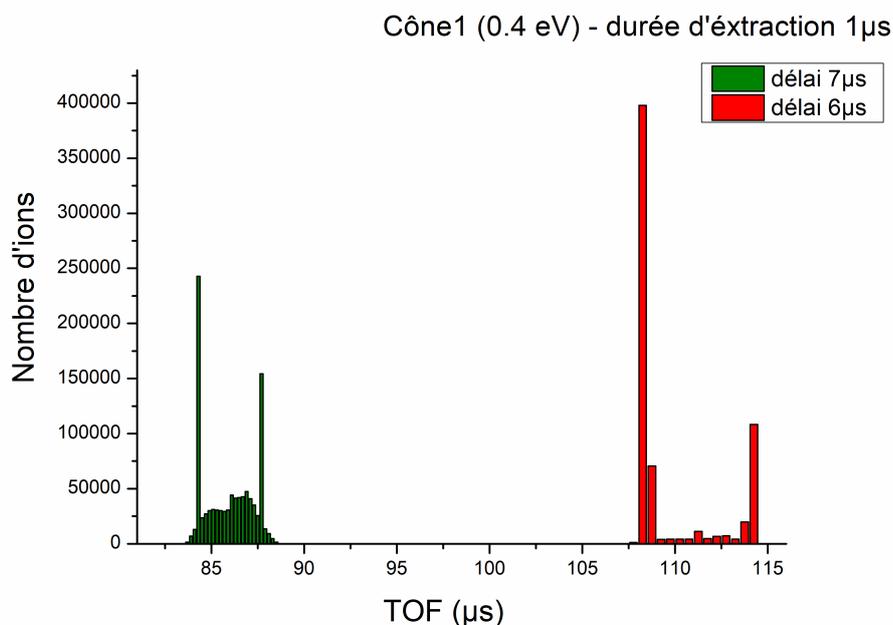


FIGURE 3.19 – Simulations SIMION de deux distributions de temps de vol de la Vancomycine obtenues pour deux délais d'extraction 6 et 7  $\mu\text{s}$ .

On pourrait naïvement s'attendre à ce que les ions extraits le plus tôt arrivent également le plus tôt au niveau du détecteur. Mais les histogrammes présentés montrent l'effet inverse : les particules extraites à  $6 \mu\text{s}$  arrivent sur le détecteur après environ  $113 \mu\text{s}$ , temps nettement plus long que celui associé au délai de  $7 \mu\text{s}$  qui est de  $86 \mu\text{s}$ .

Cet écart s'explique par le fait que la zone d'extraction retardée comporte deux zones d'accélération (une zone entre la première et la deuxième électrode pulsée, et une zone entre la deuxième électrode pulsée et une plaque reliée à la masse). Pour un délai de  $6 \mu\text{s}$ , l'ion se retrouve dans la première zone d'accélération au moment où le pulse d'extraction est appliqué, tandis qu'un ion extrait à  $7 \mu\text{s}$  a déjà traversé la première zone d'extraction et se trouve entre la deuxième électrode pulsée et la plaque à la masse. Cet ion voit un champ d'accélération plus important (les potentiels appliqués sur la première et la deuxième plaque d'extraction sont respectivement  $-2900 \text{ V}$  et  $-2200 \text{ V}$ ). Il acquiert donc une énergie plus importante, qui lui permet d'accélérer plus fortement et d'atteindre le détecteur avec un temps de vol plus court que celui d'un ion extrait plus tôt.

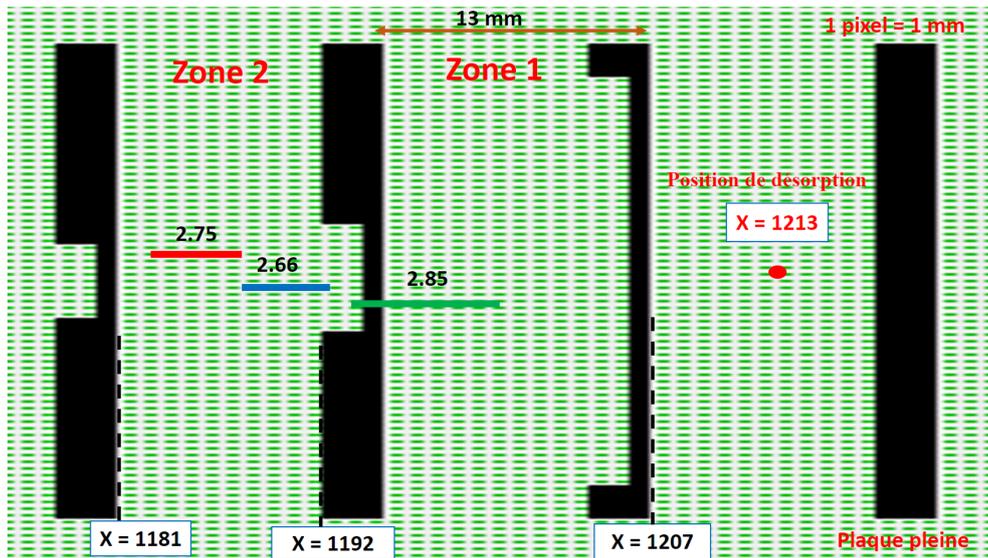


FIGURE 3.20 – Schéma représentatif de l'extraction retardée avec la plaque pleine à droite de la position de désorption. Les traits colorés montrent l'étalement en position du paquet d'ions au moment où on envoie le pulse d'extraction pour  $6 \mu\text{s}$  (vert),  $7 \mu\text{s}$  (bleu) et  $8 \mu\text{s}$  (rouge).

Pour visualiser l'étalement en position axiale du paquet d'ions au moment où on envoie le pulse d'extraction, i.e. la position de l'ion le plus lent et la position de l'ion le plus rapide arrivant dans la zone d'extraction retardée, j'ai simulé pour chaque délai d'extraction ( $6$ ,  $7$  et  $8 \mu\text{s}$ ) la position d'un ion de  $5 \text{ eV}$  partant dans la direction du détecteur et la position d'un ion d'énergie nulle partant avec un angle de  $30^\circ$ . L'étalement en position axiale est représenté sur la figure (3.20) pour chacun des délais simulés. Il permet d'observer comment les ions sont distribués dans l'une ou les deux zones d'accélération (zone 1 et zone 2).

Dans l'exemple (figure 3.19), les ions sont accélérés pendant une durée courte (une

microseconde), et donc la valeur du champ ressenti par l'ion au moment de l'extraction est déterminante pour la valeur du temps de vol. Pour des durées d'extraction plus longues, les ions ont le temps de passer d'une zone d'accélération à l'autre pendant la durée du pulse, et l'effet du délai d'extraction sur le temps de vol est moins déterminant, comme on le verra dans la dernière section de ce chapitre qui porte sur l'effet de cette durée d'extraction et sur son importance pour la compréhension du processus d'extraction.

TOF ( $\mu\text{s}$ )	X (position)	E (volt)	KE (eV)
0	1213	-110.781	0.4
0	1213	-110.781	0.4
6	1195.23	-0.0257732	111.096
6	1195.23	-0.0257732	111.096
6.25822	1194.12	-2206.5,17	170.372
6.25822	1194.24	-0.00508817	111.117
7	1187.94	-1263.93	1120.63
7	1191.39	-0.026022	111.094
7.05	1187	-0.049057	1120.63
7.2587	1190.05	-1614.05	318.246
8.08104	1174.73	-2.86675	1117.74
8.0524	1181.31	-0.00404245	1724.53
10.4821	1148.01	-532.166	532.166
10.4313	1146.99	-620.276	1104.9
11	1143.89	-684.967	435.93
11	1140.28	-707.65	1017.24
13.6589	1120.4	-63.6824	1056.64
12.5227	1120.63	-68.7829	1655.54
103.819	19.0484	-1.77154e-022	1120.7
85.1979	19.2804	-1.02619e-021	1724.72

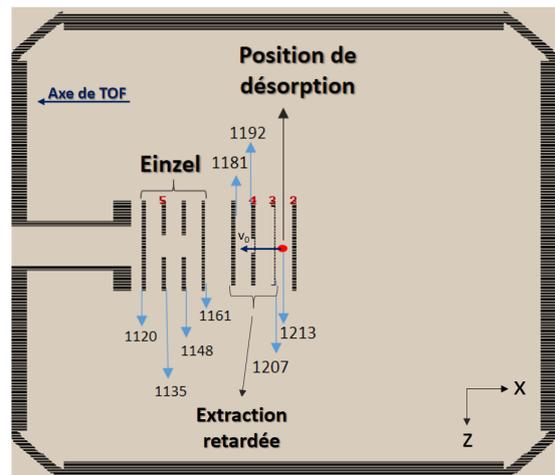


FIGURE 3.21 – À gauche : Valeurs obtenues sous SIMION pour un ion de 0.4 eV dirigé vers le détecteur. Les délais d'extraction simulés sont de 6  $\mu\text{s}$  (valeurs en rouge) et 7  $\mu\text{s}$  (valeurs en vert). À droite : Schéma représentatif de la première enceinte contenant la plaque continue à droite de la goutte (point rouge), le système d'extraction retardée et la lentille d'Einzel. Les flèches bleues indiquent la position X.

Le tableau de la figure (3.21) représente les différentes valeurs (temps de vol "TOF", position "X", potentiel électrique "E" et énergie cinétique "KE") obtenues sous SIMION pour un ion de vancomycine de 0.4 eV et dirigé vers le détecteur. Après 11  $\mu\text{s}$ , l'ion qui est extrait à 7  $\mu\text{s}$  (valeurs en vert dans le tableau) possède une énergie de 1017 eV, tandis que celui qui est soumis à l'extraction retardée après un délai de 6  $\mu\text{s}$  possède une énergie de 436 eV. Cela explique qu'au niveau du détecteur (à la position  $x = 19$  mm) l'ion extrait avec un délai de 7  $\mu\text{s}$  arrive en premier.

### Simulations pour une distribution d'énergie comprise entre 0 et 5 eV et pour des angles entre 0° et 30°

On élargit ici le cadre de la discussion précédente, qui était menée pour une unique énergie initiale. On considère maintenant une distribution d'énergies initiales entre 0 à 5 eV (par pas de 0.01 eV), toujours dans le cas d'un seul cône orienté vers le détecteur. L'écart entre les centres des deux distributions de temps de vol (figure

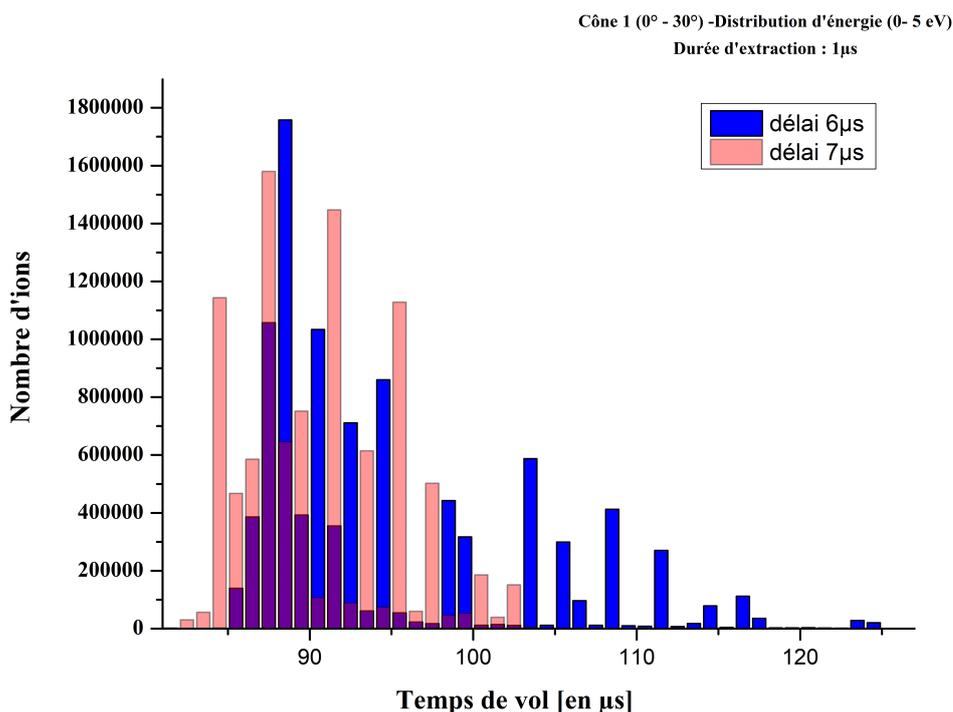


FIGURE 3.22 – Simulations de distributions de temps de vol de la Vancomycine d'énergie cinétique entre 0 à 5 eV pour les délais d'extraction 6 et 7  $\mu$ s.

3.22) est plus petit que dans le cas précédent (figure 3.19). En effet, dans le cas d'une large distribution d'énergie les histogrammes se chevauchent, mais on observe là aussi que les ions extraits à 7  $\mu$ s sont toujours les plus rapides, puisqu'ils sont globalement mieux accélérés, tandis qu'à 6  $\mu$ s, la distribution de temps de vol est plus étalée (85 - 125  $\mu$ s) car les ions sont plus répartis entre les deux zones d'accélération pulsée : une partie des ions se trouve dans la deuxième zone et est bien accélérée (temps de vol faibles), tandis qu'une autre partie se trouve dans la première zone et est moins accélérée (temps de vol plus longs).

J'ai conduit les mêmes simulations pour d'autres délais d'extraction. Les largeurs des distributions de temps de vol des ions de même distribution d'énergie (0 - 5 eV) qui sont transmis au détecteur pour 5 délais d'extraction différents sont tous représentées sur la figure (3.23). Les trois délais 5.8, 6.5 et 7.2  $\mu$ s sont choisis autour de deux autres valeurs (6 et 7  $\mu$ s) discutées précédemment (voir histogramme 3.22) et qui sont proches des valeurs expérimentales.

La plus large distribution de temps de vol est obtenue pour le délai le plus court. Cette largeur se réduit pour l'extraction à 6  $\mu$ s pour laquelle les ions arrivant au-delà de 126  $\mu$ s et qui sont transmis à 5.8  $\mu$ s sont accélérés plus efficacement à 6  $\mu$ s et arrivent donc à des temps de vol plus faibles. En augmentant le délai davantage, cette largeur se réduit encore mais de manière moins significative, et elle vaut presque la même chose pour les trois derniers délais (6.5, 7 et 7.2  $\mu$ s) qui conduisent tous à des distributions de temps de vol similaires, entre 82 et 105  $\mu$ s.

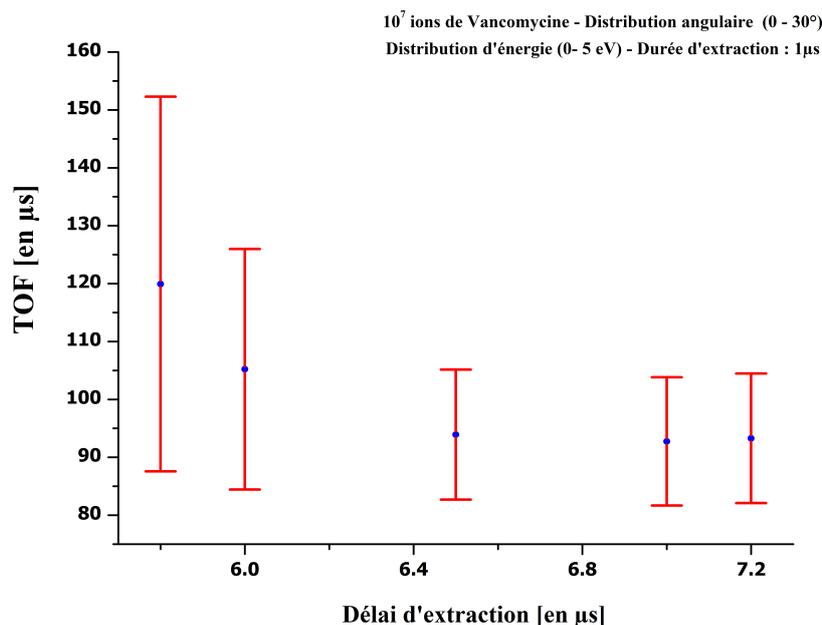


FIGURE 3.23 – Largeur de la distribution de temps de vol des ions simulés avec une extraction retardée pour les 5 délais suivants : 5.8, 6, 6.5, 7 et 7.2 µs.

En conclusion, cette simulation montre que le délai d'extraction a un effet direct sur le temps de vol des ions, et que lorsque ce délai est couplé à une durée d'extraction très courte, les temps de vol sont beaucoup plus dispersés pour les ions qui sont transmis à des petits délais. On verra ultérieurement que ce phénomène peut être utilisé avantageusement pour obtenir des informations sur le phénomène de désorption. Cependant, cette large distribution de temps de vol impacte la résolution en masse, et conduit à un élargissement des pics dans un spectre expérimental. Or, pour améliorer la résolution, il faut que les ions de même ( $m/z$ ) soient tous détectés idéalement en même temps. Ceci est mieux produit en utilisant des délais d'extraction plus grand permettant de réduire cette largeur de distribution de temps de vol pour les ions de même  $m/z$ . Il existe pour chaque système<sup>5</sup> étudié une gamme pour laquelle les délais de l'extraction retardée permettent une meilleure transmission des ions. Dans l'exemple qu'on vient de discuter cette gamme est comprise entre 5.5 et 8 µs.

Il existe une légère tendance à la diminution de la largeur de la distribution de temps de vol avec l'augmentation du délai, ce qui se traduit par une amélioration de la résolution. Pour voir si cette tendance est la même pour une distribution angulaire plus large, et pour obtenir des informations sur la transmission liée à cette distribution de temps de vol, on représente dans la partie suivante les résultats des simulations faites dans le cas d'un cône remplissant un demi-espace (voir paragraphe 3.4.2).

5. un système simulé est défini par une masse et une distribution d'énergie

### Simulations pour une distribution d'énergies comprises entre 0 et 5 eV et des angles entre 0° et 180°

Les largeurs des distributions de temps de vol des trois délais 6, 7 et 8  $\mu\text{s}$  avec une durée d'extraction de 1  $\mu\text{s}$  sont simulés pour un cône remplissant au total un demi-espace (par la somme de six cônes de demi angle de 30° qui sont discutés dans la partie (3.4.2) et représentées sur la figure (3.24).

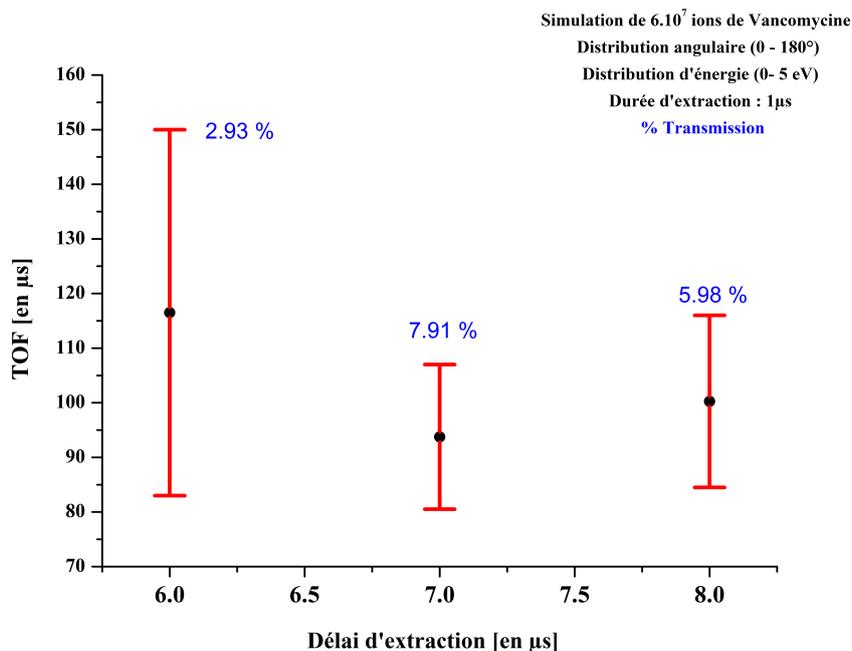


FIGURE 3.24 – Largeur de la distribution de temps de vol des ions transmis avec les délais 6, 7 et 8  $\mu\text{s}$ . Le taux de transmission est noté en bleu.

À 6  $\mu\text{s}$ , la largeur de la distribution de temps de vol des ions transmis est comprise entre 82  $\mu\text{s}$  et 151  $\mu\text{s}$ . Elle est deux fois plus grande que celle obtenue respectivement pour 7  $\mu\text{s}$  et qui est centrée autour de 93.75  $\mu\text{s}$  et pour 8  $\mu\text{s}$  autour de 100.25  $\mu\text{s}$ . La tendance observée est la même que celle décrite précédemment pour le cône 1 seul. La transmission à 6  $\mu\text{s}$  est plus faible ( $\sim 3\%$ ) que celle obtenue pour 7  $\mu\text{s}$  ( $\sim 8\%$ ).

#### 3.4.4 Effet de la durée d'extraction

Pour comprendre l'effet de la durée de l'impulsion de l'extraction retardée sur la distribution de temps de vol des ions, nous avons réalisé des simulations sur le même système étudié précédemment (la vancomycine) en prenant deux durées d'extraction supplémentaires (5 et 10  $\mu\text{s}$ ) que l'on a comparées avec la courte durée de 1  $\mu\text{s}$  qui a été simulée précédemment. Les résultats sont regroupés sur la figure (3.25).

La première conclusion que l'on tire sur l'effet de la durée d'extraction est l'élargissement des distributions de temps avec les courtes durée d'extraction. Pour une durée d'extraction d'une microseconde, les distributions de temps de vol sont les plus larges,

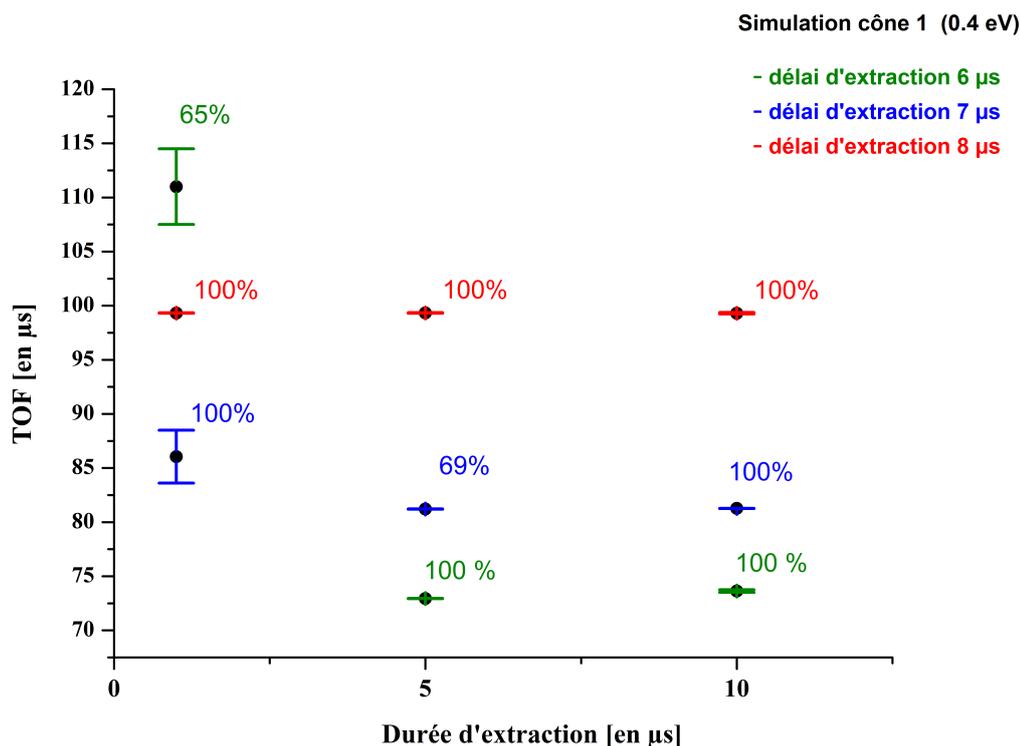


FIGURE 3.25 – Effet de la durée de l'extraction retardée sur le temps de vol des ions pour trois délais d'extraction (6, 7 et 8  $\mu\text{s}$ ). Les pourcentages représentent le taux de transmission. Les ions de vancomycine simulés possèdent une énergie de 0.4 eV, et partent vers le détecteur (cône 1, voir figure 3.10).

sauf pour un délai de 8  $\mu\text{s}$  (pour ce délai, tous les ions arrivent dans la deuxième zone d'accélération et sont accélérés par le même champ électrique).

Pour une durée de 5  $\mu\text{s}$ , les distributions de temps de vol ont des largeurs très faibles. En effet, les ions ressentent les deux champs d'accélération du système d'extraction retardée et sont donc tous accélérés de la même manière pour atteindre le détecteur à des temps similaires. Ceci ne change pas avec une durée d'extraction encore plus importante. À 10  $\mu\text{s}$ , les ions sont tous transmis pour les trois délais simulés, avec également des largeurs faibles.<sup>6</sup>

La large distribution de temps de vol des ions de même rapport masse/charge donne des spectres de masse avec des pics très larges. Dans l'exemple simulé de la vancomycine (figure 3.25), la largeur mesurée pour une énergie unique avec un délai de 6  $\mu\text{s}$  et une durée de 1  $\mu\text{s}$  vaut 8.5  $\mu\text{s}$ . Elle est donc bien plus large que celle obtenue expérimentalement (figure 2.20) pour un délai d'extraction de 8  $\mu\text{s}$  (et une durée de 5  $\mu\text{s}$ ) qui est de l'ordre de 0.5  $\mu\text{s}$  et qui correspond de plus probablement à différentes énergies désorbées. Par conséquent, dans l'intérêt de faire une spectrométrie de masse résolue qui permet par la suite d'identifier avec précision les espèces créées par désorption, il faut utiliser lors des durées d'extraction supérieures ou égales à 5  $\mu\text{s}$  qui conduisent à une meilleure résolution. En effet, la largeur devient de l'ordre

6. Les largeurs simulées valent respectivement 12, 25 et 38 ns pour les délais 6, 7 et 8  $\mu\text{s}$ .

de quelques dizaine de nanosecondes avec une durée d'extraction de 5  $\mu\text{s}$  (pour une seule énergie).

Toutefois, l'utilisation d'un système d'extraction retardée avec une petite durée (une microseconde ou moins) représente un outil très intéressant qui pourrait permettre par comparaison entre spectres simulés et spectres expérimentaux de préciser la gamme d'énergie des espèces éjectées lors du processus de désorption. Si on considère par exemple la large distribution de temps de vol obtenue par simulations des ions dont l'énergie est comprise entre 0 et 5 eV, on peut reconstruire tranche par tranche cette distribution à partir des différents intervalles de temps de vol simulés pour des énergies uniques. En comparant la distribution expérimentale des temps de vol à celle obtenue par simulation, on peut envisager de déterminer les différentes gammes d'énergie désorbées. Par conséquent, on est capable de connaître l'énergie des ions désorbés dans le cas où la distribution de temps de vol dans un spectre expérimental est la même que celle obtenue en simulation pour un système donné. Nous sommes actuellement en train de remonter le dispositif d'extraction retardée (que l'on avait remplacé par un piège pour améliorer la résolution), pour réaliser ces expériences avec une courte durée d'extraction. L'objectif est d'analyser les énergies des espèces désorbées. On peut ensuite envisager de coupler un piège à ce dispositif d'extraction retardée, afin de ne piéger que certaines gammes d'énergie. Ceci pourrait permettre de réaliser des études structurales pour une même espèce désorbée mais pour différentes gammes d'énergie, de façon à étudier les éventuels effets de cette énergie de désorption sur la conservation de la structure native.

### 3.5 Conclusion

Le processus de désorption laser sur des gouttelettes est un phénomène qui n'est pas totalement compris. Le développement des sources de mise en phase gazeuse de biomolécules d'intérêt biologique telles que la notre (voir chapitre 2), nécessite la compréhension de ce phénomène de désorption et la manière suivant laquelle les espèces désorbées sont isolées en phase gazeuse. Cette compréhension permet d'un côté d'étudier la conservation de la phase native des biomolécules pour les études structurales par exemple et d'un autre côté elle permet d'adapter certains paramètres expérimentaux (puissance du laser de désorption, angle entre ce dernier et la goutte, taille de la zone d'extraction, positionnement des lentilles de Einzel, délai et durée d'extraction...). Ces paramètres ont un impact sur l'efficacité de collection, sur la valeur de la transmission, et sur l'énergie des ions désorbées que l'on peut détecter.

Le dispositif d'extraction retardée est un outil expérimental dont la mise en œuvre est simple pour le couplage avec un spectromètre de masse. J'ai présenté dans ce chapitre le fonctionnement de ce dispositif. J'ai montré par des simulations numériques à l'aide du logiciel SIMION l'importance de cette extraction pulsée pour la compréhension de la désorption. La molécule étudiée lors de ces simulations (la vancomycine) a également été étudiée expérimentalement, et j'ai simulé ici les temps d'arrivée sur le détecteur en modifiant plusieurs conditions initiales (distribution d'énergie ciné-

tique, distribution angulaire, durée et délai d'extraction) dans le but de reproduire les conditions expérimentales des espèces désorbées.

Les résultats des simulations montrent, que le nombre d'ions qui sont transmis au niveau du détecteur est faible pour tous les ions ayant de grandes composantes de vecteurs vitesses perpendiculaires à la direction du détecteur. C'est le résultat obtenu quelque soit la durée et le délai d'extraction utilisés et c'est pour cette raison qu'il est important d'utiliser un piège pour collecter efficacement les ions désorbés et obtenir une meilleure résolution. L'effet des délais d'extraction sur la transmission se ressent davantage pour les ions de petit angle ( $0^\circ$ -  $30^\circ$ ) par rapport à l'axe de temps de vol. Les distributions de temps de vol obtenues par les simulations d'une masse unique avec une durée d'extraction inférieure à  $5 \mu\text{s}$  sont très larges. Cette largeur impacte la résolution des spectres de masse qui sont moins bien résolus que lorsque l'on utilise une durée supérieure à  $5 \mu\text{s}$ . Néanmoins, l'utilisation d'une petite durée d'extraction ( $\sim 1 \mu\text{s}$ ) possède un avantage dans la compréhension de la distribution énergétique des ions désorbés. En effet, la comparaison entre la distribution de temps de vol expérimental et celle d'un spectre simulé via une distribution d'énergie large afin de couvrir une grande gamme de vitesses, devrait permettre de déterminer l'énergie des espèces désorbées lorsque ces temps de vol sont équivalents.



# Chapitre 4

## Études structurales de complexes organométalliques et de nano-agrégats métalliques fonctionnalisés

### 4.1 Introduction

Les études de nano-agrégats métalliques et de nanoparticules fonctionnalisées se sont intensifiées ces dernières années en raison notamment de leur intérêt radiochimique [85]. De petits systèmes constitués de complexes entre quelques atomes métalliques et quelques ligands peuvent servir de systèmes modèles pour caractériser les interactions entre nanoparticules métalliques et ligands organiques. De telles nanoparticules (figure 4.1) sont utilisées de plus en plus fréquemment en imagerie et comme radiosensibilisateurs pour optimiser les techniques de traitement anti-tumoral par radiothérapie.

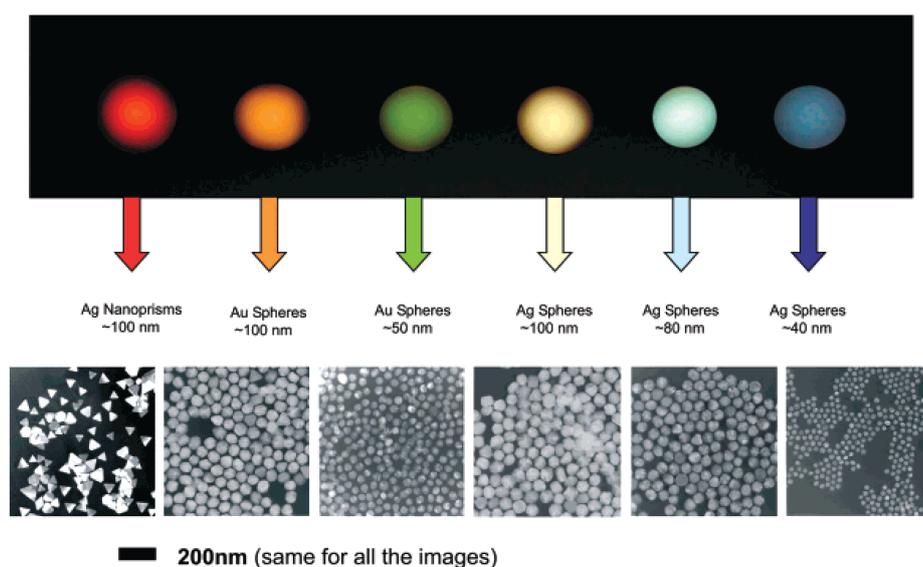


FIGURE 4.1 – Différents coloris de l'argent et de l'or colloïdal. La couleur des nanoparticules varie selon la taille et la concentration des particules en suspension (Image : Mirkin Group, Northwestern University).

Nous avons commencé par étudier des systèmes assez simples constitués d'un ou quelques atomes métalliques associés à un faible nombre de ligands. Notre choix s'est porté sur des complexes métal-Acétylacétonate (Acac) dont les conformations sont connues en phase condensée. Concernant le choix des métaux, il peut être très varié puisque ces espèces existent avec des métaux assez légers (Al, Fe, ...) mais aussi avec des métaux de transition comme le fer ou plus lourds tels que le ruthénium qui possède un intérêt amplificateur reconnu dans le contexte des thérapies par rayonnements ionisants.

Après une brève présentation de l'outil d'étude structurale utilisé, la spectroscopie infra-rouge par dissociation multiple photonique (IRMPD : Infra Red Multiple Photon Dissociation), puis des différents niveaux de calcul permettant la simulation des spectres, je présenterai les résultats obtenus pour de petits complexes organométalliques et pour des nano-agrégats d'or fonctionnalisés.

## 4.2 Spectroscopie IRMPD

### 4.2.1 Principe

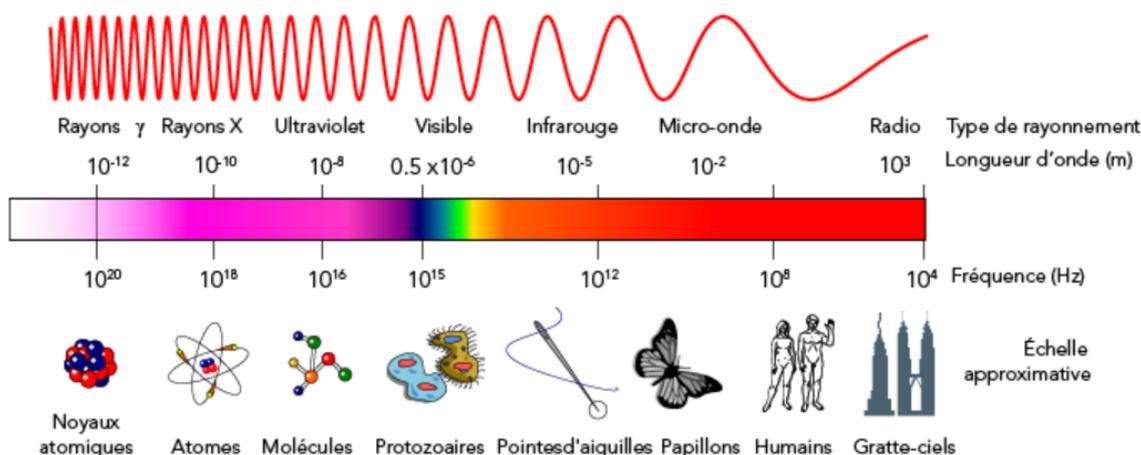


FIGURE 4.2 – *Domaine spectral électromagnétique : grandeurs caractéristiques du rayonnement en fonction de la fréquence (en Hz) et la longueur d'onde (en m). Le domaine IR moyen se situe entre  $400$  et  $4000 \text{ cm}^{-1}$  (Source : Wikipédia).*

La spectroscopie infrarouge par dissociation multiphotonique (IRMPD) en phase gazeuse, appliquée sur des systèmes tels que les complexes organo-métalliques, est un outil très puissant, qui permet de sonder l'environnement de différents groupements chimiques. Par comparaison entre des spectres expérimentaux et des spectres simulés via les méthodes de chimie quantique, nous pouvons caractériser les structures de ces complexes. Le groupe de J. Omens a par exemple enregistré et analysé le spectre IRMPD du cytochrome C qui possède plus d'une centaine d'acides aminés [86] et notre

groupe avait étudié la formation de quartets de guanine dans la séquence télomérique humaine [TTAGGG]<sub>4</sub> (24 oligonucléotides) [87].

La spectroscopie IR d'absorption linéaire est historiquement utilisée en physique moléculaire pour mesurer de manière précise les fréquences des modes de vibrations des molécules et donc déterminer par la suite la structure de la molécule sondée en comparant le résultat expérimental aux spectres simulés. Le spectre d'absorption est obtenu en variant la longueur d'onde du rayonnement incident et en mesurant pour chaque fréquence la variation de l'intensité transmise par rapport à l'intensité incidente après la traversée de l'échantillon. Ce type de spectroscopie n'est pas très efficace pour étudier des systèmes ioniques. La faible densité des ions dans une cellule (due à la répulsion électrostatique entre les charges) ne permet pas la détection de cette variation d'intensité et donc d'évaluer l'absorption.

Le processus d'absorption multiphotonique mis en jeu dans la spectroscopie IRMPD s'explique de la manière suivante : une molécule doit absorber plusieurs photons IR, afin que son énergie interne atteigne la limite de dissociation. Étant donné que l'énergie d'une liaison covalente est de l'ordre de quelques eV, soit un ordre de grandeur au-delà de l'énergie apportée par un photon infrarouge (quelques centaines de meV), une molécule doit absorber une dizaine de photons IR, pour que la limite de dissociation soit atteinte et que des fragments puissent être détectés. Cette absorption ne peut pas se faire de manière résonnante via des absorptions en résonance avec les niveaux successifs d'un même mode de vibration. En effet, le modèle de l'oscillateur anharmonique décrivant le diagramme des niveaux d'énergie vibrationnelle d'une molécule montre que l'écart entre les niveaux successifs décroît légèrement lorsque l'on augmente le nombre quantique  $\nu$  (figure 4.3). L'absorption du premier photon résonnant permet de faire passer la molécule de son état fondamental  $\nu = 0$  à son état excité  $\nu = 1$ . Si on attend un peu, cette énergie absorbée se redistribue vers les modes couplés de plus basses énergies par relaxation vibrationnelle intramoléculaire (IVR). Ce cycle d'absorption peut alors être répété, toujours en résonance avec la première transition vibrationnelle, jusqu'à la fragmentation de la molécule.

Le temps caractéristique du processus d'IVR dépend de la densité de modes à l'énergie d'excitation. Il correspond généralement pour un système de dizaine d'atomes, à une durée inférieure ou de l'ordre de la nanoseconde. Le taux de relaxation intramoléculaire est souvent de l'ordre de  $10^{12} \text{ s}^{-1}$  [88]. Les lasers à électrons libres (cf. 4.2.3) ont une structure temporelle particulièrement bien adaptée à cette séquence d'absorptions et de redistributions intramoléculaires de l'énergie absorbée.

La spectroscopie IRMPD est donc une spectroscopie d'action dans laquelle on isole l'ion parent que l'on souhaite étudier, on le fait interagir avec la lumière puis on mesure la baisse du signal de l'ion parent apparaissant à son rapport masse/charge (par spectrométrie de masse), accompagnée de l'apparition des fragments, pour chaque fréquence incidente. On détecte l'absorption par la mesure de ce taux de fragmentation  $K(E)$  pendant le temps d'interaction  $t$ . Ainsi, le signal de fragmentation s'écrit comme :

$$\frac{F}{F + P} = 1 - \exp[-K(E)t] \quad (4.1)$$

Où  $F$  est la somme des ions fragments et  $P$  le signal d'ions parents, pour une énergie  $E$  de photon donnée. On reporte, en fonction du nombre d'onde, la grandeur :

$$-\ln \left[ 1 - \frac{F}{F + P} \right] \quad (4.2)$$

qui est proportionnelle au taux de fragmentation.

Les intensités des raies et des bandes moléculaires obtenues par spectroscopie IRMPD ne suivent pas toujours celles prédites par les simulations des spectres d'absorption IR, en particulier car le processus d'IVR est indispensable pour la fragmentation de l'ion parent et que, si ce processus est peu efficace, ou trop lent pour un mode de vibration donné, l'absorption dans ce mode peut ne pas être observé. Il existe notamment des effets de seuil qui sont à l'origine de l'absence ou de la très faible intensité de certaines raies en IRMPD.

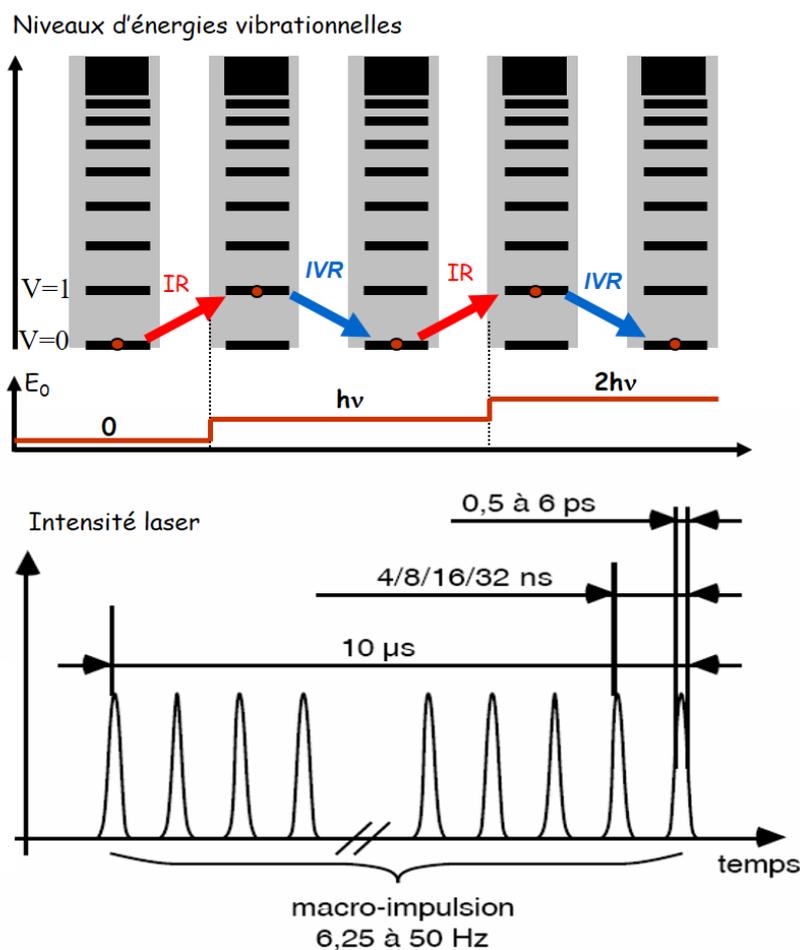


FIGURE 4.3 – En haut : représentation des niveaux d'énergie vibrationnelle. L'absorption d'un photon résonnant fait passer la molécule de son état fondamental  $\nu = 0$  à son état excité  $\nu = 1$ . L'énergie est redistribuée dans les modes couplés de plus basse énergie. La relaxation vibrationnelle intramoléculaires IVR a lieu entre deux micro-impulsions (séparées de 16 ns).

## 4.2.2 Dispositif expérimental de l'IRMPD par le laser à électrons libres

Les études structurales que je présente dans ce chapitre et dans le chapitre suivant ont été réalisées sur deux grands instruments scientifiques, au Centre Laser Infraouge d'Orsay (CLIO) et à la station d'accueil n°9 (Quadrupole ion trap MS for IR ion spectroscopy) du laser à électrons libres FELIX à Nijmegen aux Pays-Bas. Dans la section suivante, je décrirai le fonctionnement de ces lasers à électrons libres qui sont particulièrement bien adaptés à la spectroscopie IRMPD. Auparavant, je vais décrire les dispositifs expérimentaux qui permettent de produire et piéger les ions parents puis de les faire interagir avec les photons avant de détecter les éventuels fragments produits.

Dans les deux cas, les ions sont produits par une source électrospray telle que décrite en chapitre 1 voir 1.3.2).

À CLIO, le dispositif utilisé est une cellule ICR Bruker Apex (figure 4.4). Après être produits par ESI, les ions sont transférés dans la cellule ICR via un hexapôle et un quadrupole, qui permettent notamment de sélectionner l'ion parent que l'on souhaite étudier ou de réaliser de la CID (Collision Induced Dissociation) en amont. Les ions interagissent avec le laser IR dans la cellule ICR (vide de  $10^{-9}$  mbar) et un laser  $\text{CO}_2$  peut également être ajouté pour préchauffer les ions et faciliter la dissociation. Les expériences que nous avons réalisées à CLIO ont été menées en collaboration avec Debora Scuderi, de l'Institut de Chimie Physique [11, 12]. J'ai eu l'opportunité de participer à ces expériences au cours de ma thèse.

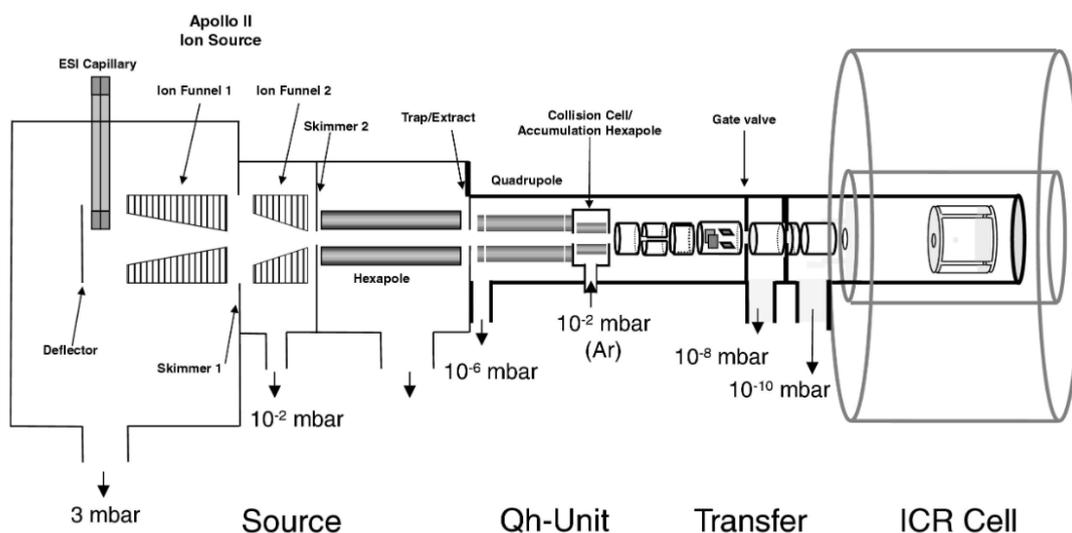


FIGURE 4.4 – Vue schématique de la source, du quadrupôle/hexapôle, des optiques de transfert et de la cellule ICR du Bruker Apex Qe 70 FTMS à CLIO [89].

À FELIX, le dispositif utilisé est un piège de Paul (Quadrupole Ion Trap - QIT). Il s'agit d'un piège à ions quadripolaire (figure 4.5) qui utilise des champs électriques

oscillants à courant continu statique et à radiofréquence pour piéger les ions. Ce type de piégeage est couramment utilisé en spectrométrie de masse. Il est également possible à FELIX de travailler sans hélium dans le piège, de façon à ne pas thermaliser les ions et à faciliter leur dissociation.

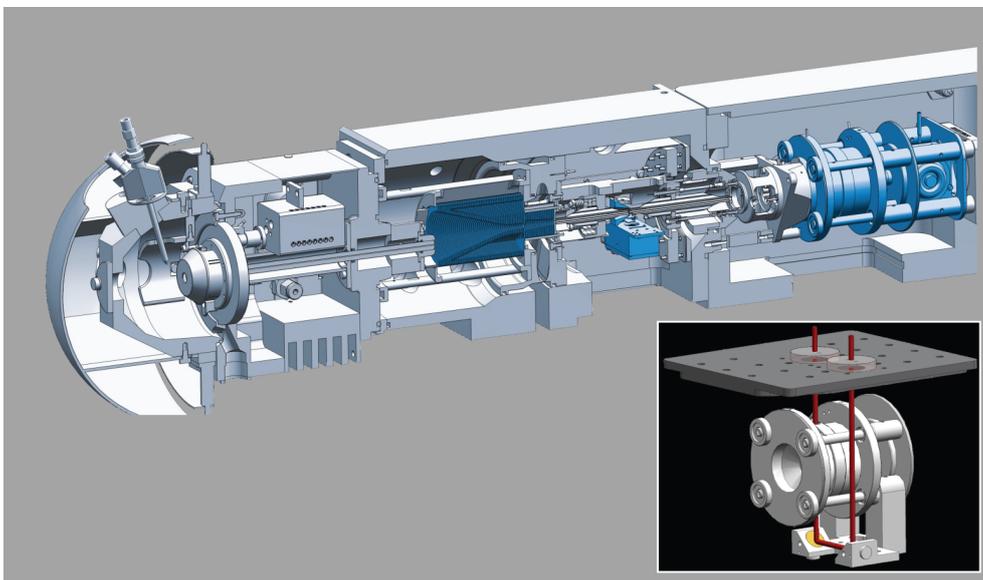


FIGURE 4.5 – Schéma représentatif du spectromètre de masse à piège ionique quadripolaire et de la source d'ionisation par électronébulisation utilisé à Felix sur la station n°9 [90].

Une fois les ions sélectionnés en masse et piégés, on les irradie avec la lumière IR émise par un laser à électrons libres (gamme  $400\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ , région des empreintes digitales) ou par un OPO (région des 3 microns). Les durées d'irradiation typiques sont de l'ordre de 0,5 s à quelques secondes sur l'ICR à CLIO et de l'ordre de quelques ms sur la QIT à FELIX.

### 4.2.3 Laser à électrons libres

Comme l'indique son nom, un laser à électrons libres (LEL) utilise un faisceau d'électrons «libres» de haute énergie issu d'un accélérateur pour créer et amplifier un faisceau lumineux. Ce principe a été proposé par John Madey (Université de Stanford) en 1976 et la première émission de longueur d'onde égale à  $3.4\text{ }\mu\text{m}$  a eu lieu l'année suivante. Dans les années 80, l'anneau de collisions d'Orsay (ACO) a permis d'obtenir la première émission LEL dans le visible. Ensuite, l'exploration d'une grande plage de longueur d'onde (l'infrarouge lointain et le térahertz, le VUV, le XUV et les rayons X) en vue de nombreuses applications dans l'imagerie, la spectroscopie et d'autres domaines s'est poursuivie jusqu'à nos jours. Ceci a conduit au développement de nombreux LEL. Cette large gamme spectrale est difficilement accessible par les lasers conventionnels (lasers à gaz, diodes lasers, ...) utilisant des atomes ou des molécules excités, dont les électrons sont fortement liés.

Le principe de base du LEL repose sur le mouvement ondulatoire des électrons libres sous l'action d'un champ magnétique périodique créé par une succession d'ai-

mants permanents : l'onduleur. Il s'agit d'une série d'aimants dont les pôles sont inversés, induisant la déviation périodique de la trajectoire du faisceau d'électrons (voir 4.6). Le même phénomène est utilisé pour le rayonnement synchrotron, qui est un rayonnement électromagnétique issu d'une particule chargée et accélérée dans un champ magnétique oscillant (le rayonnement est obtenu alors par les électrons tournant dans un anneau de stockage).

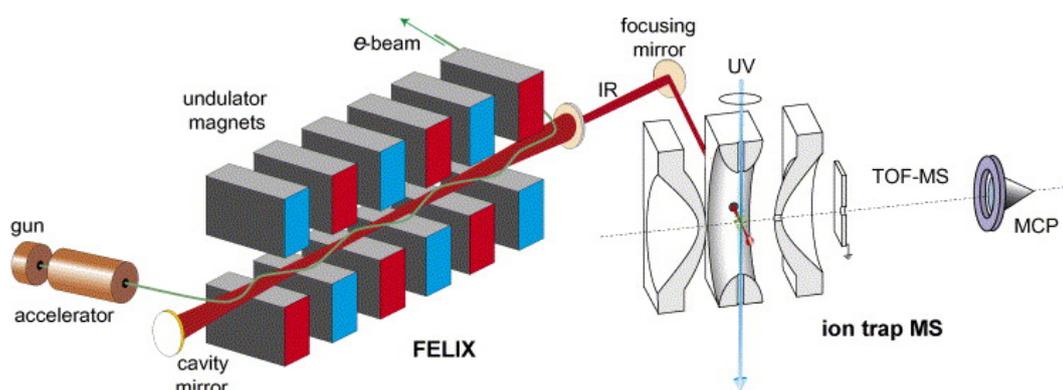


FIGURE 4.6 – Schéma de la cavité du laser à électrons libres à FELIX (le principe est le même pour CLIO). La lumière est focalisée à travers l'électrode annulaire du piège de Paul et provoque la fragmentation des ions sélectionnés [91].

Les onduleurs utilisés dans un LEL (VUV-XUV) peuvent avoir des tailles allant jusqu'à quelques centaines de mètres (FLASH en Allemagne, SPARC et FERMI en Italie, SCSS au Japon). D'autres LEL sont optimisés pour l'IR (CLIO en France et FELIX aux Pays Bas) avec des tailles plus modestes. Les onduleurs sont placés dans un résonateur. Ce dernier est constitué de deux miroirs à haute réflectivité. La lumière stockée dans la cavité peut rétroagir sur les électrons. Cette rétroaction se traduit par une modulation de la densité électronique du faisceau, qui conduit à un accroissement de la cohérence et de l'intensité de la lumière émise.

Selon la densité du courant et l'énergie du faisceau, on distingue trois régimes de fonctionnement du LEL : le régime Raman dans lequel l'interaction coulombienne entre les électrons est importante (i.e. faible énergie et grande densité de courant), le régime de faible-gain Compton et le régime collectif à gain élevé. Le fonctionnement en régime Raman correspond aux dispositifs produisant des micro-ondes, alors que la plupart des LEL rayonnent dans le domaine qui s'étend de l'UV à l'infrarouge, donc dans le régime de faible-gain Compton.

CLIO et FELIX couvrent un domaine spectral dans le proche et le moyen infrarouge ( $200 - 2000 \text{ cm}^{-1}$ ). La puissance moyenne du laser CLIO se situe entre 0,5 W et 1,2W. Les ions peuvent également être soumis à un laser  $\text{CO}_2$  ( $P = 10 \text{ W}$ ,  $\lambda = 10,6 \mu\text{m}$ ) synchronisé avec l'irradiation par le LEL-CLIO, dans le but de favoriser la fragmentation des systèmes fortement liés.

### 4.3 Méthodologie de recherche des structures moléculaires

Pour déterminer les structures secondaires les plus probables d'une molécule, la stratégie à suivre est de trouver le meilleur accord entre les modélisations théoriques et les données expérimentales. Les différentes expériences effectuées pendant cette thèse permettant des études structurales des systèmes moléculaires sont la spectroscopie IRMPD et la spectrométrie de mobilité ionique (voir sect. 5.1.1).

En chimie quantique, les différentes informations qu'on cherche à obtenir sur la molécule pour ces études structurales sont principalement :

1. Les différents minima de la surface d'énergie potentielle (PES) de l'état fondamental, avec leurs énergies et les structures associées.
2. Les modes de vibration (fréquence de vibration) de ces différents minima.

Pour les systèmes moléculaires de grande taille, une étude exhaustive de la surface d'énergie potentielle est illusoire. Néanmoins, il existe souvent un point de départ pour les recherches conformationnelles, qui se base sur les données tirées des différentes études en phase condensée. Par exemple en cristallographie ou en RMN, on trouve de nombreux résultats qui sont répertoriés sur le site de la Protein Data Bank, servant de structures modèles pour une exploration théorique conformationnelle. Toutefois, les preuves sur la conservation de la structure lors du passage en phase gazeuse sont très rares (voire nulles) notamment sur les peptides flexibles de tailles intermédiaires, qui sont trop grands pour être simulés avec des méthodes précises mais trop petits pour ne pas être affectés par la désolvatation.

Le travail théorique commence donc par explorer de la manière la plus exhaustive possible la surface d'énergie potentielle du système étudié afin de déterminer toutes les conformations de plus basse énergie possibles. Pour des molécules complexes, cette recherche ne peut pas se faire à un niveau de calcul très poussé. On utilise par exemple des méthodes de mécanique moléculaire (champs de force Amber). Ce type de recherche génère plusieurs milliers de structures différentes qu'il faut ensuite classer et regrouper en familles de structures. On peut appliquer un critère énergétique pour ne garder que les structures de plus basses énergies, même si les énergies calculées au niveau de théorie utilisé pour l'exploration conformationnelle ne sont pas très fiables, et ce critère doit être assez large, notamment pour des systèmes flexibles. Pour les résultats que je présente dans ce chapitre sur les organo-métalliques et les nano-agrégats, ainsi que les principes actifs combinés à des cyclodextrines (chapitre 5), aucun critère énergétique n'a été appliqué et seules les principales structures issues des données de la phase condensée ou déterminées par l'intuition ont été considérées.

Une fois les conformères de plus basses énergies identifiés et si des expériences de mobilité ionique ont été réalisées, l'étude des sections efficaces de diffusion de chacun permet, en comparaison avec les valeurs mesurées expérimentalement, de sélectionner ceux effectivement observés. Chacun d'entre eux peut alors être réoptimisé par des calculs réalisés à un niveau plus poussé (DFT). Cette optimisation permet d'obtenir

une meilleure description des interactions intramoléculaires et donc conduit à une structure calculée plus proche d'une structure réellement adoptée par le système.

Après la sélection d'une structure dont la section efficace calculée est la plus proche de la valeur expérimentale, on calcule le spectre vibrationnel (dans le cadre de l'approximation harmonique) qui est comparé au spectre IRMPD. Nous nous attendons à avoir une ou plusieurs conformations peuplées dans les conditions expérimentales, pour des ions étudiés à température ambiante, selon que le système est plus ou moins rigide.

### 4.3.1 Exploration de la surface d'énergie potentielle (PES)

Pour explorer la surface d'énergie potentielle (PES) de grands systèmes, le choix de l'équipe s'est porté sur la méthode de dynamique moléculaire classique. Cette méthode de simulation est l'une des méthodes en chimie numérique qui permet de modéliser des systèmes très grands contenant jusqu'à plusieurs millions d'atomes. Elle repose sur la résolution des équations de Newton traitées en mécanique classique sans prendre en compte explicitement les électrons. Au-delà, il existe des méthodes de dynamique moléculaire *ab initio*, dans lesquelles la configuration électronique est calculée à chaque pas du calcul. À partir de cette configuration électronique, on calcule les forces, puis on fait bouger les noyaux, et on ré-optimise la configuration électronique. Ces méthodes **à définir** (AIMD) sont extrêmement coûteuses et ne s'appliquent qu'à de petits systèmes.

La dynamique moléculaire (DM) permet de suivre l'évolution temporelle d'un système, et de calculer la position d'un atome  $i$  au moment  $(t + \delta t)$  en connaissant la position de l'atome au moment  $(t)$ . En fait, on cherche les forces qui s'exercent sur les atomes ou groupements d'atomes à une température donnée à l'instant  $t$ . Cette force est tirée d'un champ de forces classiques (voir 4.3.2), car elle dérive d'une énergie potentielle. Ainsi, la simulation consiste à choisir rigoureusement une expression analytique pour l'énergie potentielle pour retrouver la force exercée sur le système et déterminer par un processus itératif la nouvelle position à l'instant suivant. Le problème qu'on peut rencontrer lors de simulations de peptides de grandes tailles vient des constantes de temps de repliement/dépliement. Ces constantes sont souvent plus longues que les temps de simulation par champs de forces. Pour contourner ce problème, il existe des méthodes dites de «gros grains» permettant de modéliser un groupement d'atomes par une boule afin de traiter les systèmes de grandes tailles sur de longs temps de dynamique [92–94]. D'autres approches telles que les métadynamiques proposées par A. Laio et al. [95] ou les dynamiques à température fictive élevée [96] ont été développées pour accélérer l'exploration de la surface d'énergie potentielle de systèmes complexes.

Pour générer les structures des systèmes à base de cyclodextrine, l'équipe a utilisé, en collaboration avec F. Calvo (à l'ILM à l'époque), une méthode de dynamique moléculaire par échange de réplique (REMD) proposée par Y. Sugita et Y. Okamoto [97, 98]. La différence entre les simulations en REMD et une dynamique moléculaire classique, à 300 K, c'est qu'en dynamique moléculaire le système est su-

septible de rester piégé dans des minima locaux. Tandis qu’avec la méthode REMD, nous réalisons plusieurs calculs de dynamique moléculaire à différentes températures en parallèle. Chaque réplique évolue indépendamment par dynamique moléculaire, mais les structures peuvent s’échanger, ce qui permet de passer plus facilement les barrières d’énergie potentielle, et d’explorer de façon plus exhaustive la surface PES. La probabilité d’échange entre deux répliques est testée par le critère de distribution de Metropolis. Cette probabilité vaut 1 si, lorsque  $T_i > T_j$ , l’énergie de la conformation de la structure à plus haute température  $E_i$  est plus basse que celle à plus basse température  $E_j$ . Sinon, cette probabilité est égale à  $\exp\left(\frac{E_j - E_i}{k(T_i - T_j)}\right)$ . Dans cette méthode, les structures peuvent s’échanger, mais pas les températures, et les simulations continuent à partir des conformations échangées ou non.

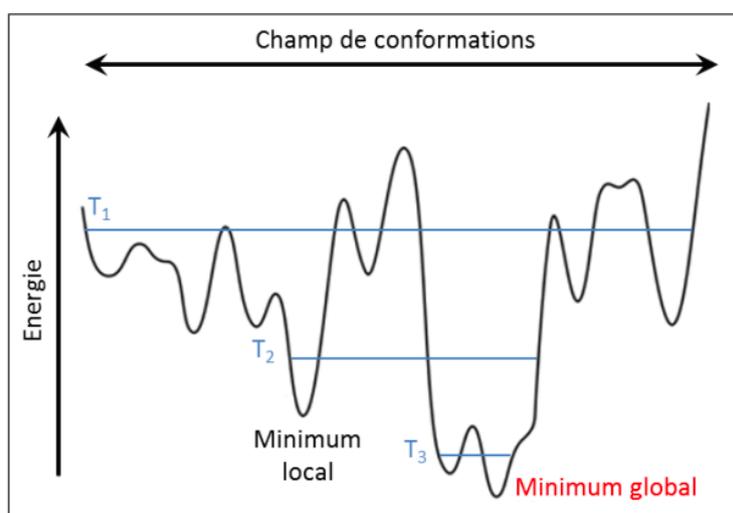


FIGURE 4.7 – Schéma des échanges de répliques (REMD). Exemple de trois simulations de dynamique moléculaire à 3 températures différentes.

La méthode de dynamique moléculaire par échange de réplique a été utilisée avec succès pour explorer le paysage conformationnel de monomères et d’oligomères de peptides impliqués dans les maladies neurodégénératives telles qu’Alzheimer [99–101], Parkinson [102] et le Prion [103]. Elle a également permis de simuler la dynamique de repliement de polypeptides isolés ou solvatés [104, 105] et des complexes des peptides Amyloïde  $\beta_{1-40}$  et Amyloïde  $\beta_{1-42}$  avec des atomes de zinc [106].

### 4.3.2 Champs de force

Dans le cadre de l’approximation de Born–Oppenheimer, la dynamique des électrons est beaucoup plus rapide que celles des noyaux. En effet, le mouvement moléculaire peut être découpé en deux mouvements séparés : celui des noyaux et le mouvement des électrons. Dans une modélisation en dynamique moléculaire, on s’intéresse au mouvement des noyaux, et la contribution des électrons est prise en compte de manière implicite grâce à un champ de potentiel qui s’ajuste instantanément au mouvement nucléaire.

Le modèle de champs de force est alors un modèle classique qui décrit les forces internes agissant sur le système moléculaire lors d'une déformation intramoléculaire ou d'un réarrangement des molécules entre elles. Ainsi, l'énergie potentielle du système pour une géométrie fixée des noyaux, varie selon des lois classiques. Cette énergie est la somme des contributions des interactions à courte portée (élongation d'une liaison covalente, angle entre 2 liaisons covalentes successives, angle dièdre entre 3 liaisons covalentes successives) et des interactions à longue portée (van der Waals...).

$$E = E_{liaison} + E_{angle} + E_{torsion} + E_{vdw} + E_{electrostatique} \quad (4.3)$$

Pour chaque terme de l'énergie potentielle de l'équation (4.3) défini par champs de force, l'expression mathématique en fonction des variables utilisées (distances internucléaires, angles, ...) dépend d'un nombre de paramètres (distance d'équilibre, angle d'équilibre...) qui sont caractéristiques d'un champ de force donné. Ces paramètres sont obtenus en prenant une banque de donnée qui permet d'avoir des valeurs moyennes, bien adaptées aux molécules tests choisies. Par exemple, si l'on étudie une molécule très différente de celles choisies pour la banque de données, alors il y a des chances pour que les paramètres soient mal adaptées à cette molécule.

Les champs de forces sont des outils essentiels pour les études de phénomènes complexes dans les simulations de molécules organiques et de macromolécules biologiques. En 1970 une première simulation de protéines a été effectuée pour un système de 458 atomes et pendant 9,2 ps [107]. Une simulation de plus d'un million d'atomes en dynamique moléculaire avec un champ de force à l'échelle atomique a été réalisée en 2006. Elle a permis d'étudier la structure du virus mosaïque du tabac [108]. Aujourd'hui, le domaine de champs de force a pris beaucoup d'ampleur, et de nombreux champs de force différents sont disponibles. On peut citer par exemple CHARMM [109], GRO-MOS [110], OPLS [111], MMFF [112]. La différence entre ces méthodes est liée au nombre de termes et à la nature de la contribution de l'énergie potentielle ainsi qu'aux paramètres utilisés dans chaque champ de force. Les simulations réalisées sur des peptides par l'équipe ont été réalisées avec un champ de force AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) [113–115] optimisé pour des molécules d'intérêt biologique. Ce n'est pas le cas pour ce que je vous présente par la suite.

### 4.3.3 Méthodes semi-empiriques : Asutin Model (AM1)

Plusieurs méthodes semi-empiriques ont été développées avec pour objectif de pouvoir simuler des systèmes de grande taille, inaccessible avec des calculs de chimie quantique plus poussés. Ces méthodes ont l'avantage d'être rapides, mais restent peu précises par rapport aux méthodes *ab initio*. Elles constituent donc un compromis entre une description purement quantique des électrons et interactions interatomiques et une description purement phénoménologique et empirique de ces interactions. Dans une méthode semi-empirique, la base utilisée contient des orbitales de type Släter (STO) pour les couches de valence, et seules les intégrales électroniques à deux centres de l'équation d'Hartree-Fock sont calculées. Parmi les méthodes semi-

empirique disponibles, nous avons utilisé la méthode AM1 (Austin Model 1). Cette méthode a été développée dans le groupe de M.J.S. Dewar [116]. D'autres méthodes semi-empiriques ont été introduites plus récemment comme PM3 [117] et PM6 [118].

#### 4.3.4 Théorie de la fonctionnelle de la densité : DFT

Dans la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT), le déplacement des noyaux au cours du processus d'optimisation est traité en prenant en compte explicitement les électrons du système étudié. Le calcul de l'énergie du système se fait en fonction de la densité électronique au lieu d'être basé sur la fonction d'onde électronique qui dépend de  $3N$  variables ( $N$  est le nombre total de particules du système). La densité est donc plus facile à traiter d'un point de vue mathématique puisqu'il s'agit d'une quantité à trois variables seulement. La théorie DFT a été proposée par Hohenberg et Kohn [119]. D'après les équations de Kohn-Sham, l'énergie électronique s'écrit comme la somme de l'énergie cinétique des électrons, d'un terme d'interaction électron-noyau, d'un terme d'interaction noyau-noyau et d'un terme d'interaction électron-électron. Ce dernier terme d'interaction électronique n'est pas défini explicitement dans la théorie de la fonctionnelle de la densité et dépend des paramètres introduits dans les fonctionnelles. Il existe donc de nombreuses fonctionnelles en DFT, qui peuvent être classées en trois grandes catégories : les fonctionnelles LDA (Local Density Approximation), GGA (Generalized Gradient Approximation) et les fonctionnelles hybrides.

L'une de fonctionnelles que l'on a choisie et qui est fréquemment utilisée pour les simulations de spectres IR pour les molécules organique est la fonctionnelle hybride Becke-3 Parameters-Lee-Yang-Parr (B3LYP) [120, 121]. Cette fonctionnelle présente certains biais connus, comme la mauvaise caractérisation des interactions de dispersion. Dans certains cas, ces interactions sont peu importantes (pour l'étude des systèmes ioniques par exemple, pour lesquels les contributions électrostatiques et de polarisation dominant). Lorsque ces interactions ne peuvent pas être négligées, nous pouvons les prendre en compte et rectifier ce biais de calcul en ajoutant un terme empirique de dispersion. À titre d'exemple, ceci a été réalisé lors des études de complexes avec la  $\beta$ -cyclodextrine, dans lesquelles, la version 3 de la dispersion de Grimme [122, 123] a été mise en oeuvre (cf. 5.1.3). Parmi d'autres fonctionnelles hybrides, nous avons également utilisé la fonctionnelle Minnesota 06 (M06) [124] dans les calculs sur les complexes organo-métalliques (voir partie 4.4). Cette fonctionnelle est couramment utilisée pour déterminer des énergies fiables en chimie des métaux de transition [125, 126]. Nous avons également mené des simulations de dynamique moléculaire AIMD avec la fonctionnelle Perdew-Burke-Ernzerhof (PBE) [127] car les calculs en B3LYP étaient trop lourds pour ce type de simulation.

Le temps de calculs pour traiter un système au niveau DFT, dépend directement du choix de la base d'orbitales atomiques. Ce temps varie en  $N^4$ , où  $N$  est le nombre de fonctions de base. Les bases de fonctions appelées bases minimales sont typiquement constituées du nombre minimum de fonctions pour représenter tous les électrons de chaque atome. Les plus grandes d'entre elles peuvent comprendre littéralement jus-

qu'à plusieurs centaines de fonctions de base pour chaque atome. Ainsi, si on souhaite traiter un système avec des bases très grandes, notamment en ajoutant des fonctions diffuses permettant d'obtenir une meilleure précision, ceci demandera un temps de calculs considérable et des capacités de haute performance. Enfin, le choix de la base est un compromis entre le temps de calcul et la précision souhaitée.

Les calculs que nous avons menés sur des complexes avec des macromolécules cages (voir chapitre 5) ont été effectués avec une base 6-31+G(d,p). Il s'agit d'une base à valence séparée (split-valence) où seules les orbitales de valence sont doublées ou triplées, etc. Le chiffre 6 avant le trait d'union correspond au nombre de gaussiennes primitives décrivant les orbitales de cœur des atomes. Le chiffre 31 avant la lettre G indiquent que les orbitales de valence<sup>1</sup> sont composées chacune de deux fonctions, la première est composée d'une combinaison linéaire de 3 fonctions gaussiennes primitives, l'autre d'une combinaison linéaire d'une gaussienne individuelle.

Pour les systèmes de complexes organo-métalliques ou de nano d'agrégats d'or, notre choix s'est porté sur les bases Def2TZVP [128] ou LanL2DZ [129], qui inclut un potentiel effectif de cœur pour les métaux de transition lourds, ou également une base 6-31+G(d,p) pour les autres atomes. Nous avons réalisé des calculs en DFT statique à l'aide du logiciel Gaussian (versions 03 à 16) [130], sur un cluster "maison" puis sur la plateforme de calcul scientifique à haute performance (dizaine de CPU et une centaine de gigas de mémoire) de l'université Sorbonne Paris Nord (MAGI). Les simulations de dynamique moléculaire Born-Oppenheimer menées sur des complexes organo-métalliques (voir sect. 4.4.4) ont été réalisées par F. Cappelluti et L. Guidoni (University of L'Aquila) avec le logiciel CP2K [131] sur les plate-formes HPC Galileo et Marconi.

---

1. La présence de n nombre après le trait d'union indique que la base est une base n-zéta à valence séparée (chaque orbitale est décrite par n fonctions).

## 4.4 Études structurales de complexes organo-métalliques

### 4.4.1 Motivations et choix des systèmes

De nombreux travaux dans le domaine biomédical sont consacrés à l'étude des nanoparticules métalliques fonctionnalisées notamment du fait de leurs propriétés optiques couplées à leurs possibilités de ciblage et de vectorisation de molécules bio-actives au sein des cellules vivantes. La maîtrise des effets biologiques de complexes organo-métalliques, demande une connaissance fine des propriétés structurales et des stabilités chimiques de leurs ligands fonctionnels. La caractérisation de l'interface nanoparticule-ligand, en solution, se fait le plus souvent par RMN ou par les méthodes IR. Cependant, l'interprétation des données est rendue complexe du fait du relatif manque de contrôle de la stœchiométrie des nanoparticules et des ligands qui les recouvrent [132].

En utilisant une approche bottom-up, nous avons réalisé l'étude en phase gazeuse de complexes organo-métalliques (1 ou 2 atomes métalliques, 2 à 5 ligands simples). L'avantage de ce choix de petits systèmes est lié à la possibilité d'une sélection en taille par spectrométrie de masse permettant une caractérisation fine en phase gazeuse, notamment par comparaison entre spectres IR et calculs de chimie quantique. Le ligand que nous avons choisi est l'acétylacétonate, qui est un ligand bidentate relativement rigide.

Les complexes entre des ions métalliques et quelques ligands de type acétylacétonate sont bien caractérisés en phase cristalline [14, 133] et peuvent servir de pré-curseurs pour la synthèse de plusieurs complexes organométalliques et nanoparticules [134]. À notre connaissance, les nombreuses études menées précédemment sur des complexes organométalliques en phase gazeuse [135–139] ont été consacrées à des ligands neutres [140–143] ou biomoléculaires simples [144–148]. À part une étude récente sur des complexes avec l'holmium [149], il n'y a cependant pas eu d'études de spectroscopie infrarouge de complexes isolés entre des ions métalliques et des anions acétylacétonate, en particulier lorsque plusieurs ions métalliques sont impliqués.

Nous avons effectué des expériences de spectroscopie IRMPD directement sur des complexes entre l'acétylacétonate (figure 4.8) qui est un des ligands anioniques bidentates les plus simple et trois métaux différents : Al (métal léger), Fe (métal de transition) et Ru (métal lourd). À l'issue de ces travaux effectués sur ces petits complexes, nous souhaitons donc avoir des repères méthodologiques fiables pour l'étude d'autres systèmes modèles, notamment de taille plus grande et pouvant servir à caractériser les propriétés physico-chimiques de nanoparticules ayant un réel intérêt biochimique. En raison de la rigidité relative du ligand acétylacétonate et de ses fortes interactions bidentates avec tous les ions métalliques, les structures de plus basse énergie des ces complexes étudiés sont moins compliquées à déterminer et parfois presque uniques. Ainsi, ces données peuvent constituer un test de la validité de différentes approches pour la simulation des spectres infrarouges pour ce type de complexes métal-ligand.

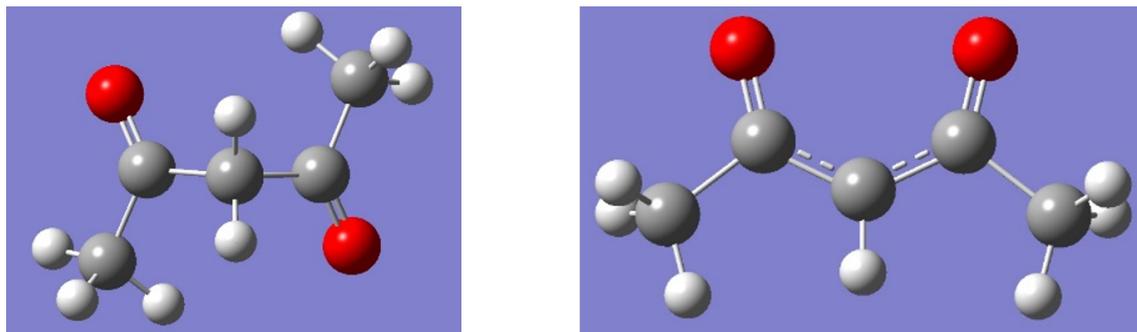


FIGURE 4.8 – À gauche : structure de l'acétylacétone (Acac neutre) de formule chimique  $C_5H_8O_2$  et de masse  $m = 100$  u. À droite : structure de l'acétylacétonate ( $Acac^-$ ) de formule  $C_5H_7O_2^-$  de masse = 99 u

Nous avons donc comparé les spectres expérimentaux obtenus par spectroscopie IRMPD à plusieurs types de calculs effectués par DFT. Ces calculs sont réalisés en statique avec une analyse fréquentielle dans l'approximation harmonique ou anharmonique (avec la fonctionnelle B3LYP et la modeste base 6-31G\* ou avec la fonctionnelle M06 [124] qui est censée donnée de meilleures énergies pour la chimie des métaux de transition [125, 126], au niveau M06/6-31+G\*\*). Des calculs de dynamique moléculaire Born Oppenheimer avec la fonctionnelle PBE [127, 150] ont également été réalisés en collaboration avec L. Guidoni de l'université de L'Aquila.

#### 4.4.2 Spectres IRMPD de $[M^{3+}(Acac^-)_2(AcacH)]^{+1}$ , M = Al, Fe ou Ru.

Les espèces étudiées contiennent trois ligands autour d'un ion métallique de charge (+3) et possèdent des spectres IR similaires issus d'une structure octaédrique, comme les espèces neutres observé en phase condensée, dans lesquelles les trois ligands bidentés se lient à l'ion métallique via six liaisons ioniques. La fragmentation par CID (collision Induced Dissociation) ou en IRMPD se produit principalement par la perte de la molécule d'Acac neutre (AcacH).

Le décalage vers le rouge des spectres des trois cations métalliques (Fig. 4.9), lorsque l'on va du plus léger (Al) au plus lourd (Ru), est globalement dû à l'augmentation de l'interaction métal-ligand et est discutée plus en détail dans la suite.

Les spectres expérimentaux obtenus par spectroscopie IRMPD, ainsi que ceux calculés par DFT à partir de différentes fonctionnelles (PBE, B3LYP, M06) pour l'ion  $[Fe^{3+}(Acac^-)_2(AcacH)]^{+1}$  sont représentés en figure (4.10). Les calculs reproduisent assez bien la position des deux bandes principales (positions repérées par les bandes grises). Ces bandes correspondent aux modes d'élongation symétrique C=O et antisymétrique C-C=O de l'acétylacétone (AcacH) ou des ions acétylacétonates ( $Acac^-$ ).

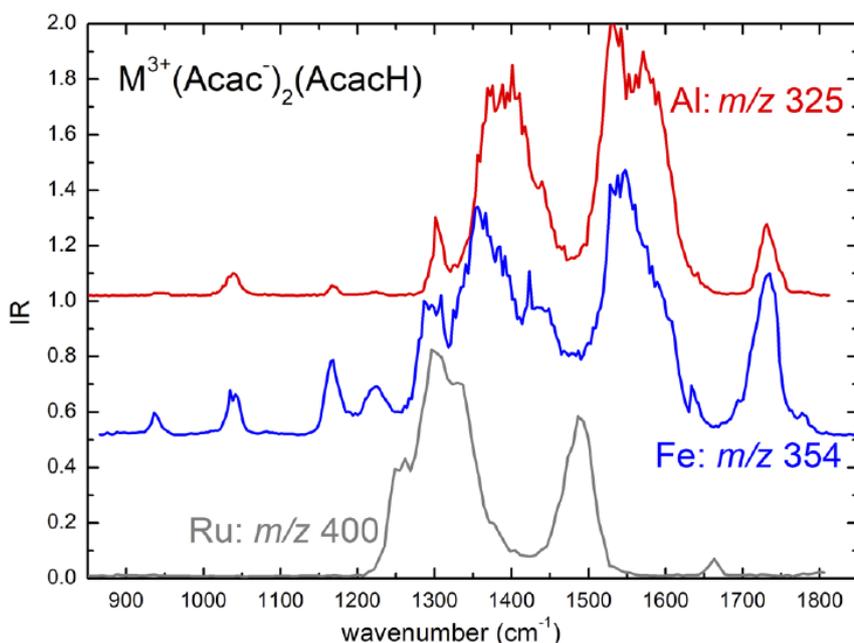


FIGURE 4.9 – Spectres IRMPD des trois complexes  $[M^{3+}(\text{Acac}^-)_2(\text{AcacH})]^{+1}$  obtenus sans préchauffage avec laser  $\text{CO}_2$ . Le temps d’irradiation par LEL était de 0,25 s pour Al, 0,5 s pour Fe et 2 s pour Ru. Les intensités sont proportionnelles au taux de photofragmentation. Elles sont mises à l’échelle afin d’être comparables pour la bande vibrationnelle principale.

Les calculs en PBE sur l’ion  $[\text{Fe}^{3+}(\text{Acac}^-)_2(\text{AcacH})]^{+1}$ , conduisent, pour la bande situé entre  $1500\text{ cm}^{-1}$  et  $1600\text{ cm}^{-1}$  à un décalage vers le rouge trop important (abaissement du nombre d’onde). Ceci indique que cette fonctionnelle a tendance à surestimer l’interaction entre l’oxygène négativement chargé de l’acétylacétonate et l’ion métallique (le coordinateur), conduisant à une énergie de vibration d’élongation de la liaison  $\text{C}=\text{O}$  plus faible que celle mesurée expérimentalement et même simulée par les autres méthodes.

On observe également des bandes à plus basses fréquences ( $1293\text{ cm}^{-1}$ ,  $1167\text{ cm}^{-1}$ ,  $1036\text{ cm}^{-1}$ ,  $930\text{ cm}^{-1}$ ,  $792\text{ cm}^{-1}$  et  $677\text{ cm}^{-1}$ ) qui sont bien reproduites par les simulations. Les modes de vibrations de cette région correspondent pour la plupart à des modes qui peuvent être attribués à l’acétylacétone ou aux acétylacétonates et qui sont souvent décalées vers le rouge dans le complexe (par rapport au ligand seul).

La bande expérimentale de plus grande fréquence à  $1733\text{ cm}^{-1}$  (trait rouge en pointillé sur la figure 4.10), qui correspond au mode d’élongation symétrique de deux  $\text{C}=\text{O}$  de l’acétylacétone, n’est bien reproduite par aucune des méthodes utilisées. Cette bande est calculée à trop basse fréquence en PBE et se décale trop vers le bleu (vers les nombres d’ondes plus élevés) pour les autres méthodes (B3LYP et M06). Ceci montre encore une fois la tendance de la fonctionnelle PBE à surestimer les interactions entre l’ion métallique et les atomes d’oxygène neutres de l’AcacH. Au contraire, les fonctionnelles B3LYP et M06 tendent à sous estimer cette interaction métal-ligand, ce qui fait que la fréquence de vibration des modes  $\text{C}=\text{O}$  calculées par

ces deux fonctionnelles est plus grande en énergie que celle mesurée en IRMPD.

Pour comparer les fréquences expérimentales et les fréquences calculées pour les 9 bandes présentes sur le spectre (4.10) du complexe  $[\text{Fe}^{3+}(\text{Acac}^-)_2(\text{AcacH})]^+$ , nous avons évalué les écarts quadratiques moyens correspondants. Les valeurs trouvées (voir tableau 4.11) montrent clairement que les fréquences calculées dans l'approximation harmonique avec facteur d'échelle sont meilleures en B3LYP puisque ces calculs donnent l'écart quadratique moyen le plus faible ( $\text{RMSD} = 11.1 \text{ cm}^{-1}$ ) par rapport aux autres méthodes donnant un RMSD d'environ  $22 \text{ cm}^{-1}$  pour la fonctionnelle M06 et autour de  $30 \text{ cm}^{-1}$  en PBE. De plus, ces mêmes calculs de RMSD nous montrent que les fréquences anharmoniques, sont moins bonnes que celles dans l'approximation harmonique avec facteur d'échelle ( $13.2 \text{ cm}^{-1}$  en B3LYP). Cette différence est encore plus importante pour le complexe avec l'aluminium (voir tableau 4.12), où les écarts quadratiques moyens valent respectivement  $15.3 \text{ cm}^{-1}$  et  $28.8 \text{ cm}^{-1}$  dans l'approximation harmonique et en anharmonique pour la fonctionnelle B3LYP.

D'autre part, les fréquences calculées en dynamique moléculaire pour le complexe avec le fer ne sont pas meilleures ( $\text{RMSD} = 34.7 \text{ cm}^{-1}$ ) que celles trouvées en statique. Le décalage systématique vers le rouge (d'environ  $25$  à  $30 \text{ cm}^{-1}$ ) observé dans les calculs en dynamique, compte pour beaucoup dans ces mauvaises valeurs. Après correction empirique de cette erreur systématique, cet écart quadratique devient comparable à celui des méthodes statiques. Ainsi, la valeur de l'écart devient  $15.6 \text{ cm}^{-1}$  dans le cas du complexe avec l'ion de fer. Elle est encore plus petite dans le cas du complexe avec l'aluminium avec  $8.6 \text{ cm}^{-1}$  au lieu de  $24.2 \text{ cm}^{-1}$ . L'origine de la nécessité de cette correction est peut être la conséquence du relâchement excessif des liaisons (et de la réduction des fréquences vibrationnelles) produit par les fonctionnelles GGA (Generalized Gradient Approximation) [151].

La structure moléculaire de l'ion  $[\text{Ru}^{3+}(\text{Acac}^-)_2(\text{AcacH})]^+$  obtenue par des calculs est représentée à droite de la figure (4.13). On observe une géométrie octaédrique qui est également valable pour les complexes avec Fe ou Al à la place du Ruthénium (Ru). Dans cette géométrie l'ion métallique se trouve au centre du complexe et interagit avec six oxygènes en formant un octaèdre pseudo-régulier (les angles de liaison sont de  $90 \text{ deg}$ ) mais les distances M-ligand sont différentes pour le ligand neutre et les deux ligands chargés). Les trois complexes diffèrent cependant par leurs distances Métal–Oxygène (M-O), et aussi par leurs énergies de dissociations représentées dans le tableau (4.14). Les données calculées montrent que les distances reliant l'ion métallique à un atome d'oxygène du ligand bidentate ainsi que l'énergie de dissociation de l'acétylacétone du complexe dépendent de deux facteurs : la taille de l'ion métallique et l'état électronique de spin du métal complexé. Par exemple, si on considère le complexe avec l'ion ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) qui possède 5 électrons célibataires dans les orbitales d, la configuration de plus basse énergie (état fondamental) de cet ion complexé est de haut spin (i.e. lorsque les 5 électrons sont non appariés). Dans ce cas, les interactions M–O sont un peu plus faibles et l'énergie de dissociation est très

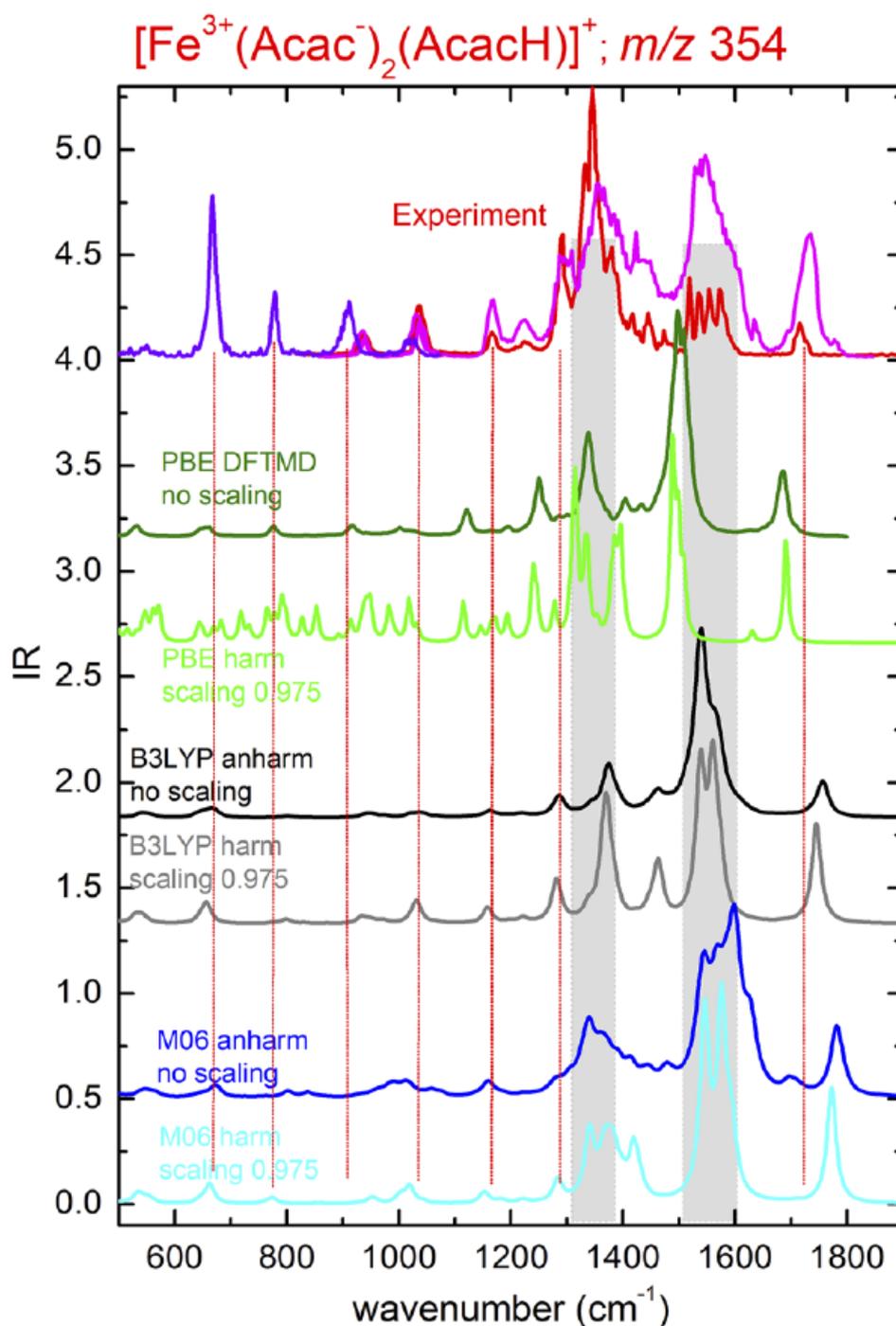


FIGURE 4.10 – Spectres IRMPD expérimentaux obtenus avec (rouge) et sans laser  $\text{CO}_2$  (magenta et bleu clair) pour l'ion  $[\text{Fe}^{3+}(\text{Acac}^-)_2(\text{AcacH})]^{+1}$ , les autres spectres calculés correspondent aux différentes méthodes de calcul utilisées : l'approximation harmonique avec facteur d'échelle (couleurs pâles) ou anharmonique sans facteur d'échelle (couleurs foncées) aux niveaux M06/6-31+G\*\* (en bleu) et B3LYP/6-31G\* (en noir). Les spectres calculés au niveau PBE/TZVP dans l'approximation harmonique avec facteur d'échelle (vert clair) et en dynamique (vert foncé) sont également présentés.

Mode#	1	2	3	4	5	6	Band7	Band8	9	RMSD
experimental	677	792	930	1036	1167	1293	1353	1557	1733	
M06 harm.	662	773	953	1018	1152	1285	1380	1565	1772	21.2
M06 anharm.	673	819*	1001*	1058	1160	1278	1355	1581	1781	33.6
B3LYP harm.	656	798	934	1031	1158	1281	1370	1553	1745	11.1
B3LYP anharm.	667	801	947	1039	1163	1288	1374	1547	1757	13.2
PBE harm.	680*	779*	948	1018	1115	1240	1324	1493	1691	36.7
PBE DFT-MD	660	776	916	1010*	1121	1250	1338	1502	1686	34.7
<i>shift of +31 cm<sup>-1</sup></i>	<i>691</i>	<i>807</i>	<i>947</i>	<i>1041</i>	<i>1152</i>	<i>1281</i>	<i>1369</i>	<i>1533</i>	<i>1717</i>	<i>15.6</i>

FIGURE 4.11 – Comparaison des fréquences (en  $\text{cm}^{-1}$ ) des 9 modes qui apparaissent dans le spectre de l'ion  $[\text{Fe}^{3+}(\text{Acac}^-)_2(\text{AcacH})]^{+1}$  avec celles obtenues par les différents niveaux de calcul, avec les valeurs correspondantes de l'écart quadratique moyen par rapport aux données expérimentales. Les étoiles indiquent la présence des pics multiples de valeurs proches (la valeur prise correspond à la moyenne de l'ensemble). Les valeurs en italique pour les calculs en PBE DFT-MD correspondent à celles obtenues lorsque le décalage vers le rouge observé systématiquement dans les calculs est compensé empiriquement.

Mode#	1	2	3	4	5	6	Band7	Band8	9	RMSD
experimental	717	804	946	1035	1163	1302	1390	1555	1732	
M06 harm.	700	775	958	1026	1160	1296	1400	1585	1779	22.6
M06 anharm.	721	822	1002	1044	1165	1303	1385	1590	1806*	33.8
B3LYP harm.	697	803	952	1036	1168	1299	1423	1572	1748	15.3
B3LYP anharm.	705	783	947	1042*	1203	1299	1419	1581	1793	28.8
PBE harm.	723*	812*	964*	1036*	1160*	1264	1385	1527	1689	22.1
PBE DFT-MD	685	783	926	1016	1142	1274	1380	1533	1690	24.2
<i>shift of +24 cm<sup>-1</sup></i>	<i>709</i>	<i>807</i>	<i>950</i>	<i>1040</i>	<i>1166</i>	<i>1298</i>	<i>1404</i>	<i>1557</i>	<i>1714</i>	<i>8.6</i>

FIGURE 4.12 – Comparaison des fréquences (en  $\text{cm}^{-1}$ ) des 9 modes qui apparaissent dans le spectre de l'ion  $[\text{Al}^{3+}(\text{Acac}^-)_2(\text{AcacH})]^{+1}$  avec celles obtenues par les différents niveaux de calcul, avec les valeurs correspondantes de l'écart quadratique moyen par rapport aux données expérimentales. Les étoiles indiquent la présence des pics multiples de valeur proche (la valeur prise correspond à la moyenne de l'ensemble). Les valeurs en italique pour les calculs en PBE DFT-MD correspondent à celles obtenues lorsque le décalage vers le rouge observé systématiquement dans les calculs est compensé empiriquement.

légèrement supérieure (1,63 eV) à celle calculée pour le complexe avec l'aluminium III ( $\text{Al}^{3+}$  qui vaut 1,50 eV) pour un système sans électrons dans la couche d. Par ailleurs, l'état bas spin de Fer III est obtenu à partir de la configuration avec 4 électrons d appariés et un électron non apparié. Cet état plus haut en énergie, présente des interactions M-O plus fortes (distance M-O plus faible) et possède une plus grande énergie de dissociation (2.45 eV). Cette énergie de dissociation est comparable à celle du ruthénium complexé (2.38 eV), dont l'état fondamental est lui aussi un bas spin. En conséquence, le grand décalage vers le rouge observé dans le

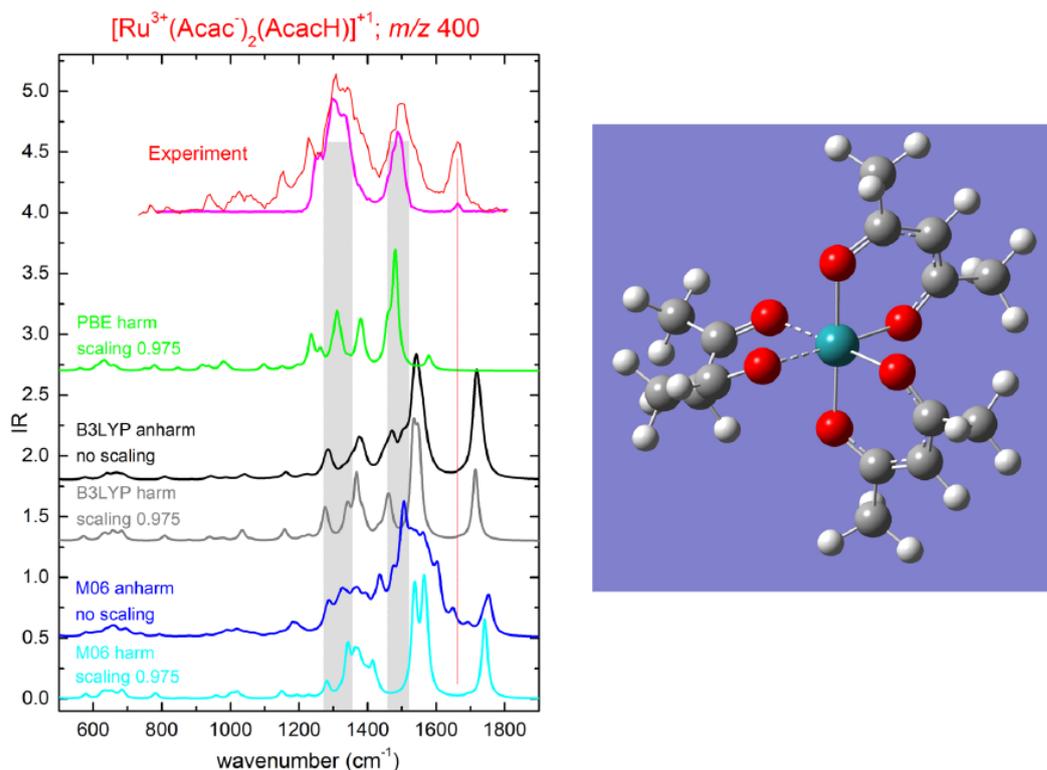


FIGURE 4.13 – À droite : structure moléculaire octaédrique calculée au niveau M06/6-31+G\*\* avec la base LanL2DZ pour l'ion  $[\text{Ru}^{3+}(\text{Acac}^-)_2(\text{AcacH})]^+$ . À gauche : Spectres IRMPD expérimentaux (rouge et magenta obtenus respectivement avec et sans laser  $\text{CO}_2$ ). Les autres spectres présentés correspondent aux différentes méthodes de calcul : l'approximation harmonique avec facteur d'échelle (couleurs pâles) ou anharmonique sans facteur d'échelle (couleurs foncées) aux niveaux M06/6-31+G\*\* (en bleu) et B3LYP/6-31G\*. Le spectre calculé au niveau PBE/TZVP dans l'approximation harmonique avec facteur d'échelle (vert clair) est également présenté.

spectre IR du ruthénium (figure 4.9) et qui concerne plusieurs bandes dans la gamme  $1200\text{ cm}^{-1}$ – $1800\text{ cm}^{-1}$  impliquant les centres donneurs d'électrons des ligands, peut être considéré comme une signature de la forte interaction M-O correspondant à un état de bas spin du complexe.

Les spectres IR représentés à gauche de la figure (4.13) concerne le complexe  $[\text{Ru}^{3+}(\text{Acac}^-)_2(\text{AcacH})]^+$ . Les deux premiers spectres en haut (rouge et magenta) sont des spectres expérimentaux obtenus par la spectroscopie IRMPD, respectivement avec et sans le laser  $\text{CO}_2$ . On voit bien que le préchauffage avec le laser  $\text{CO}_2$  permet de mieux montrer les raies de faible intensité, notamment celle à plus haute fréquence, mais conduit aussi à un élargissement de toutes les raies, y compris les deux bandes principales qui apparaissent ici vers  $1320\text{ cm}^{-1}$  et  $1490\text{ cm}^{-1}$ . Les spectres calculés par DFT à partir des fonctionnelles B3LYP et M06 reproduisent assez bien la position des deux bandes principales, avec un décalage vers le bleu (d'environ  $50\text{ cm}^{-1}$  -  $70\text{ cm}^{-1}$ ) en comparaison avec l'expérience. Ces mêmes bandes se trouvent décalées vers le rouge d'environ  $20\text{ cm}^{-1}$  pour les complexes avec Al ou Fe. Par ailleurs, dans ce cas,

M(III) ion	Spin	Distance(M-O <sup>-</sup> <sub>Acac</sub> ) Å	Distance(M-O <sub>AcacH</sub> ) Å	D <sub>e</sub> (AcacH) eV
Al	0	1.85–1.87	2.03–2.04	1.50
Fe	5/2	1.93–1.99	2.17–2.20	1.63
	<i>1/2</i>	<i>1.85–1.89</i>	<i>1.98–2.00</i>	<i>2.45</i>
Ru	1/2	1.97–2.04	2.14–2.16	2.38

FIGURE 4.14 – *Etat de spin de plus basse énergie, gamme des distances entre l'ion métallique et les atomes d'oxygène des ligands acétylacétonate ou acétylacétone, et énergie de dissociation de ce ligand neutre pour les trois espèces  $[M^{3+}(\text{Acac}^-)_2(\text{AcacH})]^{+1}$  calculées au niveau M06/6-31+G\*\*. La seconde ligne (en italique) pour le fer correspond à l'état de spin 1/2, qui a une énergie électronique plus élevée, la même structure d'équilibre octaédrique, des interactions M-O beaucoup plus fortes et une énergie de dissociation de l'acétylacétone beaucoup plus élevée.*

la fonctionnelle PBE semble la plus performante (avec un décalage dans le rouge d'environ 50 cm<sup>-1</sup>).

La bande qui se situe à 1665 cm<sup>-1</sup> correspond au mode d'élongation symétrique C=O de l'acétylacétone (Acac neutre). La fréquence de cette bande est toujours surestimée dans les calculs avec les fonctionnelles B3LYP et M06 (décalage d'environ 50 cm<sup>-1</sup>), et décalée vers le rouge d'environ 80 cm<sup>-1</sup> en utilisant la fonctionnelle PBE.

#### 4.4.3 Spectres IRMPD de $[M^{3+}(\text{Acac}^-)_2]^{+1}$ , M = Al, Fe

Nous avons aussi étudié le complexe  $[M^{3+}(\text{Acac}^-)_2]^{+1}$  formé par seulement deux ions acétylacétonates (Acac<sup>-</sup>) et chacun des ions métalliques d'aluminium et de fer. On peut s'attendre à ce que ces espèces adoptent une structure tétraédrique (figure 4.16), et soient fortement liées. Leur fragmentation est en effet difficile, et nous n'avons jamais observé l'ion doublement chargé de type  $[M^{3+}(\text{Acac}^-)_1]^{+2}$ . De plus, même les fragments obtenus par dissociation induite par collisions (CID) sont principalement des ions issus de différentes pertes neutres des ligands, alors qu'une excitation par IRMPD donne des ions simplement chargé (perte d'un seul radical neutre acétylacétonate) lequel n'étant pas obtenu par CID.

Les spectres de la figure (4.17) représentent les résultats de la spectroscopie IRMPD pour les complexes  $[\text{Al}^{3+}(\text{Acac}^-)_2]^{+1}$  et  $[\text{Fe}^{3+}(\text{Acac}^-)_2]^{+1}$ , ainsi que les spectres obtenus par les différentes méthodes de calculs. Les données expérimentales ont été enregistrées à plusieurs reprises pour couvrir une gamme de fréquence allant de 700 cm<sup>-1</sup> à 1800 cm<sup>-1</sup>. Certains spectres ont été réalisés en l'absence de laser CO<sub>2</sub> (spectre rouge) et d'autres avec préchauffage avec le laser CO<sub>2</sub> (spectres en magenta et violet) pour bien favoriser les diverses intensités des bandes principales comme dans le cas ci-dessus. Les intensités relatives sont ensuite normalisées à leur maximum pour pouvoir les comparer. Du fait de la symétrie du système étudié, liée à la présence de deux ligands identiques, les spectres sont plus simples que les spectres précédents.

Les deux bandes principales sont centrées autour de 1345 cm<sup>-1</sup> - 1520 cm<sup>-1</sup> pour le

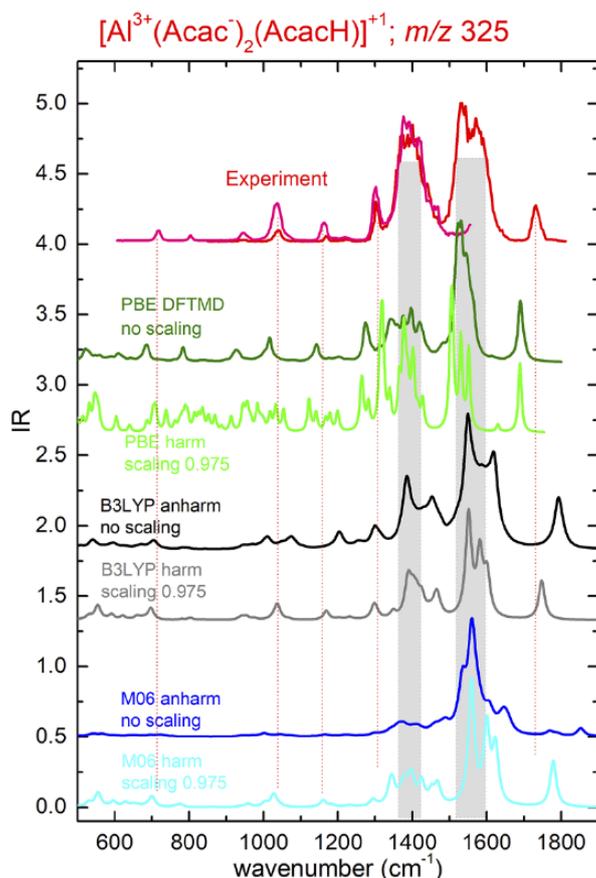


FIGURE 4.15 – Spectres IRMPD expérimentaux (rouge et magenta obtenus respectivement avec et sans laser  $\text{CO}_2$ ). Les autres spectres présentés correspondent aux différentes méthodes de calcul : l’approximation harmonique avec facteur d’échelle (couleurs pâles) ou anharmonique sans facteur d’échelle (couleurs foncées) aux niveaux M06/6-31+G\*\* (en bleu) et B3LYP/6-31G\*. Le spectre calculé au niveau PBE/TZVP dans l’approximation harmonique avec facteur d’échelle (vert clair) est également présenté.

complexe avec l’Al autour de  $1300\text{ cm}^{-1}$  -  $1490\text{ cm}^{-1}$  pour celui avec le Fe. Ces bandes sont décalées vers le rouge d’environ  $30\text{ cm}^{-1}$  à  $50\text{ cm}^{-1}$  par rapport aux bandes des complexes  $[\text{M}^{3+}(\text{Acac}^-)_2(\text{AcacH})]^+$ , ce qui indique que l’interaction métal-ligand est plus forte dans le cas présent des complexes avec seulement deux ligands bidentates.

Par ailleurs, quelle que soit la méthode de calcul employée, la plupart des spectres théoriques reproduisent assez bien les positions de deux bandes principales des spectres expérimentaux, la fonctionnelle B3LYP étant meilleure que la M06. Les calculs en dynamique moléculaire par DFT de ces complexes tétraédriques semblent les plus performants, à la fois pour la forme de bande avec un seul pic (au lieu de deux observés dans le cas des calculs en statique), et au niveau des positions (pas de décalage systématique observé vers le bleu et donc aucune correction empirique nécessaire comme c’était le cas pour les complexes avec trois ligands  $[\text{M}^{3+}(\text{Acac}^-)_2(\text{AcacH})]^+$ ).

Les bandes observées à basse fréquences sur la figure (4.17), trois bandes pour le

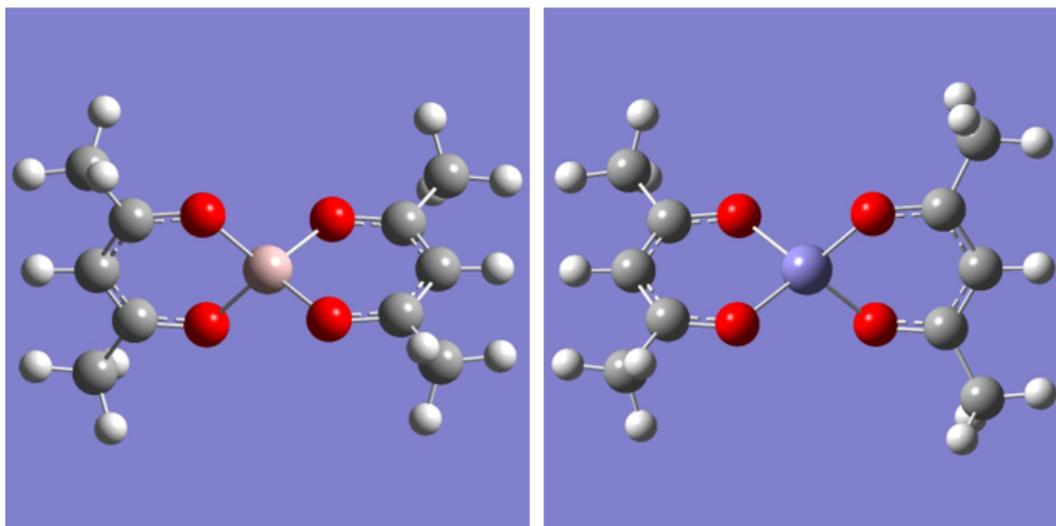


FIGURE 4.16 – Structures calculées pour  $[Al^{3+}(Acac^{-})_2]^{+1}$  et  $[Fe^{3+}(Acac^{-})_2]^{+1}$ . Les deux complexes possèdent une géométrie tétraédrique avec la même distance entre métal-oxygène pour les quatre atomes d'oxygène. Cette distance vaut 1,78 Å pour Al et 1,88 Å pour Fe.

spectre avec l'aluminium et deux bandes pour celui du fer, montrent des pics de faible intensités et qui correspondent aux spectres expérimentaux issus de l'irradiation par un laser infrarouge accompagné par le laser CO<sub>2</sub> qui permet de favoriser la fragmentation des ions piégés. Toutes les méthodes de calcul reproduisent bien la position de ces raies de basse fréquences avec un léger décalage vers le bleu pour les fonctionnelles B3LYP et M06. Comme indiqué précédemment, la structure tétraédrique (figure 4.16) de ce complexe entre le métal et deux ligands correspond à une géométrie plus rigide, avec les mêmes distances M–O pour les quatre atomes d'oxygène (1,78 Å pour Al et 1,88 Å pour Fe), c'est-à-dire des distances plus courtes que dans les complexes octaédriques précédents avec 3 ligands. Ce résultat est en accord avec les décalages vers le rouge observés sur les spectres expérimentaux.

#### 4.4.4 Spectres IRMPD de $[M_2^{3+}(Acac^{-})_5]^{+1}$ , M = Al, Fe

Nous avons également étudié des complexes bi-métalliques, premier pas vers des coeurs métalliques plus importants. Les complexes bi-métalliques de type  $[M_2^{3+}(Acac^{-})_5]^{+1}$  peuvent avoir une structure octaédrique, si un ou deux ligands bidentates ( $Acac^{-}$ ) créent un pont entre les deux centres cationiques, afin qu'ils puissent partager deux centres anioniques. La fragmentation par CID ou par IRMPD de l'ion  $[M_2^{3+}(Acac^{-})_5]^{+1}$  se produit facilement. Ce processus de fragmentation donne lieu principalement aux fragments  $[M^{3+}(Acac^{-})_2]^{+1}$ , suite à la perte du complexe  $M^{3+}(Acac^{-})_3$ , qui est neutre et très stable.

La figure (4.18) représente les spectres des deux complexes  $[Al_2^{3+}(Acac^{-})_5]^{+1}$  et  $[Fe_2^{3+}(Acac^{-})_5]^{+1}$  obtenus par spectroscopie IRMPD avec deux enregistrements complémentaires pour couvrir l'ensemble de la gamme de fréquence (basse et haute fréquence). Les deux spectres sont assez similaires (pour les positions et les formes de

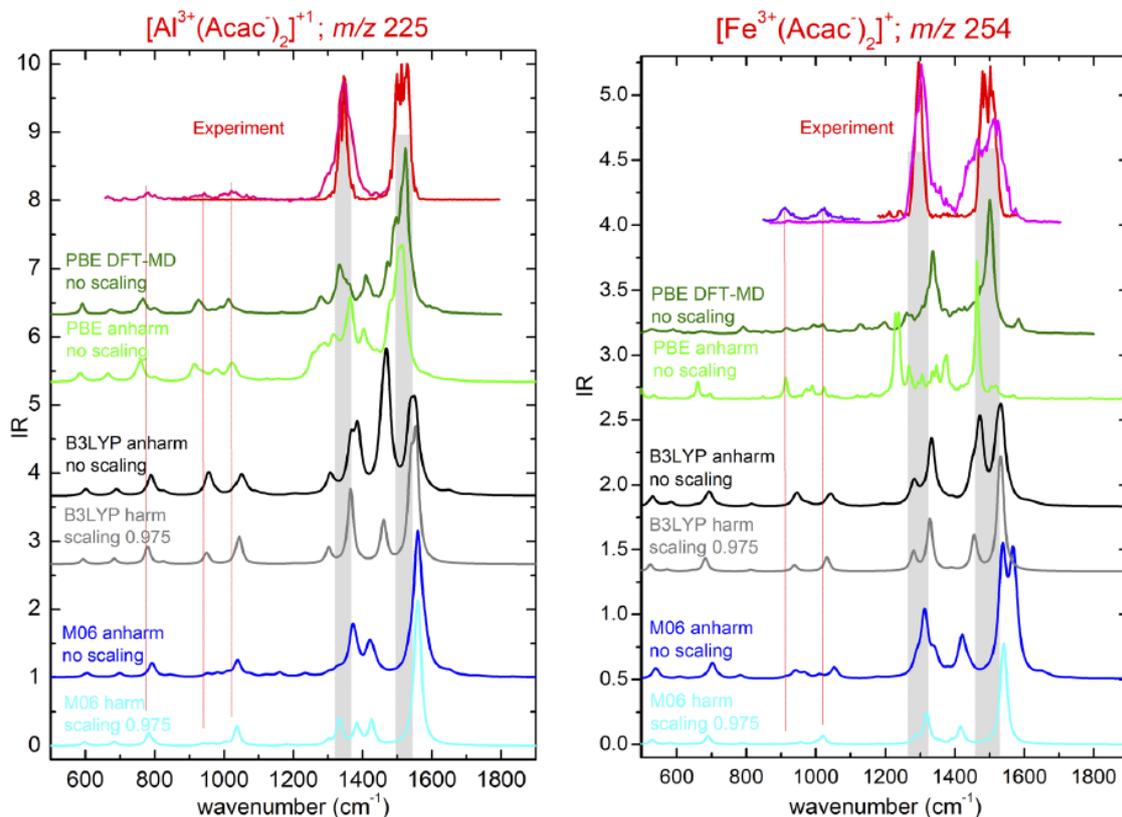


FIGURE 4.17 – Spectres IRMPD expérimentaux (rouge, magenta et violet) obtenus pour les complexes  $[Al^{3+}(Acac^-)_2]^{+1}$  et  $[Fe^{3+}(Acac^-)_2]^{+1}$  comparés aux spectres calculés. Différentes méthodes de calcul ont été utilisées : approximation harmonique avec facteur d'échelle (couleurs pâles) ou calcul anharmonique sans facteur d'échelle (couleurs foncées) aux niveaux M06/6-31+G\*\* (en bleu) et B3LYP/6-31G\* (en noir). Les spectres calculés au niveau PBE/TZVP en statique dans l'approximation harmonique avec facteur d'échelle (vert clair) et en dynamique (vert foncé) sont également présentés.

bandes) à ceux du complexe mono-métallique  $[M^{3+}(Acac^-)_2(AcacH)]^{+1}$  (figure 4.17). Cette similitude s'explique par le fait que les deux espèces possèdent la même symétrie structurale. Les deux bandes principales observées dans l'expérience sont localisées autour de  $1400\text{ cm}^{-1}$  et  $1560\text{ cm}^{-1}$  pour Al et entre  $1380\text{ cm}^{-1}$  et  $1580\text{ cm}^{-1}$  pour Fe, i.e. les valeurs sont proches de celles trouvées pour l'ion mono-métallique, mais avec un petit décalage vers le bleu de même quantité pour chacune des deux bandes ( $+7\text{ cm}^{-1}$  pour Al et  $+24\text{ cm}^{-1}$  pour les deux bandes du fer).

Ceci est une indication supplémentaire que les deux complexes (mono et bi-métalliques) partagent la même structure et le même état de spin, mais avec quelques contraintes de structure supplémentaires dans le cas des complexes bi-métalliques, ce qui mène à des interactions métal-ligand légèrement plus faibles et donc à des fréquences légèrement plus élevées pour les modes impliquant des vibrations du squelette des ligands qui se trouvent moins affectés par leur couplage avec les ions métalliques.

De plus, les modes de plus basse fréquence (en dessous de  $1100\text{ cm}^{-1}$ ), qui correspondent principalement à des vibrations métal-ligand, sont également similaires aux

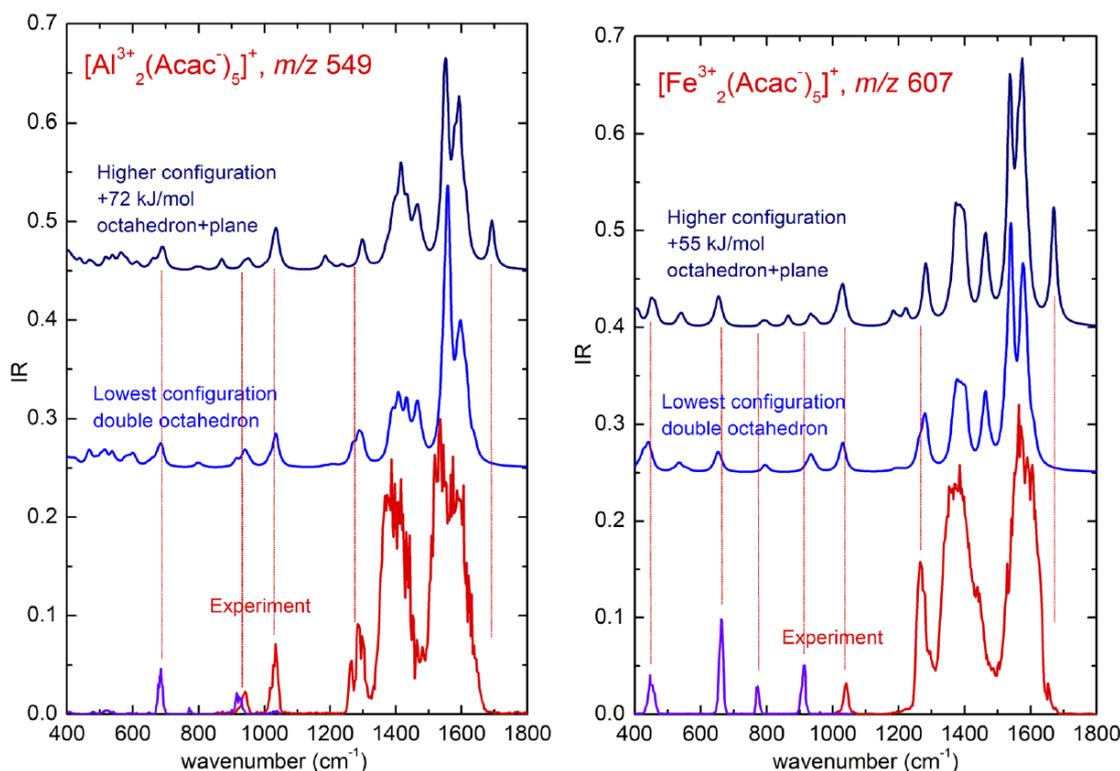


FIGURE 4.18 – Spectres IRMPD expérimentaux (rouge et violet) obtenus pour les complexes  $[Al_2^{3+}(Acac^-)_5]^+$  et  $[Fe_2^{3+}(Acac^-)_5]^+$  comparés aux spectres calculés avec la fonctionnelle B3LYP/6-31G\* pour deux structures : en double octaèdre (configuration de plus basse énergie) et une structure octaèdre et plane (configuration de plus haute énergie). Le facteur d'échelle utilisé dans les calculs conserve sa valeur précédente de 0,975 et on a supposé un couplage ferromagnétique entre les centres métalliques.

modes observés dans les complexes mono-métalliques, pour la même raison (i.e. les deux espèces ont la même géométrie), mais avec de petits décalages vers le rouge allant de  $0\text{ cm}^{-1}$  à  $-20\text{ cm}^{-1}$  pour les complexes bi-métalliques pour lesquels l'interaction métal-ligand est plus faible.

Cependant, nous avons aussi pu détecter expérimentalement une bande plus spécifique de basse fréquence à  $526\text{ cm}^{-1}$  (très faible) pour le complexe avec deux cations Al et à  $447\text{ cm}^{-1}$  (plus intense) pour le complexe avec deux ions de Fe. Cette bande apparaît également dans les calculs représentés sur les spectres de la figure (4.18) pour la structure en double octaèdre (conforme de plus basse énergie) et elle correspond à plusieurs modes de fréquences égales impliquant les ligands partagés par les deux ions métalliques. La principale différence entre les spectres des complexes mono et bi-métalliques vient de l'absence de la bande à haute fréquence (à  $1730\text{ cm}^{-1}$ ) dans le cas des complexes bi-métalliques. Cette bande correspond en effet au mode d'élongation C=O du ligand neutre (acétylacétone).

D'autres calculs ont été effectués pour une deuxième structure d'équilibre (structure octaédrique et plane) du complexe  $[M_2^{3+}(Acac^-)_5]^+$ , avec une énergie supérieure. Il s'agit d'une structure mono-métallique octaédrique à laquelle le complexe

monométallique  $[M^{3+}(Acac^{-})_2]^{+1}$  de structure plane est lié par une interaction spécifique entre l'ion métallique de ce complexe et l'atome  $C_3$  d'un ligand acétylacéto-nate doublement lié au premier cation métallique. La figure (4.19) montre les deux structures d'équilibre de  $[Fe_2^{3+}(Acac^{-})_5]^{+1}$  obtenues par la fonctionnelle B3LYP/6-31G\*. Les spectres calculés pour la configuration de plus haute énergie présentent une bande à  $1690\text{ cm}^{-1}$  pour Al et à  $1670\text{ cm}^{-1}$  pour Fe. Ces bandes correspondent au mode d'élongation symétrique C=O du ligand dont l'atome  $C_3$  interagit avec un ion métallique. Étant donnée que ces bandes ne sont pas observées dans les spectres expérimentaux, nous pouvons considérer que ce conformère est absent des expériences.

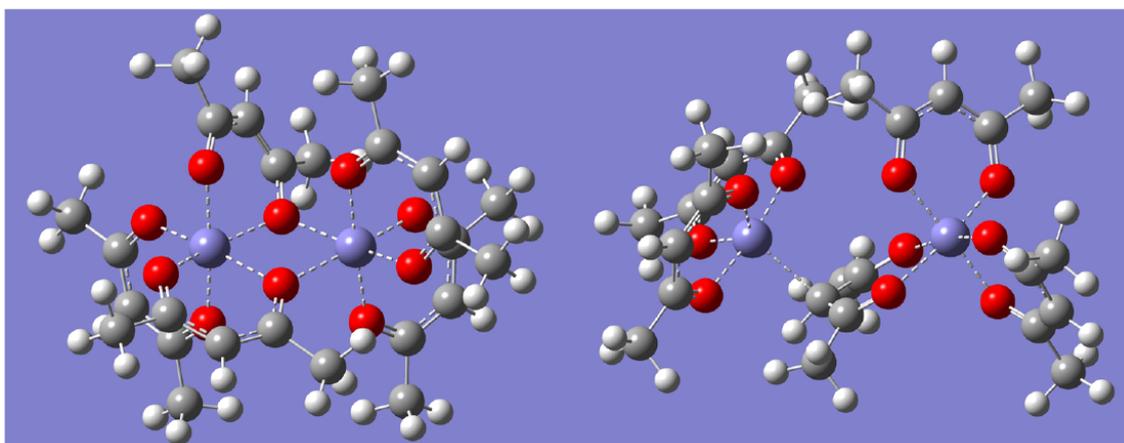


FIGURE 4.19 – Deux structures d'équilibre pour le complexe  $[Fe_2^{3+}(Acac^{-})_5]^{+1}$  calculées au niveau B3LYP/6-31G\*, pour le conformère de plus basse énergie (à gauche : structure en double octaèdre) et pour la configuration d'énergie plus élevée (à droite : structure octaèdre et plane). Dans ce second conformère, il existe une interaction spécifique entre un ion fer et un atome de carbone  $C_3$  d'un ligand anionique (ligne pointillée au centre), mais l'énergie totale est bien supérieure à celle de la structure double octaèdre.

## 4.5 Études structurales de nanoagrégats d'or protégés par des ligands

### 4.5.1 Introduction

De nombreuses études sont consacrées aux nanoparticules métalliques fonctionnalisées dues à leurs nombreuses applications en physique (résonances de plasmon de surface), en chimie (catalyse) et en biologie (propriétés optiques ou magnétiques, ciblage et vectorisation). Les nanoparticules d'or et d'argent sont particulièrement intéressantes et, pour le contrôle de leurs effets biologiques, il est très important d'avoir une connaissance fine des propriétés structurales et des stabilités chimiques de leurs ligands fonctionnels. En effet, de nombreuses études sont consacrées à la caractérisation de l'interface nano-ligand, notamment par des méthodes de RMN ou de spectroscopie IR, mais l'interprétation des données reste difficile en raison du manque relatif de contrôle en solution de la stœchiométrie des nanoparticules et de leur couverture ligandaire.

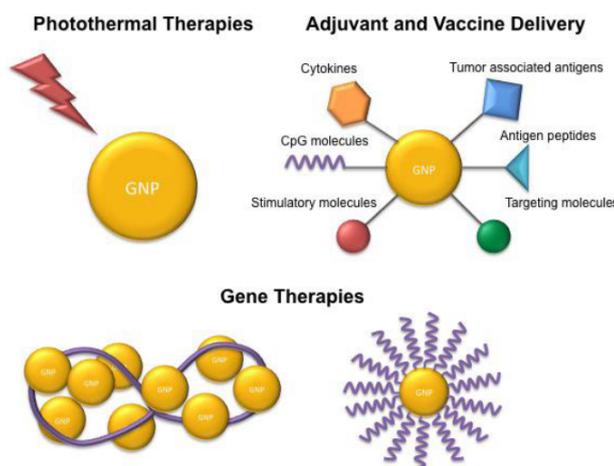


FIGURE 4.20 – Schématisation des nanoparticules d'or fonctionnalisées destinée à la thérapie des cancers [85].

Nous nous sommes intéressés, à la suite des études structurales de petits systèmes de complexes organométalliques (voir partie 4.4 à l'étude de la structure de nanoagrégats d'or protégés par des ligands (une dizaine d'atomes de métal et quelques centaines d'atomes de ligands) à l'aide de la même technique de caractérisation en phase gazeuse par spectroscopie IRMPD. Ces nanoagrégats possèdent des caractéristiques intermédiaires entre celles de complexes métal-ligand simples et celles de nanoparticules fonctionnalisées en solution dont l'intérêt est majeur pour les raisons évoquées précédemment [152, 153].

Les deux systèmes que nous avons étudiés sont constitués de dix ou onze atomes d'or qui sont liés à des ligands triphénylphosphine ou à des glutathions.

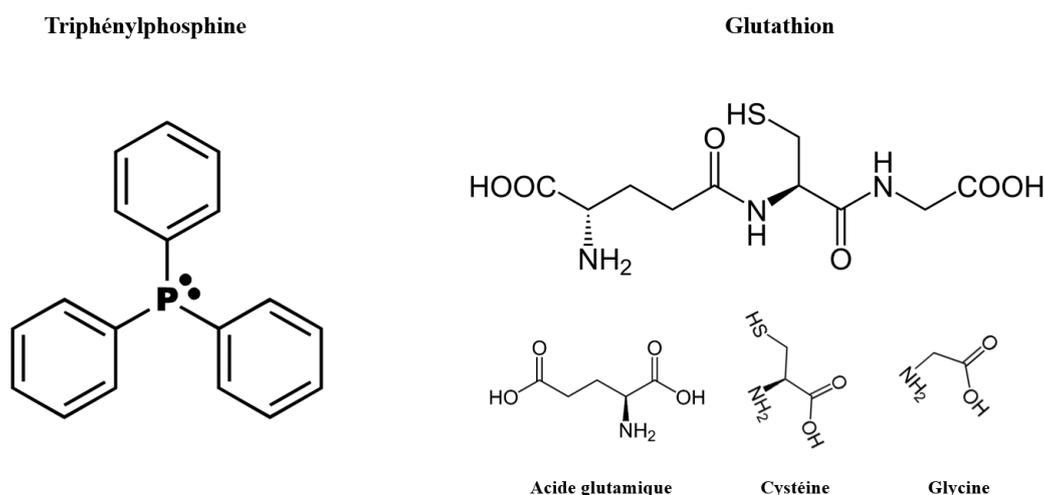


FIGURE 4.21 – Structure chimique de la triphénylphosphine et du glutathion avec ses trois constituants.

### Undecagold

Le premier nano-agrégat qu'on a étudié est commercialisé sous l'appellation 0.8 nm undecagold (Nanoprobes Inc.). Il s'agit d'un petit noyau d'or lié à des ligands de triphénylphosphine (figure 4.26). Le ligand triphénylphosphine (TPP ou parfois  $PPh_3$ ) est un composé organophosphoré de formule  $P(C_6H_5)_3$  (voir figure 4.21). Il est largement utilisé dans la synthèse de composés organométalliques du fait de sa stabilité à température ambiante et de sa capacité à se dissoudre dans des solvants non polaires (comme le benzène). L'undecagold est schématisé sur la figure (4.22), il possède plusieurs applications. On cite : l'étalonnage de microscope électronique à haute résolution et le traçage des cellules et les tissus.

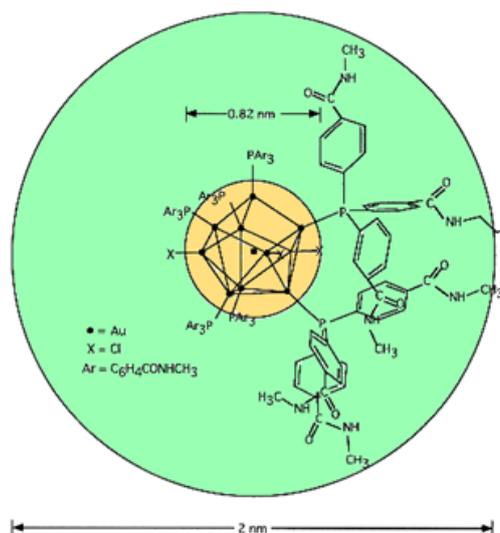


FIGURE 4.22 – Représentation commerciale de l'undecagold. La formule de l'échantillon commercial Nanoprobes Inc.  $[Au_{11}(PAr_3)_7Cl_3]$ .

## Or-glutathion

Le deuxième système que nous avons étudié comporte des chaînes or-glutathion enchaînées de façon covalente, avec 10 atomes d'or. Le glutathion est un pseudo-tripeptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine (voir figure 4.21). Il nous a été fourni par le groupe de Philippe Dugourd (iLM, Lyon) qui a étudié par spectroscopie UV-Vis et des calculs ces nanoagrégats [154, 155]. En 2014 une publication de Xie et al, a montré l'importance de tels nanoagrégats permettant d'augmenter le ciblage des tumeurs pour améliorer la sécurité et l'efficacité en radiothérapie. Il observe que la présence d'une coque en glutathion permet de préserver les tissus sains. Ce système peut-être efficacement éliminer par les reins [156].

### 4.5.2 Étude structurale de nano-agrégats Au-TriPhénylPhosphine

#### Spectre de masse

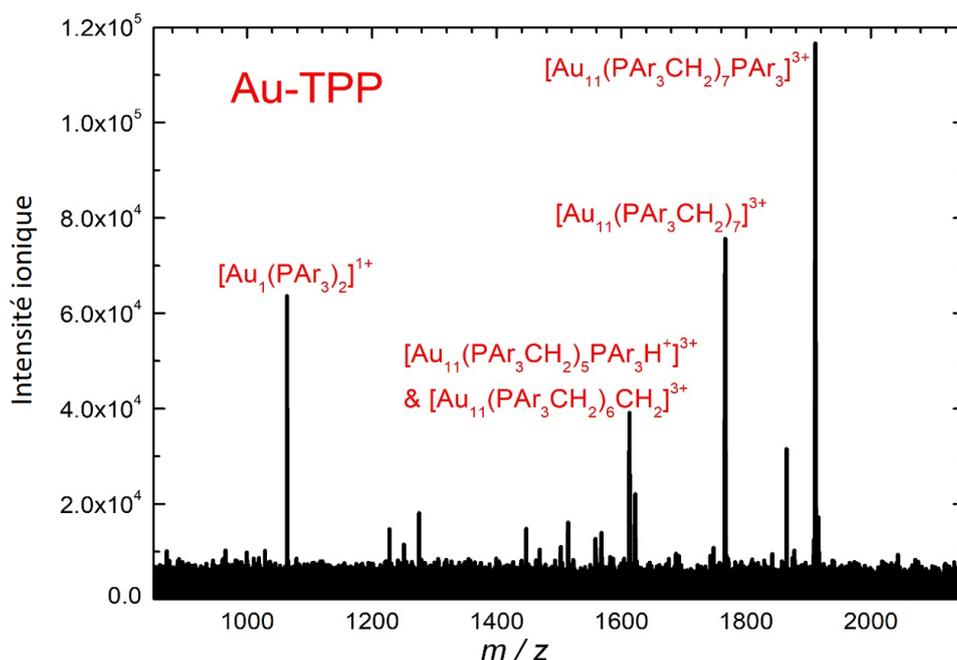


FIGURE 4.23 – Spectre de masse expérimental des cations d'Or-triPhénylPhosphine (Au-TPP) obtenu après ionisation par une source electrospray.

Le nano-agrégat d'or (0.8 nm undecagol) commercial qu'on a utilisé dans nos expériences possède sous forme neutre la formule chimique suivante :  $[Au_{11}(PAr_3)_7Cl_3]$ , où  $Ar = C_6H_4-CO-NH-CH_3$ . Pendant le processus d'ionisation de l'electrospray, on s'attendait à ce que les cations  $[Au_{11}(PAr_3)_7]^{3+}$  soient observés après l'élimination des trois anions  $Cl_3^-$ . Cependant, le pic de masse principal obtenu correspond aux complexes avec un ligand TPP supplémentaire, c'est à dire 8 ( $PAr_3$ ) au lieu de 7. De plus,

les complexes à sept ligands peuvent être observés (figure 4.23) comme masse principale après une dissociation induite par collision (CID) dans la cellule quadripolaire-hexapolaire du spectromètre FT-ICR. La présence de 7 ou 8 ligands TPP autour de nanoclusters (NC) d'or a été discutée dans le contexte des voies d'échange de ligands pour former de plus grandes nanoparticules d'or [156].

La composition exacte des ions produits par l'ESI n'est pas facile à déterminer lorsque les masses observées sont plus élevées que celles attendues à partir des formules données (comme la masse de 5198.721 pour  $\text{Au}_{11}(\text{Pr}_3)_7$ ). La figure (4.24) montre la distribution isotopique expérimentale et un ajustement (tracé en rouge) utilisant une formule avec sept groupes méthyles supplémentaires (7 groupe  $\text{CH}_3$  à la place de sept atomes H, c'est-à-dire +98 Da). Le nombre de groupes méthyles étant égal au nombre des ligands, nous supposons que chaque méthyle est localisé sur un ligand TTP (un radical N-éthylphénylamide remplaçant un radical N-méthylphénylamide sur les trois ligands), c'est-à-dire  $\text{PAr}_3\text{CH}_2$  au lieu de  $\text{PAr}_3$ .

D'après cette comparaison entre le spectre expérimental et l'ajustement, il apparaît que les positions absolues et les intensités relatives correspondent bien à la formule attribuée avec un groupe méthyle supplémentaire. Ceci pourrait provenir du fait que ces nanoclusters undecagold sont également disponibles sous forme fonctionnalisée et donc avec une fonction ajoutée sur l'un des groupes phénylamide via un lien carboné court sur l'atome d'azote. Dans la suite, tous les spectres IR calculés sont donc effectués sur l'espèce supposée détectée à  $m/z$  1766 avec la formule  $[\text{Au}_{11}(\text{PAr}_3\text{CH}_2)_7]^3$ .

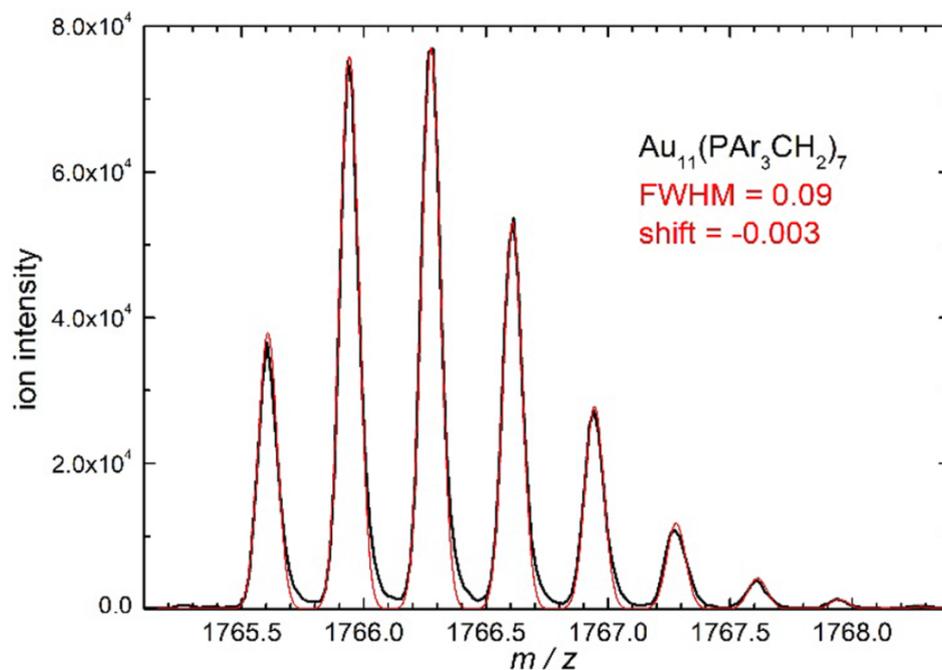


FIGURE 4.24 – Spectre de masse expérimental (en noir) de la distribution de masse isotopique du complexe  $[\text{Au}_{11}(\text{PAr}_3\text{CH}_2)_7]$  et ajustement (courbe en rouge) à l'aide d'une gaussienne de largeur à mi hauteur ( $\text{FWHM} = 0.09$ ) et un décalage ( $\text{shift} = -0.003$ ).

### Comparaison entre spectres FTIR et IRMPD pour les complexes d'or-triphénylphosphine (Au-TPP)

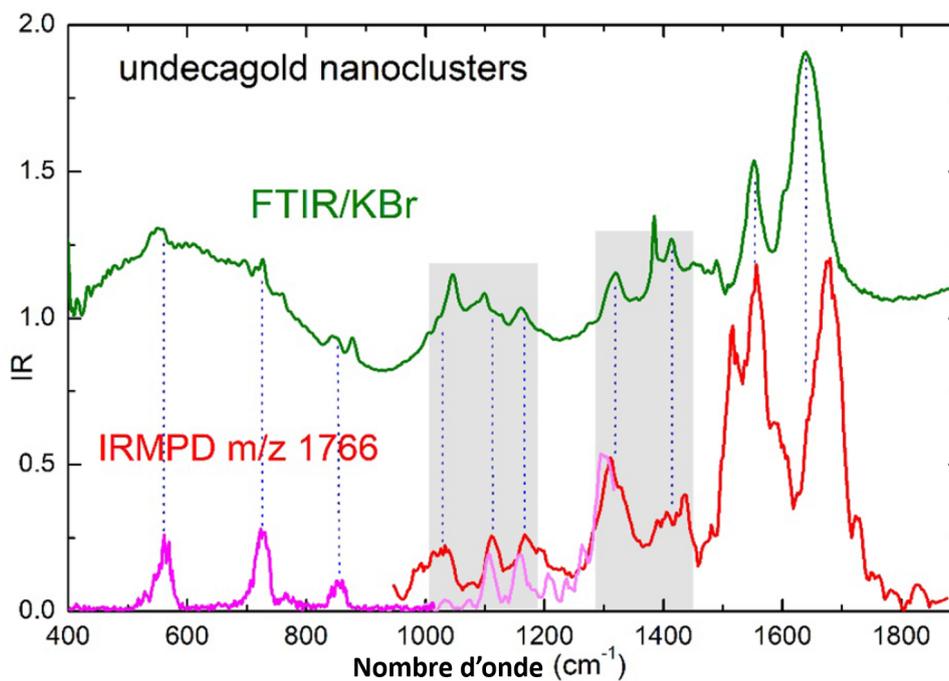


FIGURE 4.25 – Comparaison entre spectres FTIR et IRMPD

La figure (4.25) montre une comparaison entre un spectre FTIR du complexe  $[\text{Au}_{11}(\text{PAr}_3)_7\text{Cl}_3]$  obtenu en phase condensée avec des pastilles de KBr pour un échantillon neutre, et le spectre expérimental IRMPD de l'ion  $[\text{Au}_{11}(\text{PAr}_3\text{CH}_2)_7]^{3+}$  de rapport masse/charge égale à 1766. Ce spectre est composé de trois runs différents (la puissance du laser  $\text{CO}_2$  de préchauffage n'est pas la même pour tous les runs) afin de sonder toute la plage de fréquence entre 400 et 1800  $\text{cm}^{-1}$ . Ceci, ajouté au fait que les puissances du FEL n'étaient pas les mêmes pour ces différents runs, fait que les intensités relatives des bandes peuvent ne pas refléter exactement les taux d'absorption IR. Dans l'analyse de ces spectres, on s'intéressera donc plutôt à la position des bandes.

Les deux spectres présentent plusieurs caractéristiques communes mais aussi quelques différences. Premièrement la bande principale du spectre FTIR à 1640  $\text{cm}^{-1}$  est attribuée à une bande caractéristique d'élongation  $\text{C}=\text{O}$  dite bande Amide I. Elle est décalée vers le bleu dans le spectre IRMPD. La deuxième similitude existant entre les spectres est la bande située à 1555  $\text{cm}^{-1}$ , et qui correspond au groupement Amide II. Elle apparaît en double pics dans le spectre IRMPD.

La bande entre 1300 et 1450  $\text{cm}^{-1}$  est également visible dans le spectre IRMPD mais sous forme de plusieurs pics dont la valeur maximale se trouve entre 1290-1310  $\text{cm}^{-1}$ . De plus, on observe sur le spectre FTIR une bande située entre 1000 et 1200  $\text{cm}^{-1}$ . Bien que cette dernière arrive dans une zone où les spectres IRMPD sont

fluctuants (chevauchement de deux runs), elle est visible mais avec une faible intensité. L'ensemble des deux bandes sélectionnées en gris sur la figure (4.25) correspond à ce qu'on appelle le groupe Amide III. Elles sont connues pour leur sensibilité aux changements de conformations moléculaires, et donc peuvent apparaître différemment à l'état solide et dans les cations isolés en phase gazeuse.

Les trois bandes observées sur le spectre IRMPD à 560, 720 et 855  $\text{cm}^{-1}$  sont difficilement visibles sur le spectre FTIR. Ces pics sont accompagnées d'un fond large dans la gamme de 400 à 900  $\text{cm}^{-1}$  qui peut être lié aux modes vibrationnels impliquant des combinaisons entre les mouvements de l'amide et le TPP (interactions à l'intérieur du nano-agrégat qui sont moins sensibles aux interactions externes).

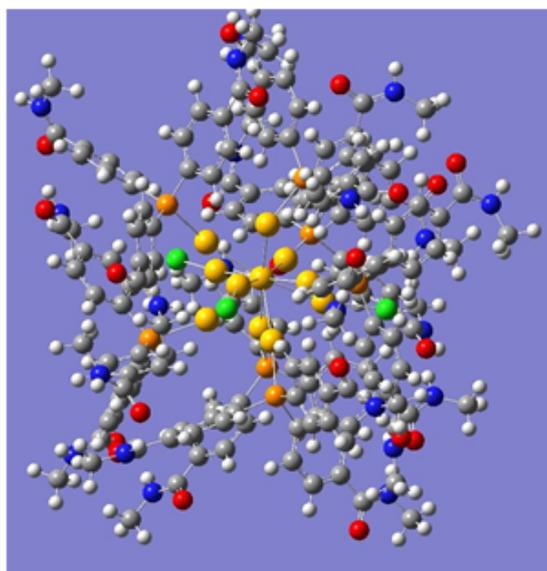


FIGURE 4.26 – Structure de l'undecagold  $[Au_{11}(Par_3)_7Cl_3]$  calculée.

### Comparaison aux spectres simulés

Les spectres IRMPD de l'ion  $[Au_{11}(Par_3CH_2)_7]^{3+}$  (où  $Ar = C_6H_4-CO-NH-CH_3$ ) ainsi que les spectres calculés aux niveaux M06/LanL2DZ et B3LYP/6-31G\* sont représentés sur la figure (4.27). Tous les spectres sont normalisés afin de pouvoir comparer les bandes de différents calculs.

Dans la zone des bandes amine (1200 - 1650  $\text{cm}^{-1}$ ) discutée dans la partie précédente, les deux premières bandes sont bien reproduites par les calculs B3LYP (accord en position) alors que les calculs en M06L donnent pour la première bande une position décalée vers le rouge. Ceci indique que cette méthode ne permet pas de reproduire correctement la bande amine I. La bande à 1310  $\text{cm}^{-1}$  est également visible dans les deux calculs, mais ils présentent également une bande intense à 1380 - 1410  $\text{cm}^{-1}$  qui est décalée vers le bleu dans le spectre expérimental.

Dans la zone intermédiaire, les spectres calculés présentent trois pics situés à 1000, 1090 et 1150  $\text{cm}^{-1}$ . En revanche, le spectre expérimental dans cette gamme de

fréquence est moins clair, ce qui rend difficile l'attribution des modes de vibration. Pour la partie du spectre de plus basse énergie, on repère trois bandes sur le spectre IRMPD qui sont reproduites par les calculs avec une meilleure concordance en M06L. Cependant, on remarque aussi dans les calculs une bande supplémentaire ( $600\text{--}620\text{ cm}^{-1}$ ) qui correspond principalement à une flexion hors plan des liaisons N-H. Ce mode de déformation hors plan n'apparaît pas dans le spectre IRMPD (absence de bande à droite de  $560\text{ cm}^{-1}$ ). On note que les trois modes de basse énergies ( $560$ ,  $720$  et  $855\text{ cm}^{-1}$ ), présents également dans les deux calculs, correspondent au même mode de flexion hors plan des liaisons N-H. Ce mode est couplé à différents autres modes de déformation hors plan impliquant les hydrogènes du groupe phényle. De plus, on note que l'élargissement des bandes dans les calculs résulte du chevauchement de nombreux autres modes dans cette gamme. Ce résultat est en accord de manière qualitative avec le spectre FTIR (figure 4.25).

Les structures d'équilibres du cation triplement chargé sont présentées sur la figure (4.27). Elles sont calculées à partir de la structure cristalline expérimentale du même système de nanoagrégats mais avec des ligands triphénylphosphine non méthylés, tel que cela a été rapporté précédemment [157]. Avec la méthode M06L, la distribution spatiale des 11 atomes d'or au sein du nano-agrégat correspond à une structure d'équilibre compacte et peu déformée par rapport à la structure de la phase condensée de départ. Ceci se traduit par un atome d'or central entouré par 10 autres atomes d'or, avec des distances variant entre  $2.705\text{--}2.805\text{ \AA}$ . Ces distances sont légèrement supérieures aux distances de la phase cristalline, qui sont de  $2,71\text{ \AA}$  pour les atomes d'or également liés au chlorure et de  $2,61\text{ \AA}$  pour ceux liés au triphénylphosphine.

La deuxième méthode de calcul (B3LYP) conduit à une structure moins compacte pour le noyau d'or, ce dernier se répartissant dans un plan plutôt que d'adopter une distribution sphérique (figure (4.27)), avec quelques ruptures de liaison Au-Au qui conduisent à cette géométrie étalée. La distance maximale entre les deux atomes d'or les plus éloignés est de  $8\text{ \AA}$ . Les ligands sont aussi plus étalés dans cette deuxième structure. Dans ces deux structures, il y a de nombreuses liaisons hydrogènes et de nombreuses interactions électrostatiques et de van der Waals entre les 7 ligands, spécialement ceux impliquant les groupes amides, mais les distances Au-P sont à peu près les mêmes, à savoir  $2.45 \pm 0.025\text{ \AA}$  (contre  $2.28\text{ \AA}$  dans le cristal).

La distribution des charges partielles pour les atomes d'or dans le nanoagrégat ne semble pas être très différente selon la méthode utilisée. Dans le cas de la structure obtenue avec M06L, l'atome d'or central est chargé négativement avec une valeur de  $-1.82$  tandis que les autres atomes d'or qui lui sont liés portent une charge légèrement positive qui varie entre  $+0.06$  et  $+0.23$ . Dans les calculs en B3LYP (structure sans noyau d'or central), les charges partielles varient entre  $0.7$  et  $+0.17$ . Enfin dans les deux cas, la charge totale portée par le coeur d'or dans le nano-agrégat est légèrement négative, i.e.  $-0.51$  en M06L et  $-0.11$  pour les calculs B3LYP. L'ensemble des atomes de phosphore porte une charge proche de  $+1$  ( $+0.94 \pm 0.03$  pour M06L et  $+1.03 \pm 0.02$  pour les calculs en B3LYP), de sorte que la charge totale de  $+3$  du cation provient principalement des sept ligands.

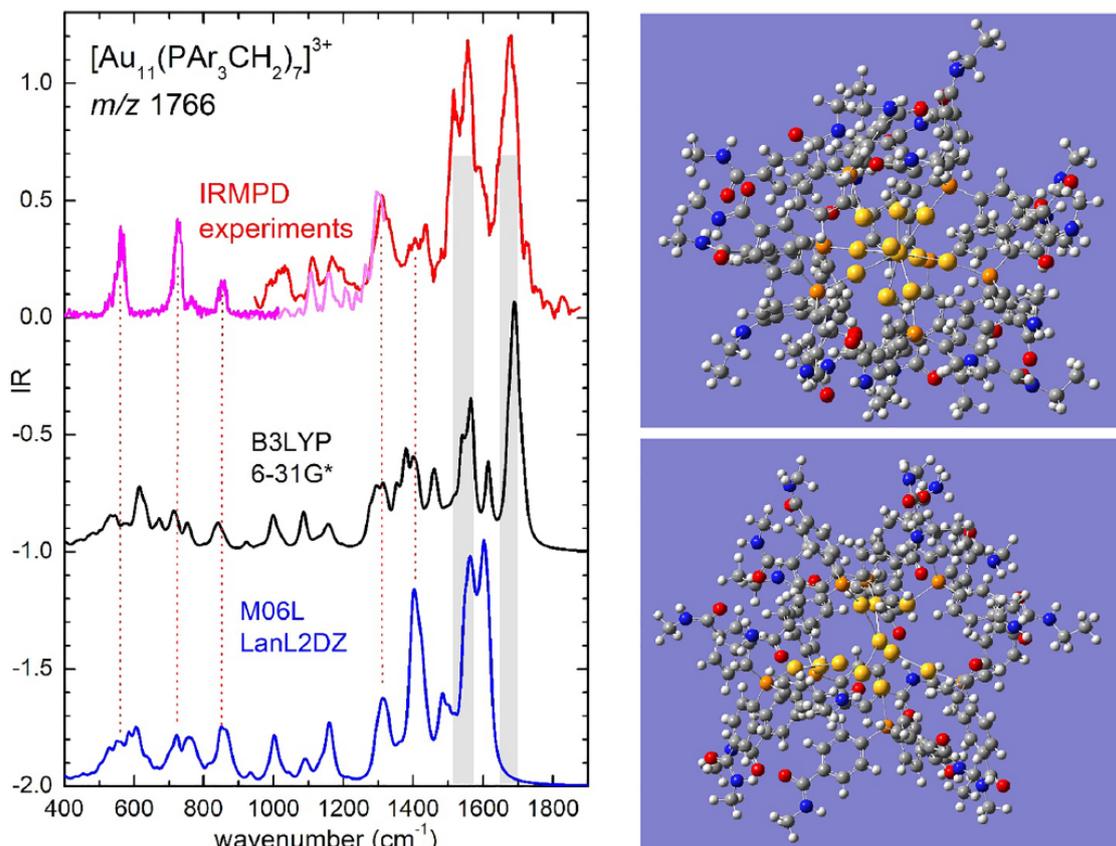


FIGURE 4.27 – Spectres IRMPD expérimentaux (rouge et magenta) obtenus pour les ions undecagold avec 7 ligands en comparaison avec les spectres calculés aux niveaux M06L/LanL2DZ (en bleu) et B3LYP/6-31G\* (en noir). À droite : deux structures d'équilibre sont calculées en M06L/LanL2DZ (en haut) avec un cœur d'or préservé par rapport à la structure cristalline et en B3LYP/6-31G\* (en bas), avec un cœur d'or moins compact.

### Spectre IRMPD du cation monochargé $[\text{Au}(\text{TPP})_2]^+$

La figure (4.28) représente une comparaison entre les spectres calculés au niveau M06/6-31+G\*\* et B3LYP/6-31G\*\* d'une part et les spectres expérimentaux IRMPD obtenu pour le cation monochargé ( $m/z = 721$ ) à CLIO et à FELIX. Ce cation contient un atome d'or lié à deux ligands de triphénylphosphine  $\text{Au}(\text{TPP})_2^+$ , et sa structure d'équilibre est représentée à droite des spectres.

Ce système, de plus petite taille, est plus simple à étudier par rapport au cation triplement chargé discuté précédemment. Les deux calculs reproduisent très bien les spectres expérimentaux (en particuliers pour les positions des bandes) qui ont été réalisés sur deux instruments différents et qui sont également en accord entre eux. Les positions expérimentales et calculées de toutes les bandes ne diffèrent au maximum que d'une quinzaine de  $\text{cm}^{-1}$ , avec un accord souvent meilleur, en particulier pour les calculs en B3LYP. Pour ceux-ci, l'écart le plus important concerne le mode  $1120 \text{ cm}^{-1}$  qui correspond au mode d'élongation (P-C) couplé au mode de déformation (C-H) dans le plan du cycle phényle. Cette bande est calculée trop décalée vers le rouge d'environ  $15 \text{ cm}^{-1}$ . Ce décalage a déjà été observé dans plusieurs comparaisons

précédentes impliquant des modes d'élongation avec des atomes de phosphore pour lesquels les facteurs d'échelle habituels conduisent souvent à des fréquences calculées trop basses [158, 159].

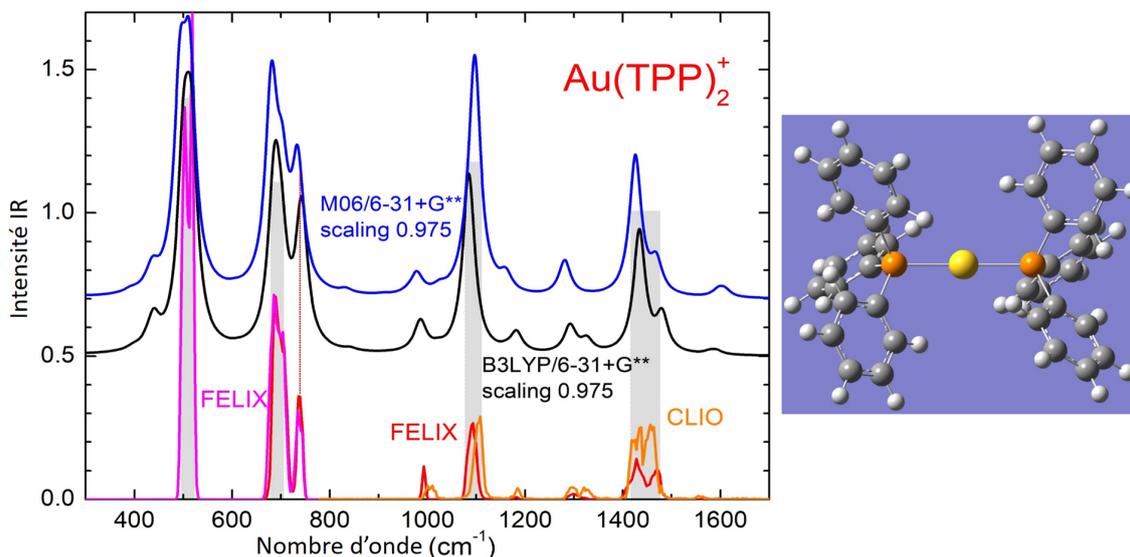


FIGURE 4.28 – Spectres IRMPD expérimentaux mesurés à CLIO (spectre orange) et à FELIX (spectres rouge et magenta) pour le cation monochargé  $\text{Au}(\text{TPP})_2^+$  à  $m/z$  721, en comparaison avec les spectres calculés aux niveaux M06/6-31+G\*\* (spectre bleu) et B3LYP/6-31+G\*\* (spectre noir). À droite : la structure d'équilibre obtenue par B3LYP/6-31G\*

On note bien sûr l'absence des bandes amides qui étaient présentes dans le nano-agrégat de l'ion  $[\text{Au}_{11}(\text{PAR}_3\text{CH}_2)_7]^{3+}$ . Dans la zone de basse énergie, les calculs sont en très bon accord avec l'expérience, notamment pour les positions calculées en B3LYP, mais leurs intensités semblent sous-estimées. C'est le cas par exemple pour la bande à  $500\text{ cm}^{-1}$ , attribuée au mode de vibration antisymétrique (P-Au-P) ou bien aussi pour le mode mesuré à  $700\text{ cm}^{-1}$  et qui correspond aux vibrations internes du phényle et du phényle-phosphore. Ce résultat prouve que la méthode de calcul actuelle avec un facteur d'échelle unique de 0,975 en B3LYP ou en M06 est capable de reproduire la structure de ce système relativement petit par rapport au NC. La distance Au-P est de  $2.39\text{ \AA}$ , très proche de celle dans le NC avec  $2.45\text{ \AA}$ .

Enfin, la charge partielle de l'unique atome d'or de l'ion  $\text{Au}(\text{TPP})_2^+$  vaut +0.2. Or, les deux atomes de phosphores sont aussi positifs mais avec une charge proche de +1 chacun. Ce qui fait que chaque groupe phényle porte la charge partielle négative de -0.2 pour donner un cation de charge totale +1.

### 4.5.3 Complexe or-glutathion (Au-GS)

Dans ce qui suit, je présente le second nano-agrégat étudié par spectroscopie IRMPD. Il s'agit du complexe or-glutathion (Au-GS). Le premier complexe étudié

est formé d'une succession de 10 atomes d'or liés à un atome de soufre du glutathion par des liaisons covalentes et formant des structures cycliques.

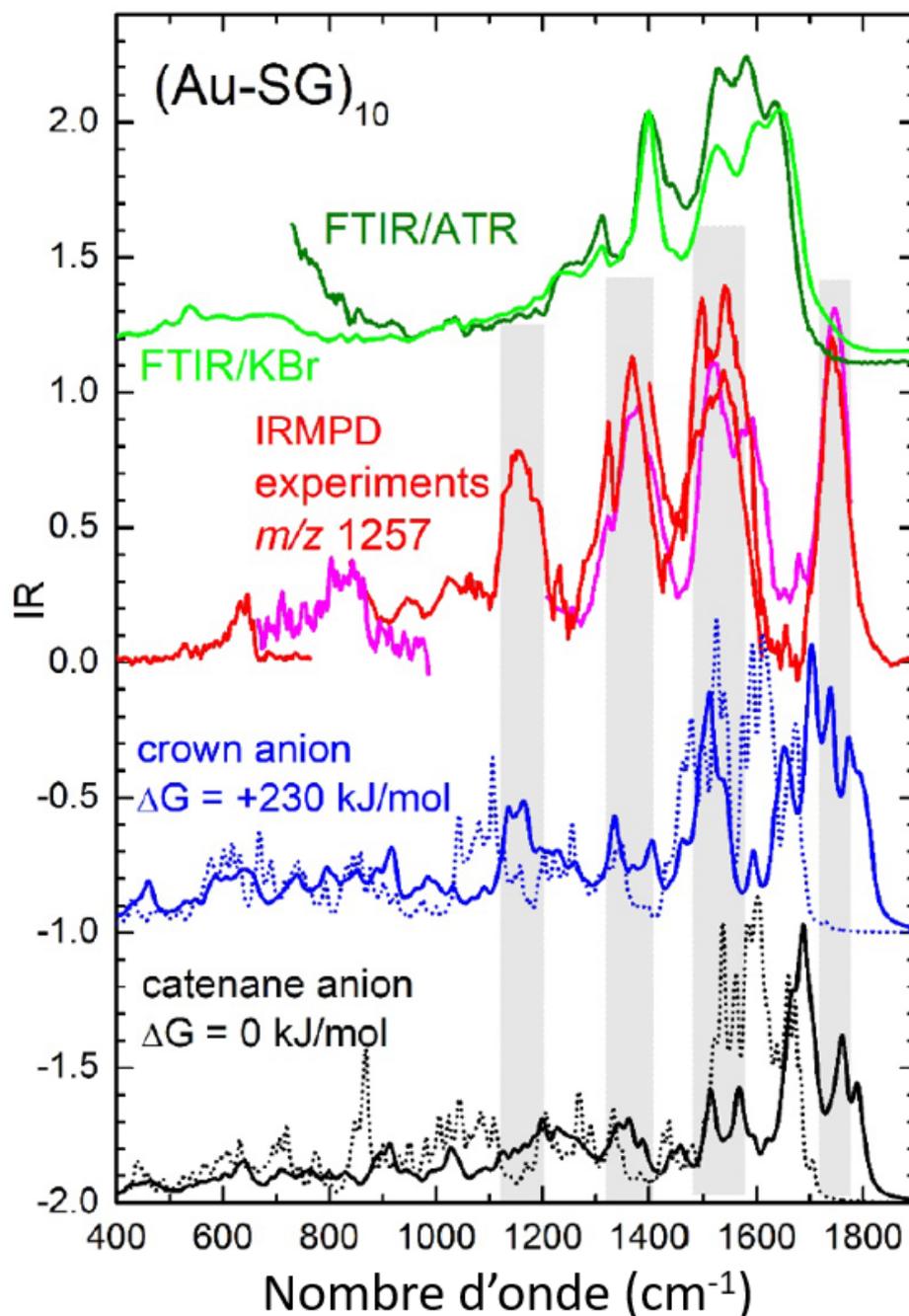


FIGURE 4.29 – Comparaison des spectres expérimentaux : spectres FTIR (vert clair et vert foncé) et spectres IRMPD (rouge et magenta) pour l'anion  $[(AuSG)_{10}-4H]^{4-}$  à  $m/z$  1257, ainsi que les spectres calculés pour deux structures d'équilibre en couronne (en bleu) et en caténane (en noir) via deux calculs en M06L/LanL2DZ (traits pointillés) et B3LYP/6-31G\*\* (traits pleins).

La figure (4.29) regroupe les spectres IR de l'anion  $[(AuSG)_{10}-4H]^{4-}$  à  $m/z$  1257 et qui sont obtenus expérimentalement ou par des calculs. Le premier spectre est

mesuré en phase condensée par la technique FTIR en utilisant une matrice solide de KBr (ce type de matrice solide possède une transmission maximale dans la gamme de fréquence IR). Ensuite, les spectres IRMPD ont été réalisées avec le laser à électrons libres de CLIO. Ces deux spectres expérimentaux sont comparés avec les calculs de chimie quantique réalisés en M06/LanL2DZ et en B3LYP/6-31G\*.

En comparaison avec le nano-agrégat (Au-TPP), les spectres FTIR et IRMPD sont assez différents. En effet, la bande amide du spectre FTIR/KBr du complexe (Au-SG) est formée de trois bandes : une double bande (1600 - 1640  $\text{cm}^{-1}$ ), une deuxième bande située vers 1525  $\text{cm}^{-1}$  et la troisième est à 1400  $\text{cm}^{-1}$ . On retrouve sur le spectre IRMPD les trois bandes amides. Or la bande amide I (entre 1725 - 1765  $\text{cm}^{-1}$ ) est décalée de plus de 100  $\text{cm}^{-1}$  par rapport à sa position sur le spectre FTIR. La position de l'amide II vers 1480 - 1590  $\text{cm}^{-1}$  correspond à celle observée en FTIR, et enfin l'amide III qui est mesurée entre 1315 - 1405  $\text{cm}^{-1}$  est donc décalée vers le rouge (décalage d'environ 40  $\text{cm}^{-1}$ ) par rapport au spectre de la phase solide mais également avec une largeur plus grande. De plus, une bande supplémentaire intense apparaît sur le spectre IRMPD autour de 1115 - 1205  $\text{cm}^{-1}$ , alors que le spectre du complexe neutre dans cette région ne montre pas d'absorption (spectre plat). Pour les fréquences inférieures à 1000  $\text{cm}^{-1}$ , les deux spectres ne sont pas très similaires. L'allure du spectre FTIR/KBr est quasiment la même que celle obtenue en faisant un spectre FTIR à l'aide d'une autre matrice (ZnSe) par le biais de la technique ATR (Attenuated Total Reflectance). Ceci montre clairement que la structure adoptée en IRMPD (phase gazeuse) est différente de la structure observée en phase condensée. La bande amide I, fortement décalée vers le bleu dans le spectre IRMPD de la phase gazeuse, indique clairement qu'il y a beaucoup plus de groupements amides libres dans l'anion déprotoné isolé que dans la phase solide.

Les spectres calculés ont été réalisés par DFT en statique avec une analyse fréquentielle dans l'approximation harmonique avec la fonctionnelle B3LYP et la base 6-31G\* ou avec la fonctionnelle M06L et la base LanL2DZ, et avec le même facteur d'échelle (0.975) dans les deux cas. Les calculs ont été optimisés pour les deux isomères qui sont représentés sur la figure (4.30). Ces deux structures sont la structure couronne ou la structure caténane qui ont été déjà calculées pour des systèmes similaires [154, 160].

Comme on peut voir dans cette comparaison entre calculs, la fonctionnelle B3LYP (spectres en trait plein) reproduit mieux les spectres expérimentaux que la fonctionnelle en M06L (en pointillé). Cette dernière ne permet pas de reproduire correctement la bande amide I (1665  $\text{cm}^{-1}$  au lieu de 1745  $\text{cm}^{-1}$ ), ni la bande expérimentale à 1115 - 1205  $\text{cm}^{-1}$ .

Malgré le fait que les différences entre les spectres calculés correspondant aux deux structures considérées ne sont pas si grandes et parfois inférieures à celles des données expérimentales, nous avons tendance à favoriser la géométrie couronne par rapport à celle du caténane pour les raisons suivantes : (i) la bande expérimentale spécifique à 1115 - 1205  $\text{cm}^{-1}$  apparaît uniquement dans le spectre calculé B3LYP de l'isomère couronne à la bonne fréquence mais avec une intensité plus faible ; (ii)

la bande expérimentale de l'amide II ( $1480 - 1590 \text{ cm}^{-1}$ ) est bien mieux reproduite en intensité dans le spectre B3LYP de la couronne. Cette affectation provisoire est cependant en contradiction avec la grande différence d'énergie libre de  $+230 \text{ kJ/mol}$  calculée entre les deux structures de l'anion, en faveur de la structure caténane, et aussi en contradiction avec les conclusions des études précédemment menées dans le domaine X et UV sur ces mêmes espèces [154].

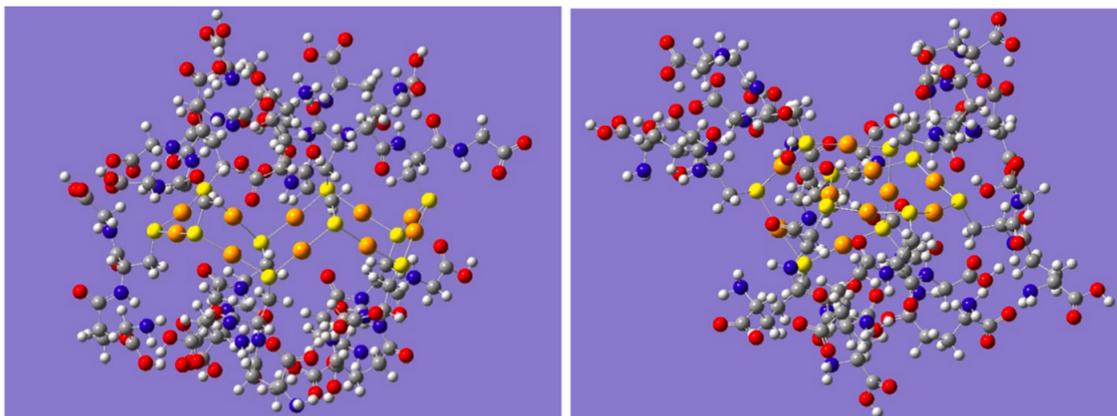


FIGURE 4.30 – Structures d'équilibre en couronne (gauche) et en caténane (droite) des ions isolés  $[(\text{AuSG})_{10} - 4\text{H}]^{4-}$  obtenus par les calculs au niveau B3LYP/6-31G\*. Dans les deux cas, les liaisons Au-S forment une chaîne cyclique unique (couronne) ou double (caténane) sur laquelle les dix ligands glutathion sont liés par leur atome de soufre, quatre d'entre eux étant déprotonés de leur côté carboxyle.

### Structures et charges partielles de l'anion $[(\text{AuSG})_{10} - 4\text{H}]^{4-}$

Il est à noter que, contrairement aux études précédentes [154, 160], nous avons ici pris en compte tous les atomes des ligands du glutathion et donc toutes les interactions entre eux. Cependant, ce système total est trop grand (presque 400 atomes) pour effectuer une recherche conformationnelle des structures des ligands. Nous présentons donc ici les structures d'équilibre que nous avons obtenues à partir d'une seule optimisation géométrique spécifique pour chaque isomère.

Dans les deux structures, toutes les distances Au-S sont similaires mais elles sont légèrement plus faibles et moins dispersées dans l'isomère couronne, c'est-à-dire entre 2.38 et 2.40 Å, par rapport à l'isomère caténane, où elles se situent entre 2.37 et 2.47 Å. Cette différence est probablement due au fait qu'il y a moins de contraintes sur la chaîne Au-S dans l'isomère couronne qui est moins compact par rapport à la géométrie caténane.

On peut faire la même remarque sur les charges partielles de ces deux structures, qui sont beaucoup plus homogènes dans l'isomère en géométrie couronne, c'est-à-dire  $+0.25/+0.29$  pour l'Au et  $-0.23/-0.31$  pour les atomes de S, par rapport à l'isomère caténane, avec  $0.02/+0.29$  pour l'Au et  $-0.15/-0.25$  pour les atomes de S. Ainsi, la charge totale détenue par les dix liaisons de la chaîne Au-S est presque nulle ( $+0.06$ )

pour l'isomère couronne et légèrement négative -0.3 pour la structure caténane, de sorte que la charge globale (-4) de l'anion provient principalement des quatre ligands glutathion déprotonés dans les deux cas.

### Anion $[\text{AuSG-H}^+]^-$

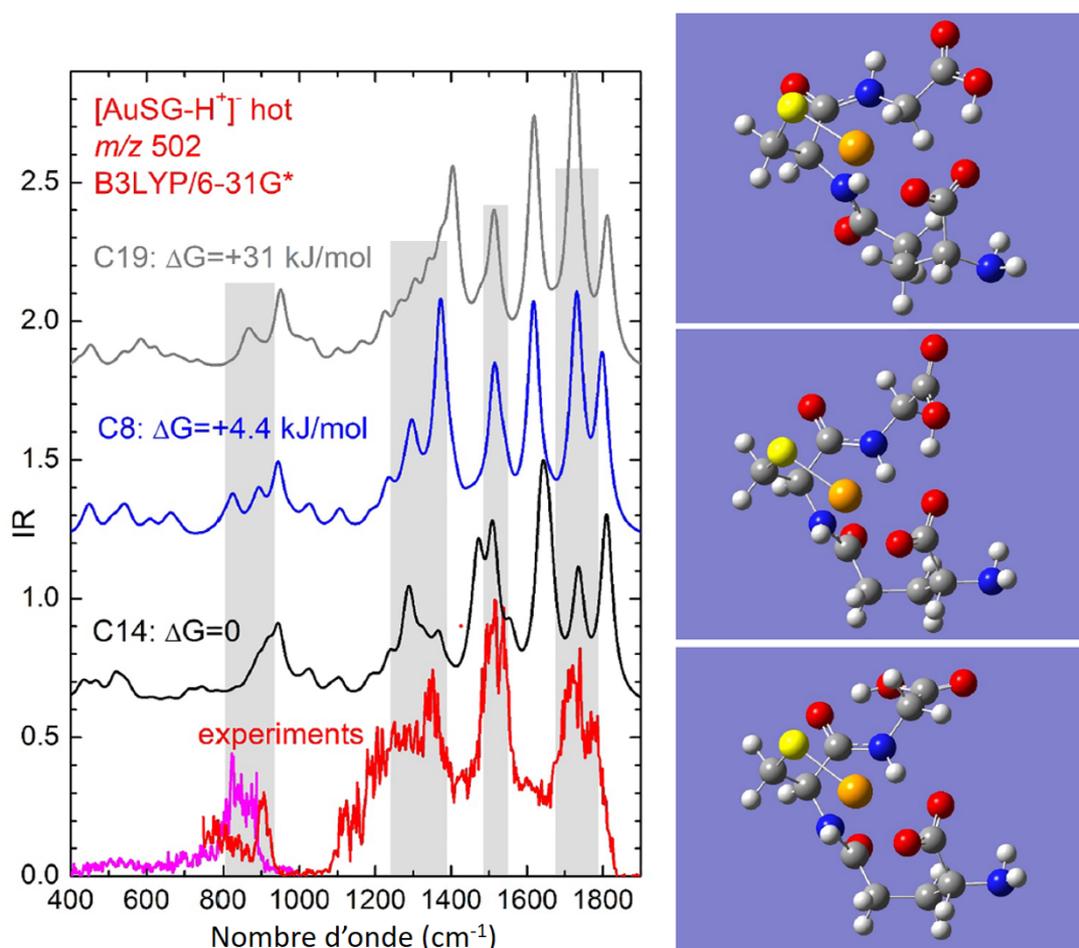


FIGURE 4.31 – Comparaison entre le spectre IRMPD expérimental (rouge et magenta) et les spectres harmoniques théoriques calculés au niveau  $B3LYP/6-31G^*$  avec un facteur d'échelle, pour les trois conformères de basse énergie des ions  $[\text{AuSG-H}^+]^-$ . À droite sont représentées (de bas en haut) les structures des conformères C14, C8 et C19.

La figure (4.31) représente le spectre IRMPD et les calculs effectués pour l'anion monochargé à  $m/z$  502. Cet ion positif est composé d'un seul atome d'or lié à un unique ligand glutathion déprotoné  $[\text{AuSG-H}^+]^-$ . Le spectre expérimental est constitué de bandes assez larges. Ces modes vibrationnels peu résolus sont dus au fait que l'ion résulte principalement du processus de CID (dissociation induite par collision) dans la source. De plus, même pour cet ion simple, il y a de nombreuses conformations d'équilibre possibles suivant la structure du ligand tripeptide qui est très flexible. Nous avons dans un premier temps, réalisé une recherche conformationnelle, avec la méthode de champ de force PM6 [117] : nous avons fait varier l'ensemble

des angles dièdres, puis nous avons regroupé tous les conformères en fonction de leur énergie et de leur structure. À partir d'une sélection d'une vingtaine de familles de basse énergie, on utilise ensuite la DFT pour effectuer des optimisations, puis on fait les calculs de fréquences dans l'approximation harmonique avec un facteur d'échelle.

Les structures des trois conformères de plus basses énergie (C14 avec  $\Delta G = 0$  kJ.mol<sup>-1</sup>, C8 avec  $\Delta G = +4,4$  kJ.mol<sup>-1</sup> et C19 avec  $\Delta G = +31$  kJ.mol<sup>-1</sup>), sont montrées sur la figure (4.31) ainsi que les calculs effectués au niveau B3LYP/6-31G\*. Les spectres simulés ont été convolués par un profil lorentzien de largeur 20 cm<sup>-1</sup>, afin de prendre en compte l'élargissement dû à la température élevée de ces ions chauds.

Les calculs en B3LYP concordent bien avec le spectre IRMPD, avec quelques divergences cependant. Les niveaux des bandes calculées à 1805 cm<sup>-1</sup>, 1730 cm<sup>-1</sup> et 1620 - 1650 cm<sup>-1</sup> sont attribuées respectivement aux modes d'élongation du carboxyle (-COOH), des deux groupes amides et du groupe carboxylate C=O. Ce dernier n'apparaît pas dans le spectre expérimental. Ensuite, sur ce même spectre, on attribue la bande calculée à 1515 cm<sup>-1</sup> au mode de pliage dans le plan de la liaison N-H et la bande située entre 1250 - 1380 cm<sup>-1</sup> au mode de pliage O-H dans le plan. Ces deux modes reproduisent assez bien les bandes expérimentales spécialement pour les deux isomères C14 et C8.

La dernière bande expérimentale très large entre 810 cm<sup>-1</sup> et 930 cm<sup>-1</sup>, est également en meilleur accord avec le spectre calculé pour l'isomère C8. Elle correspond aux modes d'agitation OH et NH<sub>2</sub>. Puisque les isomères C8 et C14 sont calculés à des énergies libres similaires (à 4 kJ/mol près), il est probable qu'ils contribuent tous deux au spectre expérimental, tandis que l'isomère C19 (et ceux à plus haute énergie) contribuent probablement peu au spectre expérimental.

La distance Au-S est calculée à 2.33Å, c'est-à-dire légèrement plus courte que la distance trouvée dans l'anion [(AuSG)<sub>10</sub>-4H<sup>+</sup>]<sup>4-</sup>. Il existe également une forte interaction entre l'atome d'or et l'un des deux atomes d'oxygène du groupe carboxylate avec des distances Au-O<sup>-</sup> qui varient entre 2.16-2.17 Å dans les isomères C8 et C14 et qui vaut 2.145 Å dans le cas de l'isomère C19. L'autre oxygène carboxylate est impliqué soit dans une liaison hydrogène N-H...O (1.88 Å en C14 et 1.99 Å en C8) et/ou dans une liaison hydrogène O-H...O (1.755 Å en C8 et 1.78 Å en C19). Pour l'unique atome d'or, la charge NPA (Natural Population Analysis) est proche de +0.2 pour les deux isomères, c'est-à-dire proche de la charge des atomes d'or dans l'isomère couronne précédent, tandis que l'atome de soufre détient toujours une charge partielle proche de -0.3, légèrement plus négative que dans le nano-agrégat, et la charge totale de -1 est à nouveau principalement détenue par le groupe carboxylate déprotoné du ligand (-0.65).

## 4.6 conclusion

Dans ce qui précède nous avons montré que les expériences de spectroscopie IRMPD sont faisables sur de grands systèmes tels que les nanoagréats métalliques ligandés (onze ou dix atomes d'or et sept à dix ligands). Ces expériences peuvent ap-

porter des informations structurales principalement sur les conformations des ligands à partir des signatures spectrales des modes vibrationnels dans la gamme entre 500 et 1800  $\text{cm}^{-1}$ . Les résultats exploités en IRMPD sont en accord avec les spectres FTIR des échantillons solides (espèces neutres) dans la même plage de fréquence. Toutefois, la spectroscopie en phase gazeuse apporte potentiellement plus d'informations sur les espèces isolées et sélectionnées en masse, en particulier sur les configurations des ligands dans la région des empreintes digitales. Les expériences récemment effectuées dans la gamme de nombre d'onde entre 400-500  $\text{cm}^{-1}$  sont en bon accord avec les calculs. Nous menons des expériences complémentaires pour tester si des spectres à plus basse fréquence (200-500  $\text{cm}^{-1}$ ) pourraient être obtenus et présenteraient des signatures qui seraient plus caractéristiques des interactions métal-ligand et métal-métal.

Nous avons également montré que les calculs en DFT avec deux fonctionnelles (B3LYP, M06L) avec des bases plutôt petites (6-31G\* et LanL2DZ) permettent une simulation convenable des spectres expérimentaux. Ces systèmes d'études sont constitués de plusieurs centaines d'atomes (environ 400 atomes) et se trouvent à la limite de faisabilité pour des simulations de spectres IR avec des méthodes de chimie quantique. Dans ce travail, nous utilisons les calculs en DFT et des calculs de fréquence harmonique avec facteur d'échelle. Les calculs de fréquence ont dû être effectués par la méthode numérique (du fait de la trop grande quantité de mémoire nécessaire pour la méthode semi-analytique habituelle du logiciel Gaussain) et durent au moins 3 mois en utilisant au moins dix processeurs sur un seul nœud.

Les calculs B3LYP/6-31G\* conduisent à des spectres simulés qui sont en bonne concordance avec les données expérimentales. Cependant, les écarts typiques entre expériences et calculs sont de l'ordre de une à quelques dizaines de  $\text{cm}^{-1}$ , c'est-à-dire du même ordre que les différences spectrales entre les isomères possibles. Cela veut dire que l'attribution d'un spectre à un isomère spécifique reste hypothétique. En ce qui concerne les calculs en M06L/LanL2DZ, nous avons confirmé que cette méthode ne permet pas de décrire le spectre IR correctement pour la région des elongations C=O et pour la région des amides entre 1400 et 1800  $\text{cm}^{-1}$ . D'ailleurs, cette conclusion est en accord avec des études théoriques sur des espèces similaires [161, 162].

D'autres travaux expérimentaux et théoriques seraient nécessaires afin de vérifier les conclusions provisoires ci-dessus et de progresser vers une meilleure description des propriétés physico-chimiques de véritables nanoparticules métal-ligand. Des données expérimentales plus précises, notamment sur des ions refroidis et à des nombres d'onde plus faibles (inférieurs à 500  $\text{cm}^{-1}$ ), avec une résolution plus élevée, devraient permettre de mieux comprendre la structure métallique et les interactions métal-ligand.



## Chapitre 5

# Étude de complexes d'inclusion entre macromolécules et principes actifs en phase gazeuse

Dans ce chapitre, nous allons voir les études structurales qu'on a réalisées sur des complexes d'inclusion entre des macromolécules comme la  $\beta$ -cyclodextrine et des principes actifs (paracétamol ou acide salicylique). Les tailles de ces complexes sont assez comparables à celles qu'on a étudiées dans le chapitre précédent en IRMPD (complexes organo-métalliques et nanoagrégats d'or). Nous présenterons dans un premier temps la technique de spectrométrie de mobilité ionique et le dispositif de l'ILM (Institut Lumière Matière) sur lequel nous avons étudié nos systèmes. Les résultats de ces recherches structurales sont ensuite comparés avec des calculs de fréquence au niveau B3LYP/6-31+G(d,p) permettant de simuler les spectres IR, ainsi qu'avec les spectres expérimentaux obtenus par IRMPD réalisée à CLIO et à FELIX.

Ces complexes sont étudiés dans le cadre de la recherche de traces de médicaments (paracétamol et acide salicylique) dans l'eau potable. Leur détection est alors un enjeu de santé publique qui motive le choix de ce système. La relation de type hôte-guest permet de modifier les caractéristiques physiques, chimiques ou biologiques de la molécule invitée. Une de ces applications consiste à fonctionnaliser des nanoparticules d'argent avec de la  $\beta$ -cyclodextrine afin de développer un capteur SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering) qui pourrait être envisagé pour la détection de traces de ces petits médicaments [163, 164].

Notre objectif est de sonder en phase gazeuse la position relative des sous-unités liées de manière non covalente dans deux systèmes : les complexes entre l'acide salicylique et la  $\beta$ -cyclodextrine et les complexes entre le paracétamol et la  $\beta$ -cyclodextrine.

## 5.1 Spectrométrie de mobilité ionique

### 5.1.1 Approche historique et théorie de la mobilité ionique

La technique de spectrométrie de mobilité ionique (IMS) utilisée actuellement dans plusieurs domaines est le fruit de nombreuses recherches théoriques et expérimentales. Parmi les premières recherches, on peut citer celles de Langevin, qui a mené des travaux sur l'ionisation des gaz et sur la théorie cinétique [165, 166]. Il a défini l'aspect collisionnel de la mobilité, et le rôle des forces attractives sur la section efficace de collision. Langevin a ainsi développé une première description des interactions ion-molécule et a décrit l'influence de ces interactions sur la mobilité.

D'autres travaux sur la diffusion de cations dans l'azote ont été faits par Mitchell et Ridler [167] dans le but d'étudier l'influence de la pression et du champ électrique sur la mobilité ionique. Ensuite, il faut mentionner les nombreuses innovations techniques (optiques ioniques, technique de vide, détection...) qui ont joué un rôle crucial dans le développement de la physique expérimentale à ce sujet.

Les études théoriques de Mason et McDaniel sur le processus de diffusion des ions en phase gazeuse sous l'action d'un champ électrique [168–170] ont permis le développement des premiers instruments de mobilité ionique qui sont à la base des appareils utilisés actuellement. Cette technique est un outil analytique de haute résolution qui permet l'étude des structures de molécules ou des complexes d'intérêt biologique [171, 172], notamment par la résolution d'isomères conformationnelles [173, 174], l'étude de complexes protéiques [175] ainsi que le repliement de protéines. Un des résultats marquant de la puissance de cette technique est obtenu en 1995 par l'équipe de D. Clemmer qui a permis de distinguer la structure secondaire du cytochrome C [176].

Lorsqu'un ion gazeux soumis à un champ électrique constant, traverse un tube de longueur finie et rempli par un gaz rare à quelques millibars de pression, il accélère jusqu'à ce qu'il entre en collision avec une molécule neutre du gaz. Cette collision se répète après un temps caractéristique (temps de libre parcours moyen). La séquence d'accélération et de collision se réalise à une vitesse moyenne constante (approximation des ions en régime de diffusion) le long du tube. La mesure du rapport de la vitesse des ions à l'amplitude du champ électrique appliqué est appelée la mobilité ionique.

Le temps de diffusion est relié à la section efficace de collision et donc indirectement à la structure de l'ion. Par exemple, si on compare le temps de diffusion pour deux conformations d'un même ion, il est évident qu'une conformation étendue dans l'espace et qui possède une section efficace de collision plus élevée qu'une autre conformation repliée, doit subir une force de friction plus importante. Par conséquent, une mesure de mobilité ionique consiste à déterminer ce temps de diffusion mis par l'ion pour traverser le tube. On obtient un temps plus grand pour la structure dépliée (voir figure 5.1).

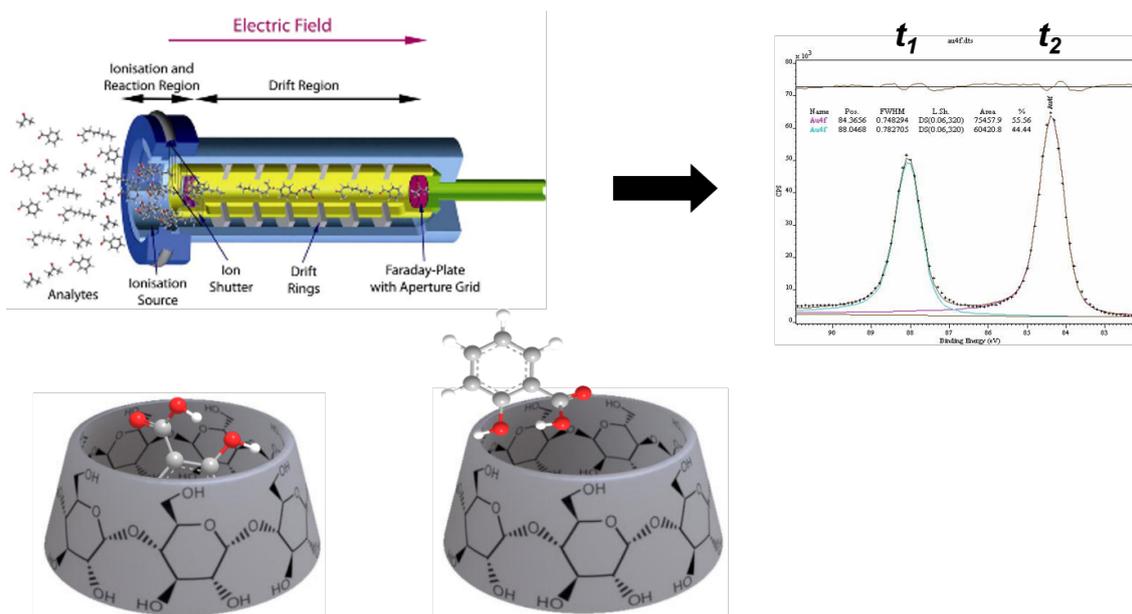


FIGURE 5.1 – Principe de la mesure de la mobilité ionique. Le temps de diffusion dépend de la section efficace de collision. Le pic arrivant à  $t_1$  est celui de la conformation la plus compacte (en bas à gauche), le deuxième pic à  $t_2$  correspond à la conformation étendue (en bas à droite).

### Théorie de mobilité ionique

En première approximation, le régime de mobilité est un régime de diffusion qui permet de décrire les collisions subies par les ions par des collisions élastiques. Dans cette approximation, on s'intéresse uniquement à l'interaction ion-gaz puisqu'on néglige les répulsions électrostatiques entre les ions et les autres collisions à plus de deux corps. Ainsi, le temps de dérive ( $t_d$ ) d'un ion à travers le tube de mobilité ionique de longueur  $l$ , ne dépend que du nombre de collision avec le gaz tampon, du champ électrique, de la température et de la pression. La vitesse moyenne de mobilité des ions ( $v_m$ ) dans le tube est proportionnelle à l'intensité du champ électrique ( $E$ ), et se définit comme suit :

$$v_m = kE \quad (5.1)$$

La constante ( $k$ ) s'appelle «coefficient de mobilité». Elle dépend de la température, de la pression et de la nature du gaz tampon. Le temps de dérive est inversement proportionnel à  $k$ . Il s'exprime par :

$$t_d = \frac{l}{kE} \quad (5.2)$$

La détermination du coefficient de mobilité ionique  $k$  se fait par une mesure précise du temps de dérive  $t_d$  dans une expérience de spectrométrie par mobilité ionique. De plus, cette constante  $k$  permet de remonter à la structure de l'ion par le biais de l'information sur la section efficace de diffusion  $\Omega$ , car ces deux grandeurs sont liées

par la relation (5.3). Ainsi, par comparaison entre cette section efficace expérimentale et une section efficace calculée sur des géométries d'essai déterminées au préalable par un calcul moléculaire, on remonte à la géométrie de l'ion.

Par ailleurs, pour obtenir une valeur exacte du temps de dérive  $t_d$  dans une mesure expérimentale, il faut éliminer le temps qui s'écoule entre l'injection des ions dans le tube et le moment où ils atteignent le détecteur du spectromètre de masse. Ainsi, on réalise plusieurs mesures de  $t_d$  en modifiant les valeurs du champ électrique afin de tracer la droite ( $l/E = k t_d$ ). Ce calibrage permet donc d'annuler le temps mort correspondant au temps de parcours des ions entre la sortie du tube et la détection, pour en déduire la valeur de la constante de mobilité  $k$  qui n'est autre que la pente de cette droite.

Une explication détaillée sur la relation entre la mobilité ionique et la section efficace de collision se trouve dans la référence [177]. En se plaçant dans l'approximation où la masse de l'ion étudié est très supérieure à la masse du gaz tampon, on peut écrire l'expression qui relie la constante de mobilité  $k$  à la section efficace de diffusion ( $\Omega$ ) :

$$k = \frac{\sqrt{18\pi}}{16} \left( \frac{1}{m} + \frac{1}{m_G} \right)^{1/2} \frac{qe}{\sqrt{k_B T} \Omega N} \quad (5.3)$$

avec  $m$  : la masse de l'ion  
 $m_G$  : masse d'une molécule de gaz tampon  
 $q$  : la charge de l'ion  
 $e$  : la charge élémentaire  
 $k_B$  : la constante de Boltzman  
 $T$  : la température effective  
 $N$  : la densité du gaz  
 $\Omega$  : la section efficace de diffusion

La température effective utilisée dans l'équation (5.3) est donnée par :

$$T = T_G + \frac{m_G v_m^2}{3k_B} \quad (5.4)$$

$T_G$  est la température du gaz tampon dans le tube, mesurée dans l'expérience (ces expressions viennent de la théorie de Viehland et Mason).

Le domaine de validité du régime de diffusion est le régime de faible champ électrique pour lequel l'énergie emmagasinée par un ion due au champ électrique entre deux collisions est négligeable devant son énergie thermique. Ainsi, dans ce domaine la vitesse est directement proportionnelle au champ électrique (relation 5.1), avec  $k$  la constante de mobilité ionique indépendant du champ  $E$ . En revanche, dans le régime de haut champ électrique, la mobilité  $k$  n'est plus une constante, mais une fonction de ce champ  $E$ . La vitesse moyenne de mobilité s'écrira comme :

$$v_m = k(E)E \quad (5.5)$$

### Différents types d'analyseurs de mobilité ionique

Il existe une grande variété d'analyseurs en mobilité ionique qui reposent tous sur le même principe physique de séparation des ions selon leur mobilité dans un gaz. Ces différents analyseurs sont classifiés en trois grandes familles : selon la séparation induite par une dispersion temporelle, spatiale ou par le piégeage et l'isolation sélective.

Le premier analyseur de séparation temporelle est le tube de dérive, qui utilise un champ électrique homogène et continu. Nous avons effectué nos mesures de mobilité ionique avec ce dispositif (voir 5.1.2). On cite également les autres types d'analyseurs, comme les tubes utilisant un champ asymétrique DIMS (Differential Ion Mobility Spectrometry), FAIMS (Field-Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry), et aussi la spectrométrie de mobilité ionique à champ électrique oscillant TWIMS (Traveling Wave Ion Mobility Spectrometry).

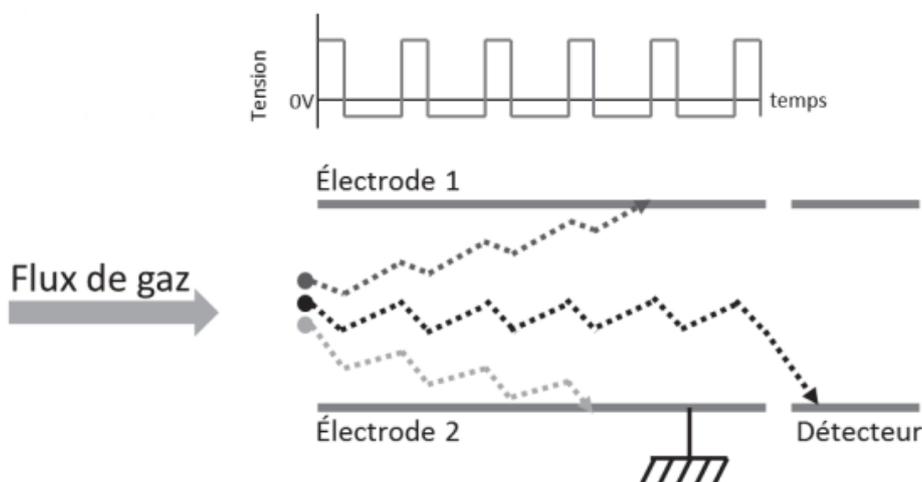


FIGURE 5.2 – Principe de la technique FAIMS.

Dans l'analyseur FAIMS, les ions entraînés par un flux de gaz traversent une région entre deux électrodes planaires (voir figure 5.2). L'une est reliée à la masse et sur l'autre est appliqué un champ oscillant asymétrique (radiofréquence RF) et une tension continue de compensation. Les ions sont donc alternativement attirés par l'une ou l'autre des électrodes (selon l'intensité du champ). Ils possèdent alors une trajectoire oscillante dans la direction transverse et leurs vitesses dépendent directement du champ appliqué. Selon l'intensité de ce champ RF appliqué et la tension continue, les ions peuvent ou pas atteindre le détecteur. Ce type d'analyseur fonctionne à pression atmosphérique et permet de mesurer des ions en modes positifs et négatifs, mais ne

permet pas de mesurer des sections efficaces de collision, en raison de l'absence de relation de proportionnalité entre la vitesse de l'ion et sa section efficace de collision dans le gaz tampon.

### 5.1.2 Dispositif expérimental à l'ILM

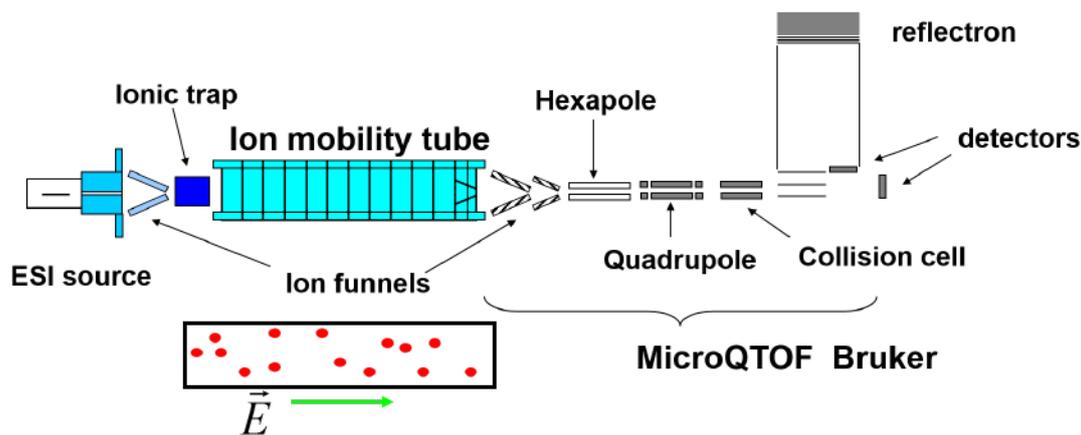


FIGURE 5.3 – Dispositif expérimental de l'expérience de mobilité ionique [178].

Pendant ma thèse, j'ai participé à des expériences de spectrométrie de mobilité ionique IMS (Ion Mobility Spectrometry) qui sont réalisées à l'institut Lumière Matière (ILM) dans le groupe de Ph. Dugourd. Ces travaux ont été financés par le GDR EMIE (Edifices Moléculaires Isolés et Environnés) dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe SpectroBio.

Le dispositif expérimental permettant de réaliser des mesures de mobilité ionique est schématisé sur la figure (5.3). La source d'ionisation utilisée pour produire les ions est une source électrospray (voir partie 1.3.2). Cette source est placée en amont du tube de mobilité, dans une zone de pression de 10 Torr et à la température de 150°C. Les ions (positifs ou négatifs) créés par l'ESI sont injectés dans le tube avec un débit de l'ordre de 100  $\mu\text{L}/\text{h}$ . Ils sont ensuite transmis par un premier funnel dans le tube de mobilité soumis à un champ électrique homogène et rempli d'un gaz tampon à la pression de 10 Torr et à la température de 300 K. Une analyse par spectrométrie de masse à temps de vol se réalise sous vide ( $5 \cdot 10^{-7}$  mbar) à la sortie du tube de mobilité. L'ensemble contient les parties suivantes : deux funnels permettant de collimater efficacement les ions pour optimiser la transmission (améliorer le rapport signal à bruit). Un hexapôle conduisant le faisceau dans un quadripôle qui joue le rôle d'un filtre de masse. Une cellule de collision et un réflectron qui permet d'augmenter la résolution en masse par la compensation de l'élargissement des pics dû à la distribution initiale d'énergie cinétique. Ce dispositif permet d'obtenir une résolution maximale de 15000.

### 5.1.3 Calcul des sections efficaces de collision

L'intérêt des calculs des sections efficaces de collision (CCS) est de pouvoir par comparaison expérience/calcul, exclure certaines structures dont les valeurs de sections efficaces sont loin des valeurs mesurées et vice versa. Pour calculer une CCS il faut tout d'abord commencer par déterminer les conformations d'équilibres de plus basses énergies de l'ion (voir partie 4.3). Ensuite on peut calculer les CCS théoriques des structures présentes à une température donnée, afin de comparer la distribution théorique de CCS avec l'expérience.

Dans nos calculs nous avons utilisé le programme Collidoscope développé par le groupe de S. A. Ewing et al. [179]. Ce logiciel open source permet de calculer la section efficace de collision d'un ion avec un gaz tampon (He ou N<sub>2</sub>) à l'aide de la méthode des trajectoires [180]. Il s'agit de calculer le transfert moyen de quantité de mouvement lors des collisions entre l'ion et l'atome de gaz diffusant. Cette quantité  $\Omega_{moy}(T)$ , dépend de la distribution de vitesses relatives accessibles à la température de l'expérience, ainsi que de l'ensemble des paramètres d'impact et des orientations possibles de l'ion. Ce calcul se traite par intégration numérique de Monte-Carlo, permettant de moyenniser toutes les trajectoires possibles de diffusion. Il existe plusieurs méthodes décrivant les collisions. Je décrirai ici uniquement la méthode du logiciel Collidoscope. Dans cette approche, on effectue un calcul des trajectoires de diffusion exacte avec un modèle utilisant un potentiel "réaliste" qui décrit les interactions de longue distance entre les atomes de l'ion et le gaz tampon. Cette description se fait par une énergie approximée par des potentiels de Lennard-Jones paramétrés sur chaque atome de l'ion, ainsi qu'un terme pour tenir compte des effets dipolaires induits (interaction ion-dipôle).

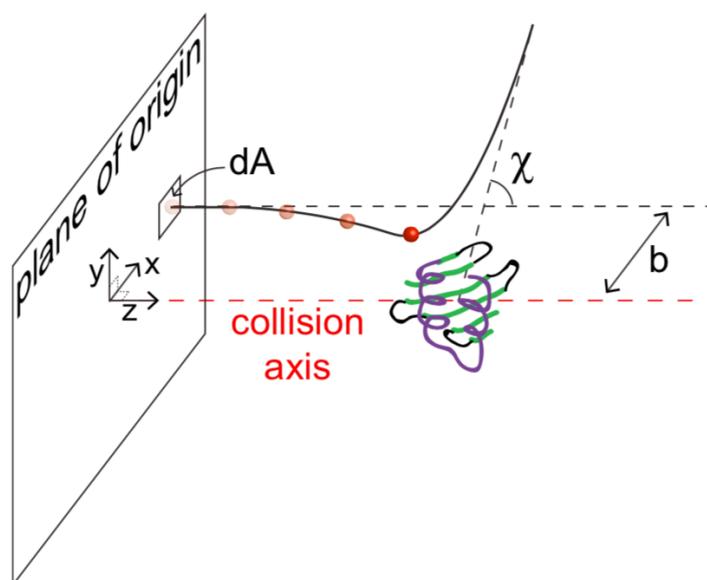


FIGURE 5.4 – Trajectoire de diffusion après collision d'une particule de gaz incidente sur un ion moléculaire depuis le plan d'origine (avec le paramètre d'impact  $b$  et  $\chi$  est l'angle de déflexion).

Ce modèle des trajectoires permet de trouver l'angle de déflexion  $\chi$  d'une molécule de gaz lors d'une collision (voir figure 5.4) en considérant des collisions élastiques, et par répétition de la simulation dans toutes les orientations possibles dans l'espace de l'ion moléculaire, on remonte à la section efficace de notre système. La précision des calculs de Collidscope est de l'ordre de 10 %. Il est capable de calculer les sections des systèmes ayant une très grande masse ( $\sim 1$  MDa) en quelques jours.

## 5.2 Sections efficaces de complexes cage moléculaire - principe actif

### 5.2.1 Motivations

L'objectif principal de ce travail est de déterminer la structure des complexes cage moléculaire - principe actif, afin de savoir s'il s'agit d'un complexe d'inclusion ou pas. La connaissance de cette information est très utile en vue de nombreuses applications qu'on rencontre pour ces systèmes de complexes d'inclusion. Parmi ces applications, on peut citer la détection de faibles quantités de principe actif dans l'eau : la cage moléculaire doit piéger le principe actif à proximité d'une nanoparticule pour pouvoir faire de la spectroscopie Raman exaltée par effet de surface. Une autre application envisageable est la vectorisation d'un principe actif.

Notre équipe a initié une collaboration avec le groupe "Nanomédecine, Biomarqueurs et Détection" (NBD) du laboratoire CSPBAT (Chimie, Structures, Propriétés de Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques) qui s'intéresse à ces complexes en phase condensée par cristallographie à rayons X et par spectroscopie RMN.

La cage moléculaire ( $\beta$ -cyclodextrine) que nous avons étudiée est l'une des familles des cyclodextrines. Bien que découverte en 1891, les cyclodextrines issues de la dégradation enzymatique de l'amylose (un polysaccharide), suscitent aujourd'hui un grand intérêt dans le domaine de la reconnaissance moléculaire. Elles sont également utilisées dans les produits agroalimentaires et pharmaceutiques faisant ainsi l'objet de nombreuses recherches scientifiques à l'heure actuelle [181, 182].

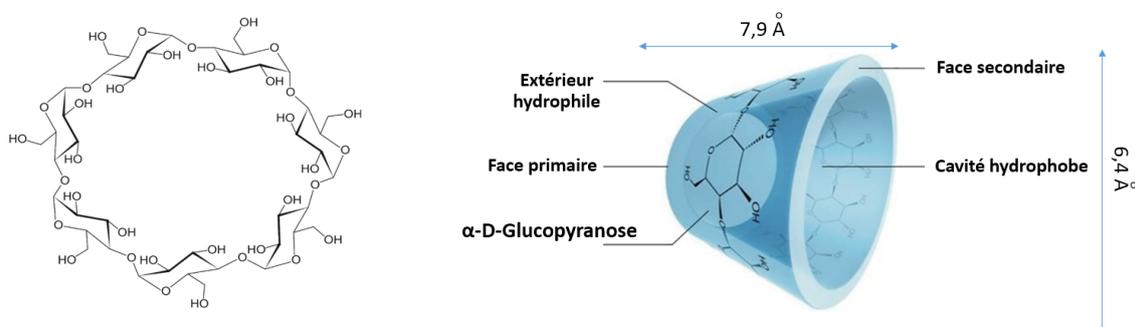


FIGURE 5.5 – Structure de la  $\beta$ -cyclodextrine.

La  $\beta$ -cyclodextrine de formule brute  $C_{42}H_{70}O_{35}$  (figure 5.5) est un oligomère cy-

clique formé de 7 chaînes glucopyranose  $C_6H_{10}O_5$  liées en *alpha*-(1,4). La structure spécifique de la cyclodextrine en forme de tore, délimitant une cavité hydrophobe (squelette carboné et oxygène en liaison éther) au centre, permet d'encapsuler diverses substances peu hydrosolubles dites molécules invitées. Tandis que la surface extérieure de ce tore contient 21 groupements hydroxyles (OH) favorisant la solubilité des cyclodextrines en milieu aqueux comme l'eau. L'association entre l'hôte (récepteur ou cage moléculaire) et l'invité (molécule cible) forme le complexe d'inclusion. Ce dernier est susceptible de modifier et/ou d'améliorer les caractéristiques physiques, chimiques et ou biologiques de la molécule encapsulée.

Nous avons donc étudié les complexes entre chacune des molécules invitées de paracétamol et d'acide salicylique (figure 5.6) avec la cage de  $\beta$ -cyclodextrine, et aussi le complexe entre l'acide salicylique avec deux  $\beta$ -cyclodextrine.

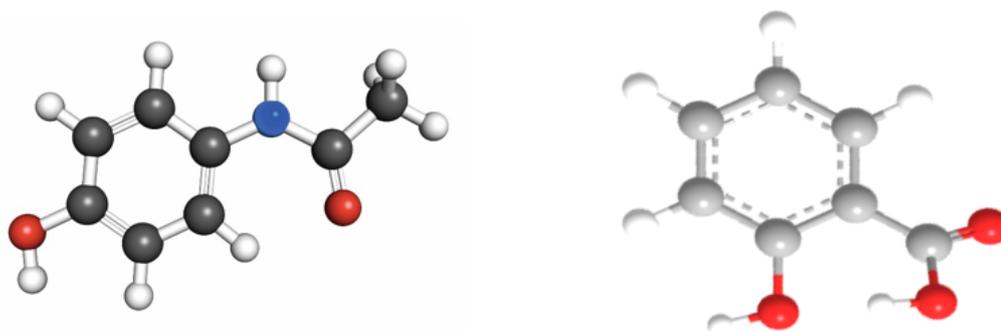


FIGURE 5.6 – Structure du paracétamol de formule  $C_8H_9NO_2$  (à gauche) et celle de l'acide salicylique  $C_7H_6O_3$  (à droite).

On a utilisé l'IMS qui est l'une des techniques de spectrométrie de masse en phase gazeuse qui permet d'étudier la structure des complexes (hôte-invité), dans le but de pouvoir distinguer la position d'un principe actif étudié par rapport à la molécule hôte (hors ou dans la cage). La mesure expérimentale de la section efficace de collision donne une information globale sur la structure, et on peut espérer que lorsque le principe actif est hors de la cage, la section efficace est plus grande que si le principe actif est dans la cage. En effet, ce type d'expérience est un outil qui permettrait de savoir si on a affaire à un complexe d'inclusion ou non. En plus, des calculs de fréquence réalisés au niveau B3LYP/6-31+G(d,p), ont permis de simuler les spectres IR de ces systèmes. Ces spectres seront comparés aux spectres IRMPD réalisés à CLIO et à FELIX. Une comparaison avec les études réalisées en phase condensée par le groupe NBD permettra d'apporter des informations sur la conversion possible des complexes d'inclusion en complexes non-spécifiques lors du passage en phase gazeuse (et vice-versa) et sur l'importance des différentes interactions pour la formation des complexes.

### 5.2.2 Résultats pour le complexe $\beta$ -cyclodextrine + paracétamol

Les mesures expérimentales ont été réalisées à l'aide du dispositif de spectrométrie de mobilité ionique de l'ILM (voir partie 5.1.2) pour déterminer la section efficace du complexe entre le paracétamol et une cage de  $\beta$ -cyclodextrine. La figure (5.7) représente la mesure expérimentale du temps d'arrivée lié à la section efficace de diffusion. La solution utilisée est un mélange de méthanol et d'eau dans une proportion ( $\frac{1}{3}, \frac{2}{3}$ ) avec une concentration de  $10^{-4}$  M. On sélectionne dans un premier tube l'ion qui nous intéresse puis on mesure sa section efficace dans un second tube. Les deux tubes mesurent la même longueur de 79 cm, et la différence de potentiel appliquée sur chacun est de l'ordre de grandeur de 500 V. On distingue sur ce graphe l'apparition de deux pics correspondant au même rapport  $m/z = 1286$ . Le premier pic est celui du dimère (deux paracétamols et deux cages de  $\beta$ -cyclodextrine) doublement protoné et le deuxième pic est celui du monomère (un paracétamol et une seule cage) simplement protoné.

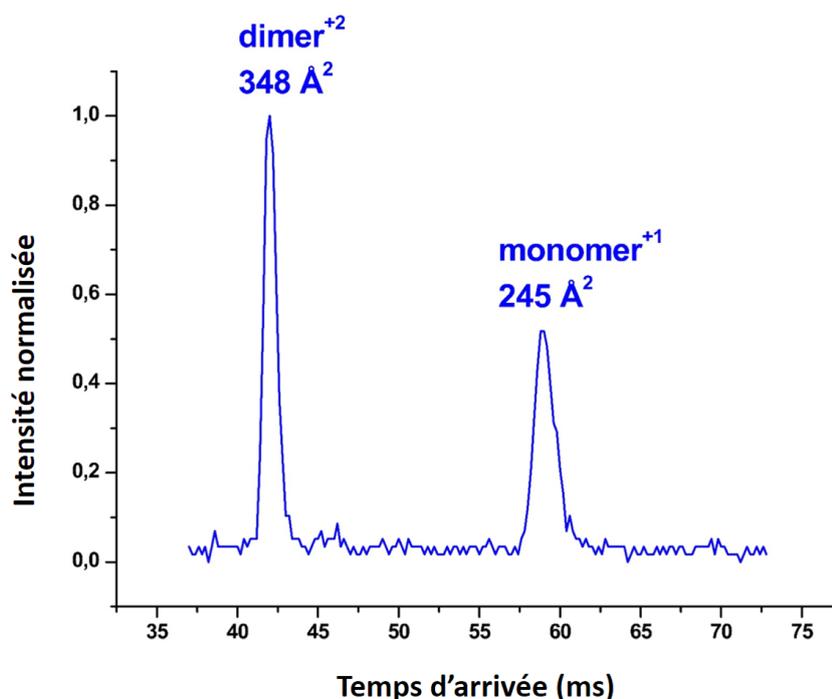


FIGURE 5.7 – Mesure de la section efficace de diffusion pour le monomère et le dimère du complexe de  $\beta$ -cyclodextrine avec le paracétamol avec le dispositif d'IMS à l'ILM.

Bien que la masse d'un dimère soit deux fois plus grande que celle du monomère, on voit son apparition pour un temps de 42 ms, plus court que celui mesuré pour le monomère qui arrive après 58 ms. En effet, la plus grande charge (+2) du dimère explique cette mesure de temps de dérive, i.e. plus grande est la charge, plus rapide est l'ion dans une zone de champ constant. Les sections efficaces de diffusion correspondantes, sont respectivement  $348 \text{ Å}^2$  et  $245 \text{ Å}^2$  pour le dimère et pour le monomère. L'incertitude de nos mesures expérimentales est de l'ordre de 2 %.

Pour comparer ces sections efficaces expérimentales à des calculs, la première étape est de déterminer des structures de plus basse énergie pour ce complexe. Étant donné la taille et la complexité de ce système, cette recherche conformationnelle n'a pas été réalisée de manière systématique. En partant de la structure optimisée de la  $\beta$ -cyclodextrine déjà déterminée en B3LYP par [183, 184], le paracétamol protoné a été placé de différentes façons dans la cage, au-dessus de la petite couronne, en-dessous de la grande couronne, et à l'extérieur le long du cône. Pour chacune de ces structures de départ, une optimisation de structure en B3LYP/6-31+G(d,p) a été lancée. Dans un second temps, des structures de départ dans lesquelles c'était la  $\beta$ -cyclodextrine qui était protonée ont été explorées. Plusieurs sites de protonation pour la  $\beta$ -cyclodextrine ont été explorés. Un proton placé sur la petite couronne conduit à une structure nettement plus basse en énergie que dans le cas des autres sites de protonation. C'est donc ce site de protonation qui a été choisi, avant de placer le paracétamol neutre en différentes positions et de lancer des optimisations, toujours en B3LYP/6-31+G(d,p).

La structure de plus basse énergie obtenue correspond à un complexe d'inclusion (voir figure 5.8), pour lequel le paracétamol est légèrement incliné dans la cage de la  $\beta$ -cyclodextrine, avec le groupement amide pointant vers la petite couronne.

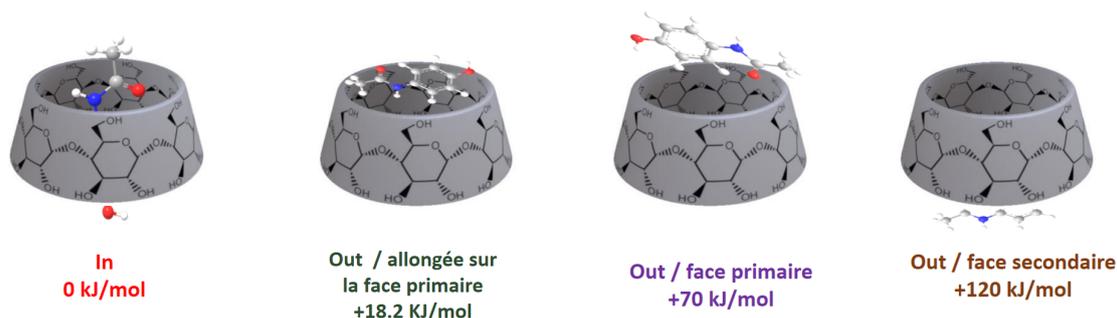


FIGURE 5.8 – Différentes structures calculées pour différents énergies en fonction de la position du paracétamol dans la cage de  $\beta$ -cyclodextrine, en allongée sur la surface primaire ou hors de la cage.

Sur la figure (5.8) est également représentée la structure de plus basse énergie pour laquelle le paracétamol est au-dessus de la petite couronne, couché sur cette petite couronne. Cette structure est légèrement plus haute en énergie (+18.2 kJ/mol par rapport à la structure la plus stable). Est ensuite représentée une structure caractéristique des situations dans lesquelles le paracétamol est au-dessus de la petite couronne (sans être couché dessus). Ces structures se trouvent plusieurs dizaines de kJ/mol au-dessus de la structure de plus basse énergie. Finalement, une structure caractéristique de celles pour lesquelles le paracétamol se trouve sous la grande couronne est représentée. Ces structures se trouvent plus d'une centaine de kJ/mol plus haut.

Nous avons calculé la section efficace de collision (avec le logiciel Collidoscope) du complexe entre la  $\beta$ -cyclodextrine et le paracétamol pour les trois premières structures

représentées sur la figure (5.8). Pour la première structure de plus basse énergie la valeur calculée de la section efficace de diffusion est de  $249 \text{ \AA}^2$ . Pour la deuxième conformation plus haute en énergie (18.2 kJ/mol), avec le paracétamol allongé sur la surface extérieure de la face primaire de l'hôte, la section efficace calculée est de  $247 \text{ \AA}^2$ . Enfin, la troisième section efficace calculée est de  $253 \text{ \AA}^2$  pour la structure où le paracétamol est au-dessus de la cage (+70 kJ/mol).

Il est donc difficile de déterminer à partir de ces sections efficaces laquelle de ces structures est présente expérimentalement. En effet, avec la précision expérimentale, la plage de section efficace possible s'étend de 240 à  $250 \text{ \AA}^2$ , ce qui est compatible avec les deux premières structures. La structure de plus grande énergie, pour laquelle le paracétamol est au-dessus de la petite couronne, semble par contre pouvoir être éliminée. La sonde globale de structure que constitue l'IMS ne nous permet donc pas de conclure sur le caractère inclusif ou non de ce complexe. La différence en section efficace entre les différentes structures envisageables est trop faible par rapport à l'incertitude expérimentale. En ne conservant que les deux structures de plus basses énergies présentées précédemment, nous avons poussé nos recherches et étudié notre système par spectroscopie IRMPD à FELIX. Les résultats des expériences ainsi que les calculs sont présentés dans la section suivante (sect. 5.3.1).

### 5.2.3 Résultats pour le complexe $\beta$ -cyclodextrine + acide salicylique

La mesure des sections efficaces de diffusion à l'aide du dispositif de l'IMS pour le complexe entre la  $\beta$ -cyclodextrine et l'acide salicylique sont représentées sur le graphe (5.9). Les deux pics correspondent au même rapport  $m/z = 1271$ . Le premier pic est celui du dimère (deux acides salicyliques et deux cages de  $\beta$ -cyclodextrine) doublement déprotonés et le deuxième pic est celui du monomère (un acide salicylique et une seule cage) simplement déprotoné.

La figure (5.10) représente les calculs de structures d'équilibre effectués pour le monomère. On montre les deux conformères de plus basses énergies. La conformation avec l'acide dans la cage de la  $\beta$ -cyclodextrine (structure à 0 kJ/mole) et la deuxième conformation de plus haute énergie (+ 9 kJ/mole) correspondant à la configuration hors cage. On note que lorsque la dispersion empirique n'est pas prise en compte dans ces calculs, la conformation dite "Out" devient la plus basse en énergie. Pour la première structure de plus basse énergie dite "In" la valeur calculée de la section efficace de diffusion est de  $247.535 \text{ \AA}^2$ . La conformation plus haute en énergie (9 kJ/mol), avec l'acide salicylique hors cage donne une section efficace calculée de  $247.492 \text{ \AA}^2$ . Les valeurs calculées sont proches de la valeur expérimentale avec une différence très légère qui ne permet pas d'attribuer une des deux structures.

## 5.3 Etude structurale par IRMPD

L'IMS seule ne donne qu'une indication du caractère inclusif ou non du complexe, sans certitude. En vue d'obtenir des informations complémentaires sur la structure de

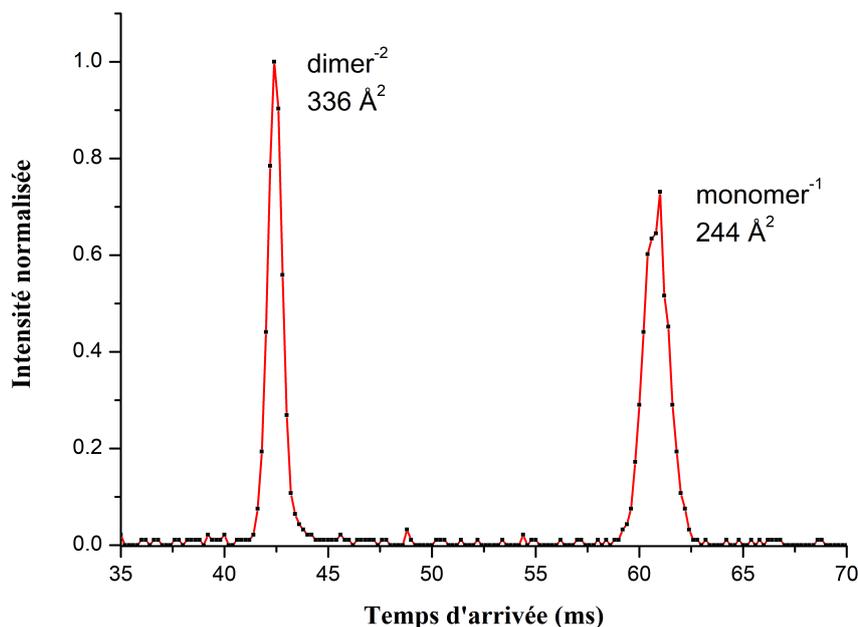


FIGURE 5.9 – Mesure de la section efficace de diffusion pour le monomère et le dimère du complexe de  $\beta$ -cyclodextrine avec l'acide salicylique avec le dispositif d'IMS à l'ILM.

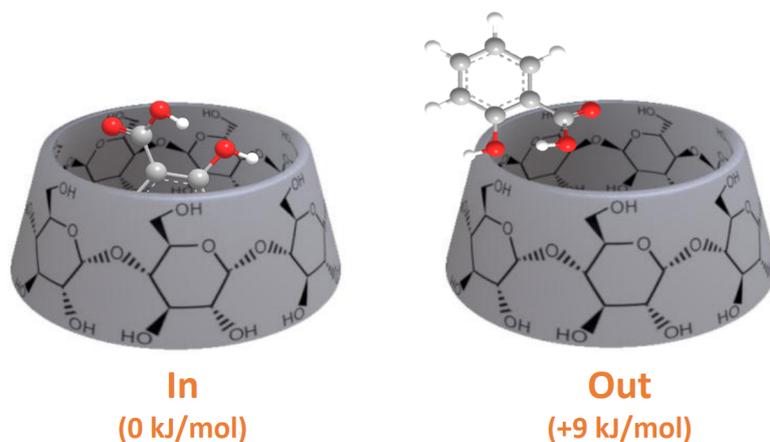


FIGURE 5.10 – Deux structures calculées pour le monomère du complexe entre la  $\beta$ -cyclodextrine et l'acide salicylique en fonction de la position de ce dernier dans la cage (conformère à 0 kJ/mol), ou hors de la cage (conformère à +9 kJ/mol).

ces complexes hôte-invité, nous avons donc réalisé des expériences de spectroscopie IRMPD, à FELIX dans la région des empreintes digitales, et à CLIO, avec un OPO, dans la région des 3 microns. Les spectres expérimentaux sont ensuite comparés à des calculs de fréquence réalisés à partir des structures optimisées précédemment, au niveau B3LYP/6-31+G(d,p), dans l'approximation harmonique.

### 5.3.1 Spectroscopie IRMPD pour le complexe $\beta$ -cyclodextrine + paracétamol

#### Spectre de masse

Le spectre de masse expérimental obtenu à CLIO pour le complexe entre la  $\beta$ -cyclodextrine et le paracétamol fragmentant sous l'effet de photons IR est représenté sur la figure (5.11). On voit sur ce spectre l'ion parent à droite ( $m/z$  1286), la perte du paracétamol qui donne la  $\beta$ -cyclodextrine protonée ( $m/z$  1135), puis les différents fragments de la  $\beta$ -cyclodextrine ( $m/z$  973 ; 811 ; 649 ; 487 ; 325) avec à chaque fois la perte de la même masse qui correspond à la perte d'un des 7 glucopyranosil composant initialement la  $\beta$ -cyclodextrine.

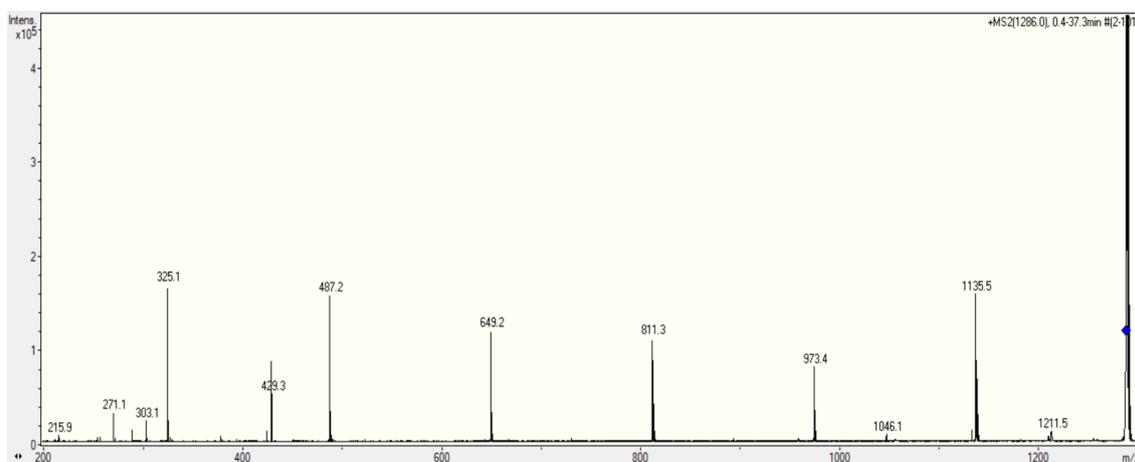


FIGURE 5.11 – Spectre de masse expérimental pour le complexe  $\beta$ -cyclodextrine + paracétamol irradié par des photons IR.

#### Région des empreintes digitales

Les spectres expérimentaux obtenus à FELIX pour le paracétamol seul, la  $\beta$ -cyclodextrine seule, et le complexe entre ces deux molécules sont représentés sur la figure (5.12). On retrouve dans le spectre du complexe des bandes qui viennent du spectre du paracétamol comme les bandes à  $830\text{ cm}^{-1}$ ,  $1510\text{ cm}^{-1}$ ,  $1650\text{ cm}^{-1}$  et d'autres qui viennent du spectre de la cyclodextrine comme les bandes situées vers  $600\text{ cm}^{-1}$ ,  $760\text{ cm}^{-1}$ ,  $1050\text{ cm}^{-1}$  et  $1150\text{ cm}^{-1}$ . Afin de pouvoir déterminer la structure du complexe, nous avons comparé son spectre expérimental avec les calculs effectués pour les deux premières structures calculées de plus basse énergies présentées précédemment (conformation à  $0\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  et  $18.2\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) en utilisant un facteur d'échelle de 0,985.

La comparaison entre le spectre expérimental et la structure avec le paracétamol dans la cage est représentée sur la figure (5.13). Plusieurs bandes d'absorption expérimentales semblent être en bon accord avec les bandes simulées pour cette conformation. Parmi ces bandes, on repère le mode très intense correspondant à l'élongation C-O autour de  $1000 - 1150\text{ cm}^{-1}$ . Dans cette région l'intensité a été divisée par un facteur de deux. L'accord est également bon dans la région au-dessus de  $1200\text{ cm}^{-1}$  pour

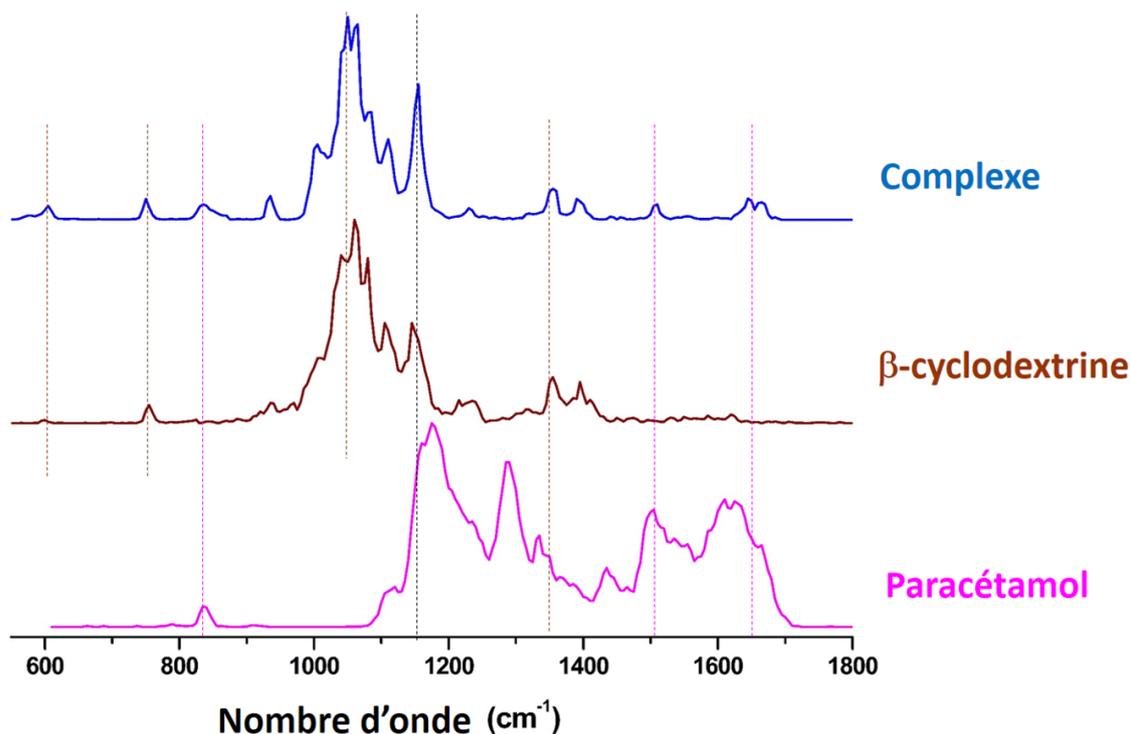


FIGURE 5.12 – Spectres IRMPD obtenus à FELIX pour le paracétamol (spectre fuchsia), la  $\beta$ -cyclodextrine (spectron marron) et le complexe entre les deux molécules (spectre bleu).

les bandes sélectionnées en jaune, sauf que c'est décalé vers le bleu dans le spectre simulé pour les 2 zones. Pour les petits nombre d'ondes en dessous de  $1000\text{ cm}^{-1}$ , l'accord reste correct (bande d'élongation C-C et déformation hors plan O-H), à l'exception du mode papillon ( $850\text{ cm}^{-1}$ ) observé expérimentalement et qui correspond à la vibration de déformation du groupe phénol, ceci n'apparaît pas dans le spectre calculé. Enfin il y a un léger désaccord dans la forme du pic observé à  $600\text{ cm}^{-1}$  et qui correspond au mode (O-H) de vibration de déformations hors plan.

Le spectre infrarouge calculé pour la structure avec le paracétamol couché sur la petite couronne de la  $\beta$ -cyclodextrine est représenté en vert sur la figure (5.14). La plupart des modes sont en accord avec l'expérience. En particulier, cet accord semble meilleur dans la région située entre  $600$  et  $1000\text{ cm}^{-1}$ , mais moins bon dans la région de  $1200$  à  $1800\text{ cm}^{-1}$ . Par rapport à la structure précédente ( $0\text{ kJ/mol}$ ) le mode O-H vers  $600\text{ cm}^{-1}$  est en meilleur accord avec le spectre IRMPD. Le mode papillon à  $850\text{ cm}^{-1}$  ainsi que les bandes entre  $900$  et  $1550\text{ cm}^{-1}$  sont tous en bon accord avec le spectre expérimental. Le mode d'élongation C=O est décalé vers le bleu par rapport à celui de la structure précédente. La position du paracétamol en surface de la cage rend ce mode de vibration plus libre.

En conclusion, malgré le fait que la structure la plus haute en énergie (structure Out) semble avoir légèrement plus de concordance avec le spectre mesuré en IRMPD, on ne peut pas à ce stade de comparaison éliminer la possibilité que les 2 structures peuvent participer au spectre expérimental.

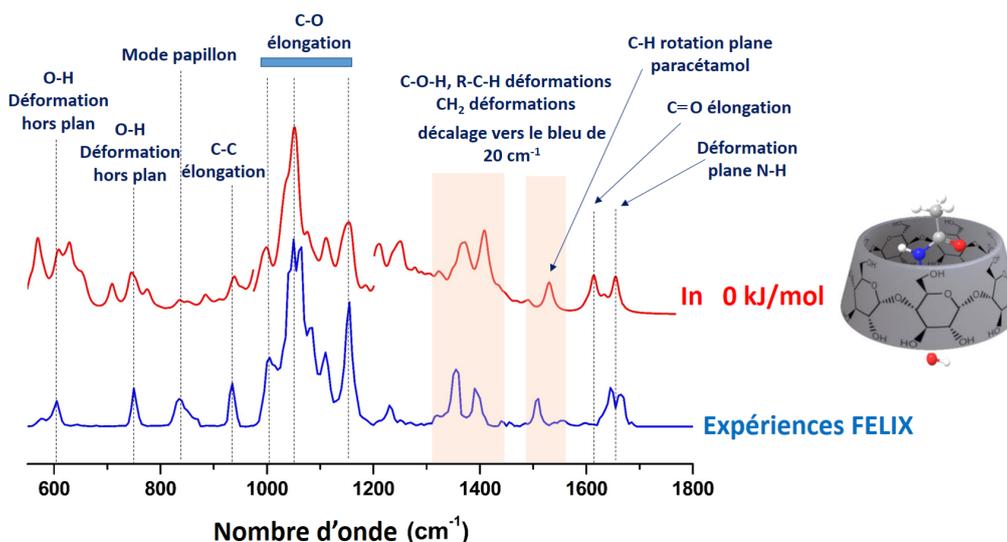


FIGURE 5.13 – Spectre IRMPD (spectre bleu) obtenu à FELIX pour le complexe entre la  $\beta$ -cyclodextrine et le paracétamol, en comparaison avec le spectre calculé pour la structure de plus basse énergie (conformation pour lequel le paracétamol est placé dans la cage).

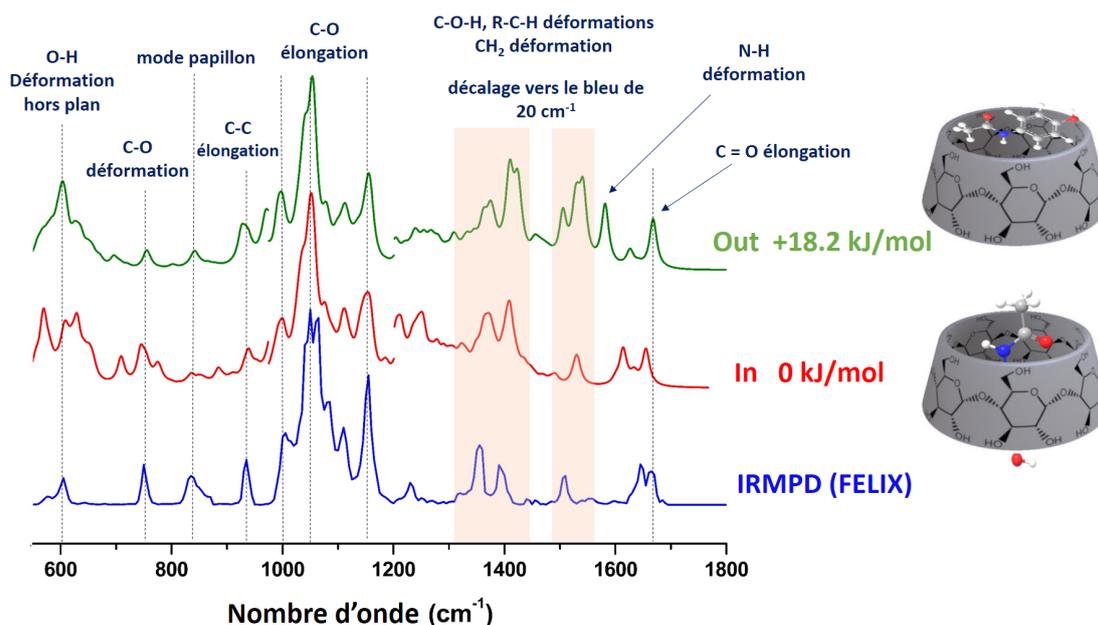


FIGURE 5.14 – Spectre IRMPD (spectre bleu) obtenu à FELIX pour le complexe entre la  $\beta$ -cyclodextrine et le paracétamol en comparaison avec le spectre calculé (spectre vert) pour la structure de plus haute en énergie (conformation pour laquelle le paracétamol est couché sur la surface primaire de la cage). Le spectre rouge correspond à la conformation de plus basse énergie discuté sur la figure précédente.

Dans la mesure où l'étude de la structure globale par IMS et l'étude structurale par IRMPD ne nous permettent pas de conclure sur le caractère inclusif ou non de ce complexe hôte-invité, nous avons réalisé des expériences complémentaires à CLIO dans la région des 3 microns, avec un laser OPO.

Région des 3  $\mu\text{m}$ 

Nous avons réalisé des études complémentaires sur notre système de  $\beta$ -cyclodextrine et de paracétamol à l'aide d'un OPO (à CLIO) pour sonder la région des 3  $\mu\text{m}$ , afin d'obtenir des informations supplémentaires sur la conformation adoptée par le complexe. Le spectre expérimental, ainsi que les deux spectres calculés avec un facteur d'échelle de 0,955 pour les deux structures discutées précédemment, sont représentés sur la figure (5.15). Cette zone du spectre infrarouge de plus haute fréquence est caractéristique des liaisons d'élongations O-H. En ce qui concerne les O-H libres de la face primaire ou secondaire, les modes calculés sont en bon accord avec la mesure expérimentale ( $3620\text{ cm}^{-1}$ ). Pour les modes de vibration des O-H liés, qui sont plus bas en énergie, l'accord est beaucoup moins bon. La présence de ces multiples bandes O-H dans les spectres calculés rend difficile la comparaison avec la large bande expérimentale situé vers  $3490\text{ cm}^{-1}$ .

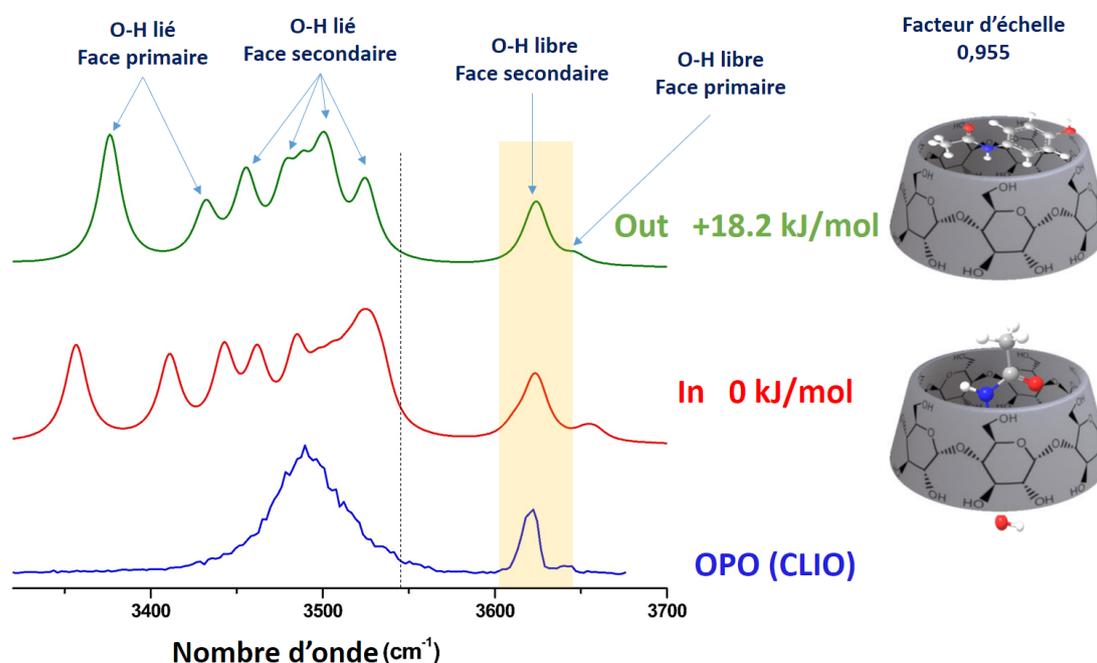


FIGURE 5.15 – Spectre IRMPD (spectre bleu) du complexe entre la  $\beta$ -cyclodextrine et le paracétamol obtenu à l'aide de l'OPO à CLIO (10 Hz, 100 mW). Les spectres calculés pour les deux structures de plus basse énergie sont représentés respectivement en rouge et vert.

Les spectres calculés présentent tous les deux plusieurs bandes qui ne sont pas présentes dans le spectre expérimental. Cependant, les calculs harmoniques de ces modes ne sont pas très fiables, notamment dans le cas où il y a des protons partagés, ce qui est le cas pour le réseau de liaison H de la petite couronne, réseau avec lequel interagissent les hydrogènes portés par l'azote et le groupe carboxyle du paracétamol. Il est donc probable que le mauvais accord observé soit principalement lié à cette limite des calculs. Des calculs anharmoniques sont pour le moment peu envisageables car beaucoup trop lourds, et, en définitive, cette région des 3 microns ne nous permet pas non plus de conclure sur le caractère inclusif ou non de ce complexe.

### 5.3.2 Spectroscopie IRMPD pour le complexe $\beta$ -cyclodextrine + acide salicylique

Un autre complexe d'inclusion qu'on a étudié est celui de l'acide salicylique avec la  $\beta$ -cyclodextrine. Bien que la taille d'une molécule d'acide salicylique soit un peu plus petite que celle du paracétamol, l'étude de ce complexe représente un plus grand challenge, du fait de la difficulté d'isoler le monomère de ce complexe. En effet, on observe dans le spectre de masse (figure 5.16) après ionisation par une source ESI, 4 pics principaux correspondant à la cage de  $\beta$ -cyclodextrine ( $m/z$  1133), le complexe (1 :1) entre la cage et l'acide salicylique simplement déprotoné à  $m/z$  1271.5 et les deux complexes deux fois déprotonés chacun et mesurés à  $m/z$  1202 pour le complexe (1 :2) (1 acide salicylique et 2  $\beta$ -cyclodextrines) et  $m/z$  635.2 pour le complexe (1 :1) (spectre bleu foncé). L'apparition de dimères (2 cages de  $\beta$ -cyclodextrine et 2 acides

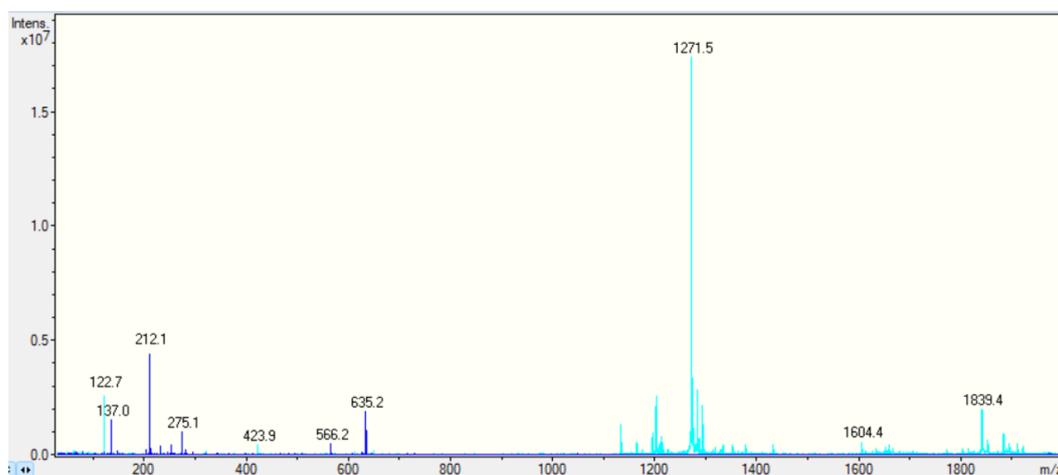


FIGURE 5.16 – Superposition de deux spectres de masse pour le complexe  $\beta$ -cyclodextrine + acide salicylique : l'un obtenu avec une optimisation vers  $m/z$  500 (bleu foncé), l'autre obtenu avec une optimisation à  $m/z$  1200 (bleu clair).

salicyliques) doublement déprotonés à la même masse et au même  $m/z$  que celle du complexe (1 : 1), sous forme d'un pic de faible intensité (figure 5.17), rend la tâche d'isolation du monomère difficile pour ce système. En cherchant à supprimer ce dimère par CID par exemple, en ré-isolant ensuite le monomère par la suite, le signal devient trop faible pour que l'obtention d'un spectre IRMPD soit envisageable. Les spectres obtenus comportent donc une légère contribution du dimère aux bandes observées.

La figure (5.18) montre les spectres IRMPD obtenus à FELIX pour l'acide salicylique ( $m/z = 138$ ), pour la cage de  $\beta$ -cyclodextrine ( $m/z = 1133$ ) et pour le complexe simplement déprotoné entre ces deux molécules. Afin de pouvoir déterminer la structure de ce complexe en phase gazeuse, nous avons comparé le spectre expérimental avec les calculs effectués pour les deux premières structures d'équilibre calculées et citées ci-dessus (conformation à 0 kJ/mole et 9 kJ/mole). Les deux calculs de DFT reproduisent assez bien le spectre expérimental. Un meilleur accord entre la conformation In (0 kJ/mole) et le spectre IRMPD, qui reproduit mieux les deux bandes à  $1560\text{ cm}^{-1}$  et  $1610\text{ cm}^{-1}$  nous mène à la conclusion que c'est la conformation avec

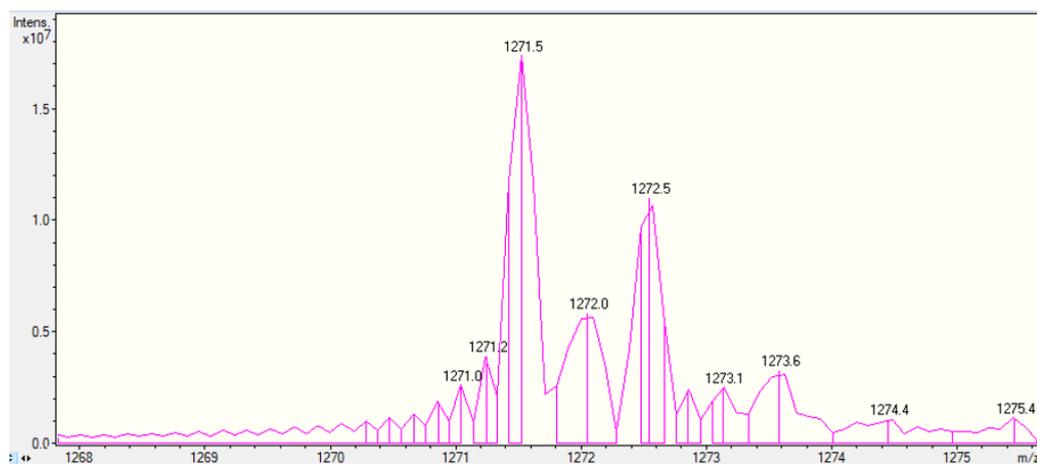


FIGURE 5.17 – Spectre de masse expérimental de la distribution de masse isotopique du complexe  $\beta$ -cyclodextrine + acide salicylique à  $m/z$  1271.5

l'acide salicylique dans la cage (qui est la conformation de plus basse énergie) qui est présente expérimentalement.

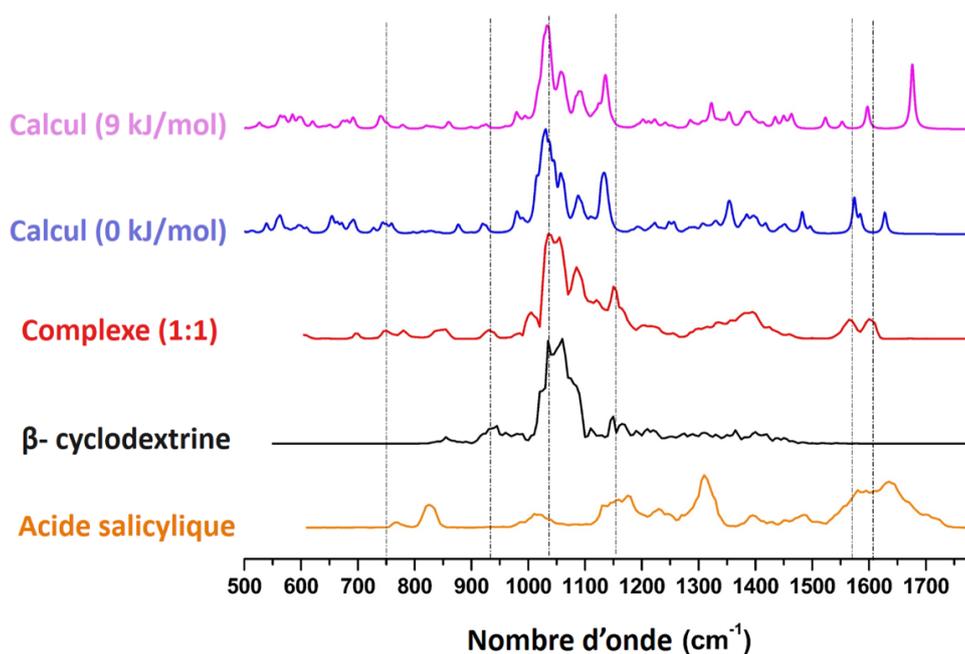


FIGURE 5.18 – Spectre IRMPD de l'acide salicylique seul (spectre orange), de la  $\beta$ -cyclodextrine (en noire), et du complexe (1 :1) entre les deux (en rouge), en comparaison avec les spectres calculés pour les deux conformations (In) et (Out).

## 5.4 Perspectives d'étude de complexes d'inclusion

### 5.4.1 Complexe (2 :1) entre la $\beta$ -cyclodextrine et l'acide salicylique doublement déprotoné ( $m/z = 1202$ )

L'étude de ce système présente un intérêt en terme de vectorisation. Actuellement, les doses de principe actif prescrites sont bien souvent très élevées par rapport à la quantité de principe actif agissant réellement dans l'organisme, du fait d'une mauvaise vectorisation. Encapsuler le principe actif pour cibler la zone où il doit agir permettrait de réduire les doses prescrites. Expérimentalement, ce système est plus simple à étudier que les précédents, car un seul état de charge est présent. En termes de calculs, la taille étant plus grande, des calculs menés au même niveau de précision que précédemment sont pour le moment peu envisageables. On peut envisager de tester la validité de méthodes QM/MM sur les complexes (1 :1) étudiés précédemment, pour pouvoir les appliquer ensuite à ce système de plus grande taille.

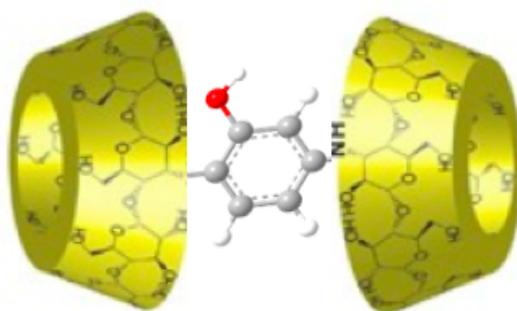


FIGURE 5.19 – Complexe (2 :1) montrant l'encapsulation d'une molécule d'acide salicylique entre deux cage de  $\beta$ -cyclodextrine.

### 5.4.2 Recherche conformationnelle par une approche de DFTB

La grande taille des systèmes constitués de plusieurs centaines d'atomes comme dans le cas des complexes d'inclusion décrits ci-dessus, limite considérablement les possibilités d'exploration systématique de la surface d'énergie potentielle par des méthodes de dynamique moléculaire DFT. Nous avons entamé une nouvelle collaboration avec Aude Simon du Laboratoire de Chimie et Physique Quantiques pour étudier ces système par l'approche de DFTB (Density Functional based Tight Binding), qui permettrait éventuellement d'aller vers l'étude des complexes (2 :1) et (2 :2).

## 5.5 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons expliqué brièvement le principe de la spectrométrie de mobilité ionique (IMS), ainsi que les méthodes de détermination de la structure

des systèmes étudiés par cette technique en mesurant la section efficace de diffusion et en la comparant à des calculs théoriques réalisés par le logiciel Collidoscope. Parmi les différents appareils de mobilité ionique existants nous avons effectué des mesures expérimentales à l'aide du dispositif de l'équipe de Philippe Dugourd de l'ILM pour étudier des complexes d'inclusion entre des principes actifs (paracétamol, acide salicylique) et les cages moléculaires de  $\beta$ -cyclodextrine.

Nous avons réalisé la spectroscopie IRMPD en phase gazeuse à CLIO (France) et à FELIX (pays Bas) pour apporter des informations supplémentaires dans le cas où l'IMS ne permettait pas de déterminer le caractère inclusif des complexes étudiés. Ainsi, l'IRMPD a permis de déterminer la structure adoptée par certains complexes comme le complexe (1 :1) entre la  $\beta$ -cyclodextrine et l'acide salicylique en comparant les spectres expérimentaux avec les spectres calculés en DFT. Des nouveaux calculs (en DFTB) sont en cours de réalisation dans le cadre d'une nouvelle collaboration afin d'améliorer l'exploration de la surface d'énergie potentielle et d'apporter des informations sur les complexes (2 :1) et (2 :2) qui sont très coûteux en termes de calculs.



# Conclusion générale

Au sein de l'équipe BMS du laboratoire de physique des lasers (LPL), mon travail a porté sur le développement d'une nouvelle source de mise en phase gazeuse. Cette source unique en France est basée sur un processus de désorption laser de microgouttelettes sous vide. L'objectif final de ce développement est à la fois de pouvoir isoler en phase gazeuse des biomolécules de la manière la plus douce possible afin de préserver leur structure native, mais aussi d'étudier à l'échelle moléculaire les effets de dommages induits par l'irradiation de ces biomolécules.

Au début de ma thèse le dispositif expérimental permettait de répondre au premier objectif : la désorption laser de gouttelettes générées sous un vide primaire à 300 mbar, présentait un caractère doux de mise en phase gazeuse. Ceci était particulièrement mis en évidence par la désorption de molécules d'intérêt biologique telles que la vancomycine et la bradykinine, mais aussi par l'observation en phase gazeuse de complexes non covalents, tels que celui formé entre la vancomycine et un tripeptide. L'utilisation au quotidien de cette source était cependant ardue, du fait d'une faible stabilité et d'un manque d'accessibilité à des parties vitales du dispositif. Mes travaux de recherche au sein de l'équipe ont eu pour but de modifier et d'optimiser le dispositif pour permettre un fonctionnement plus stable de la source et pour atteindre le deuxième objectif, celui d'une source opérationnelle pour étudier les effets de l'endommagement.

Pour ce faire, j'ai modifié le dispositif en passant le générateur de gouttelettes d'une enceinte sous vide primaire à la pression atmosphérique. Ce changement a rendu plus facile la manipulation du générateur de gouttelettes, sur lequel il faut intervenir régulièrement. De plus, ce changement nous a permis de travailler avec des gouttes contenant de l'eau comme solvant (ce qui était impossible auparavant du fait de la valeur de la pression de vapeur saturante de l'eau). Ceci est un avantage pour les études d'endommagement, qui étaient inenvisageables dans le montage précédent car les solvants utilisés étaient peu pertinents d'un point de vue biologique et ne permettaient pas la migration de radicaux libres. Cette modification a nécessité le rajout d'un nouvel étage de pompage différentiel à l'expérience, mais également la conception de pièces de tailles et de géométries différentes afin de répondre à la problématique du transfert de la goutte depuis la pression ambiante jusqu'à un vide poussé ( $10^{-6}$  mbar) de la manière la plus stable et la plus rapide possible pour éviter la solidification totale du système étudié.

Un transfert stable des gouttes sous vide avec les configurations réalisées à partir d'écorceurs (commerciaux ou faits maison) espacés est très complexe du fait du passage de la pression atmosphérique à un vide poussé. Les différentes configurations

que j'ai testées nous ont conduit vers un montage plus compact, qui ne permet pas de visualiser la trajectoire des gouttes mais qui permet de réduire leur parcours et de simplifier leur guidage.

En plus du développement instrumental, j'ai effectué des simulations numériques avec le logiciel SIMION pour obtenir des informations sur le phénomène de désorption. J'ai simulé notre spectromètre de masse par temps de vol avec le dispositif d'extraction retardée. J'ai montré en simulant une grande distribution de vitesses initiales avec différentes orientations pour les anions de vancomycine de même masse/charge que la transmission est maximale pour les ions qui possèdent une faible composante de vitesse perpendiculaire à l'axe de détection. J'ai étudié la transmission du dispositif pour de nombreuses directions d'éjection. Modifier expérimentalement l'orientation du laser, tout en connaissant les valeurs de ces transmissions pour les différentes directions, permettrait d'obtenir des informations sur le caractère plus ou moins anisotrope de la désorption et sur la manière dont les ions sont désorbés. Ces études de dépendance angulaire de la transmission montrent également l'importance d'utiliser un piège pour collecter efficacement les ions désorbés et pour obtenir une meilleure résolution.

Enfin, j'ai expliqué comment l'extraction retardée avec une durée d'extraction courte (1  $\mu$ s ou moins) pourrait permettre de déterminer certaines caractéristiques de la désorption telles que les énergies des ions éjectés par exemple. Ceci se ferait par une comparaison entre les distributions de temps de vol expérimentales et celle d'un spectre simulé via une distribution d'énergie large qui couvre une grande gamme de vitesses.

Parallèlement, j'ai eu l'opportunité de participer à des expériences de spectroscopie IRMPD à CLIO (France) et à FELIX (pays Bas) pour étudier de grands systèmes tels que les complexes organo-métalliques (1 ou 2 atomes métalliques avec 2 à 5 ligands bidentates d'acétyléacétate) et des nanoagrégats métalliques ligandés (onze ou dix atomes d'or et sept à dix ligands). Ces expériences en phase gazeuse ont permis d'apporter des informations structurelles principalement sur les conformations des ligands à partir des signatures spectrales des modes vibrationnels dans la gamme entre 500 et 1800  $\text{cm}^{-1}$ . Les résultats obtenus montrent un bon accord avec les spectres FTIR des échantillons solides (espèces neutres) dans la même plage de fréquence. Toutefois l'IRMPD en phase gazeuse donne potentiellement plus d'informations structurelles sur les espèces isolées et sélectionnées en masse. Nous avons montré aussi que les calculs en DFT avec deux fonctionnelles (B3LYP, M06L) dans des ensembles de base plutôt petits (6-31G\* et LanL2DZ) permettent une simulation convenable des spectres expérimentaux pour ces grands systèmes qui se trouvent à la limite de faisabilité pour les simulations de spectres IR de haute précision avec des méthodes de chimie quantique.

Les dernières expériences que j'ai réalisées durant ma thèse étaient des expériences de spectrométrie de mobilité ionique (IMS) au sein de l'équipe de Philippe Dugourd à l'ILM. L'utilisation de l'IMS comme choix complémentaire à la spectroscopie IRMPD nous a permis d'étudier la structure globale des complexes d'inclusion entre des macromolécules ( $\beta$ -cyclodextrine) et des principes actifs (le paracétamol ou

l'acide salicylique). La comparaison entre les sections efficaces de collision expérimentales et celles calculées avec le logiciel Collidoscope pour les conformations d'équilibre de plus basse énergie obtenues au niveau B3LYP/6-31+G(d,p) nous a permis d'écartier certaines conformations dont les valeurs de sections efficaces sont trop éloignées des valeurs expérimentales. Pour les conformations sélectionnées, nous avons réalisé des expériences de spectroscopie IRMPD qui ont permis, en comparaison avec les spectres IR calculés, de déterminer la structure du monomère déprotoné entre la  $\beta$ -cyclodextrine et l'acide salicylique. Cette même procédure n'a pas permis de trancher sur le caractère inclusif du complexe (1 :1) entre la  $\beta$ -cyclodextrine et le paracétamol pour lequel l'accord entre les différents spectres IR était moins déterminant. Nous avons réalisé, pour ce dernier système, des expériences supplémentaires dans la région des 3  $\mu\text{m}$  avec l'OPO de CLIO, dans l'espoir que des signatures plus spécifiques soient obtenues. Ces spectres sont en cours d'interprétation, mais la présence de protons partagés rend délicate la comparaison avec les calculs.

Ces travaux se poursuivent avec l'étude des complexes entre 2 cyclodextrines et une molécule d'acide salicylique qui pourraient être utilisés à des fins de vectorisation.

Ce manuscrit se termine par une annexe sur la perspective d'irradiation des biomolécules. La source de gouttelettes que j'ai contribué à développer permettra ultérieurement l'irradiation de la gouttelette par un faisceau d'ions lors de sa chute sous vide. Ceci permettra des études de chimie radicalaire, et nous souhaitons notamment rajouter des radio-sensibilisateurs de type nanoparticule d'or dans nos microgouttelettes pour étudier l'influence des effets d'environnement sur le taux d'endommagement. Nous disposons actuellement d'une source d'ions commerciale. J'ai installé dans une enceinte sous vide le système d'optique ionique qui a été développé par Aditya Agnihotri lors de son post-doctorat au CIMAP et qui permet de collimater les ions afin d'irradier la gouttelette durant sa chute avant la désorption. J'ai effectué les premiers tests de vide et visualisé le plasma créé par la source.



# Annexe A

## Perspectives : Irradiation des biomolécules et Endommagement

### A.1 Effets des radiations ionisantes sur le vivant

L'homme est soumis en permanence aux radiations ionisantes. Ces rayonnements sont d'origine naturelle (rayonnements cosmiques du soleil) ou d'origine artificielle (faisceaux d'électrons, de protons ou d'ions lourds) comme les radiations utilisées aujourd'hui dans le domaine médical pour le traitement des tumeurs. D'ailleurs, notre propre corps émet aussi des rayonnements puisqu'il contient du carbone  $^{14}\text{C}$  et du potassium  $^{40}\text{K}$  qui sont naturellement radioactifs.

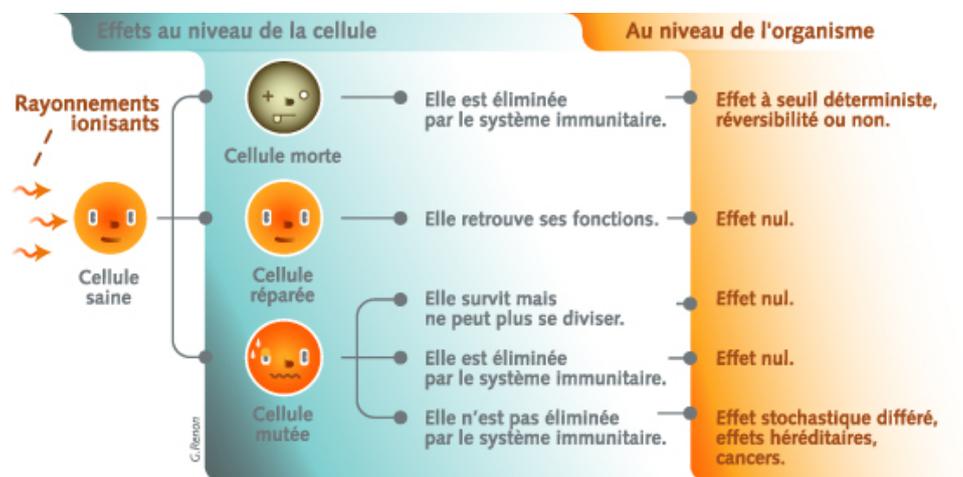


FIGURE A.1 – Effets des radiations ionisantes sur l'organisme vivant (photo tirée du site du CEA).

L'exposition prolongée aux radiations ionisantes peut provoquer des effets nocifs sur l'organisme vivant selon le taux d'irradiation. À l'issue d'une irradiation ionisante, une cellule biologique se retrouve, à l'échelle moléculaire, dans l'une des trois situations suivantes : la mort cellulaire due à la destruction du matériel génétique (ADN), une réparation correcte ou une mutation à cause d'une mauvaise réparation.

Au niveau de l'organisme entier, ces effets ionisants sont classés en deux grandes parties : les effets obligatoires (déterministes), liés à la mort cellulaire et les effets stochastiques (aléatoires), déclenchés par les mutations qui pourront entraîner certains cancers (figure A.1).

Certaines techniques de traitements contre le cancer utilisant des particules ionisantes semblent être des méthodes très prometteuses. Dans le cas des méthodes de radiothérapie conventionnelles, l'absorption de la dose passe d'abord par un maximum (crête de Tavernier) avant de décroître exponentiellement avec la profondeur de pénétration des photons dans un tissu. A l'inverse, les radiations par des ions permettent un dépôt localisé de l'énergie dans la zone tumorale. Cette zone localisée est définie par le "pic de Bragg" [185] dont la position dépend de l'énergie cinétique initiale des ions. Toutefois, les origines physico-chimiques des dommages induits sur les cellules par les faibles doses présentes autour de ce dépôt local d'énergie ne sont pas bien déterminées. Par conséquent, il est important d'étudier l'effet d'endommagement de ces radiations pour bien comprendre et maîtriser les nouvelles techniques de traitement.

## A.2 Endommagement : effets directs et effets indirects

Nous avons vu dans la partie précédente que les effets globaux (au niveau de l'organisme vivant en entier) des radiations ionisantes sont déterministes ou aléatoires. Ces deux effets proviennent (à l'échelle de la cellule biologique) des effets directs et des effets indirects de l'endommagement par irradiation (figure A.3).

On appelle "effets directs" tous les effets liés à l'interaction directe entre le rayonnement primaire et la biomolécule. Ces effets ont été étudiés depuis longtemps afin de déterminer les phénomènes responsables de l'endommagement par une forte énergie des ions sur une cellule vivante. Les "effets indirects" d'endommagement sont également responsables des dégâts survenus sur l'ADN. Il sont dus à l'interaction entre la biomolécule et les électrons libres, les ions lents simplement chargés ou les autres espèces radicalaires issues de l'irradiation (radiolyse) du milieu environnant la biomolécule, qui est constitué majoritairement d'eau (figure A.3).

La majorité des travaux qui sont réalisés en irradiant des cellules ou des brins d'ADN en solution montrent, avec des analyses par des méthodes biochimiques que la majeure partie des dégâts résulte de l'endommagement de la molécule d'ADN par des cassures simples et doubles brins. A. Chetioui et al. ont mis en lumière l'origine des cassures des brins d'ADN conduisant à des aberrations chromosomiques, survenues suite à une ionisation en couche interne suivie d'une cascade Auger [187–189]. Le groupe de L. Sanche a montré qu'un processus d'attachement électronique dissociatif, dû à la présence d'électrons d'énergie bien inférieure à celle d'ionisation de la molécule d'ADN, était responsable de cassures simples et doubles brins [190].

Lors des expériences *in vivo* visant à déterminer les dommages par irradiation des biomolécules, nous avons accès directement aux conséquences biologiques observables.

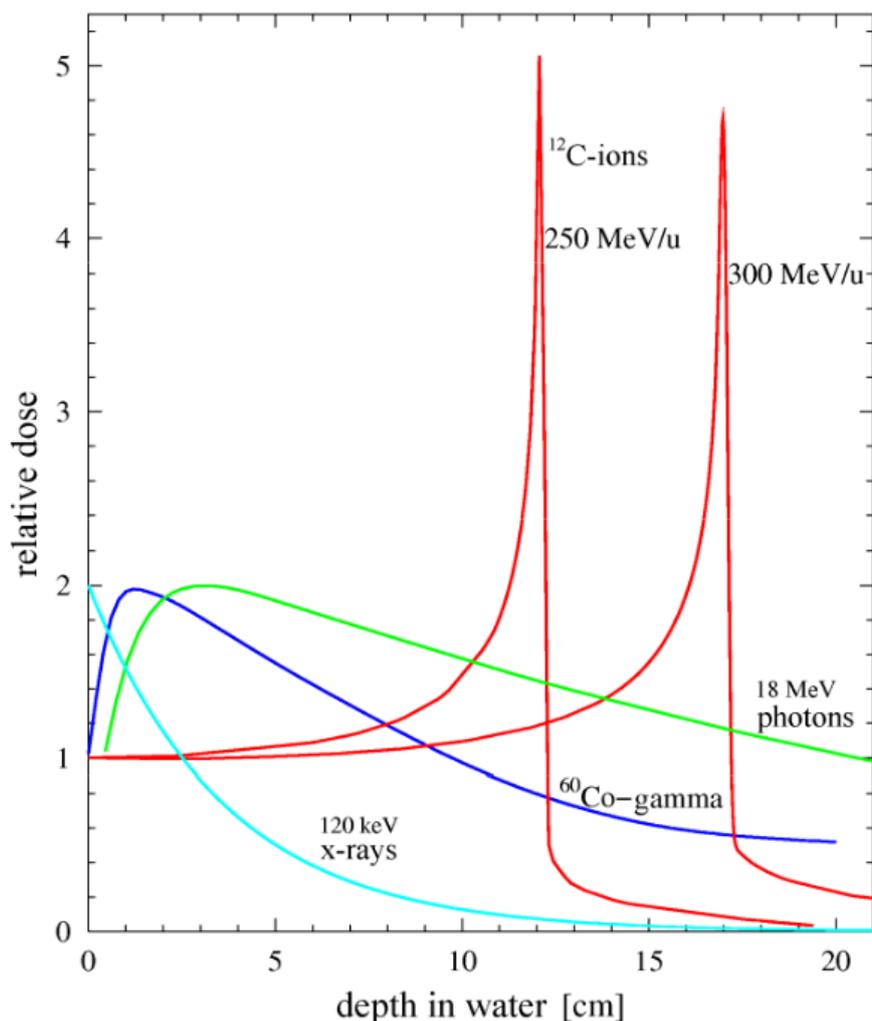


FIGURE A.2 – Comparaison du profil de dépôt d'énergie dans l'eau entre des photons et des ions de carbone pour différentes énergies [186].

Dans cette approche dite *top-down*, la combinaison des deux effets d'endommagements qui accompagnent ce type d'expériences (au sein du vivant) nous empêche d'établir la hiérarchie nécessaire à la compréhension des origines physico-chimique des endommagements à l'échelle moléculaire. Une solution permettant de pallier ce problème consiste à utiliser une approche *bottom-up*. Cette dernière approche permet d'étudier, par des expériences *in vacuo*, des systèmes constitués de petites molécules subissant des collisions avec des ions de faibles énergies. Les intérêts des études de systèmes biologiques isolés en phase gazeuse sont nombreux (voir chapitre 1 sect. 1.2). Ainsi, le fait de travailler avec des molécules sans environnement est un avantage majeur pour sonder les effets indirects de l'endommagement liés aux particules radicalaires ou les effets dus au dépôt d'énergie de faible dose rencontré en fin de pic de Bragg.

Néanmoins, les difficultés de mise en phase gazeuse de grandes biomolécules limitent cette approche. De plus, l'absence d'un environnement aqueux comme celui du

milieu biologique, rend cette approche moins pertinente du point de vue de l'intérêt biologique, du fait de l'omission de certains phénomènes cruciaux dans le processus d'endommagement. Par conséquent, les informations obtenues par cette approche sur les systèmes de petite taille (acide nucléique ou quelques peptides) [191–194] sont difficiles à extrapoler pour expliquer les conséquences biologiques observables par les méthodes *in vivo*.

Dans le paragraphe suivant, j'introduirai notre méthode originale pour étudier les effets indirects de l'endommagement par irradiation. Ainsi, notre expérience de désorption laser sur microgouttelette permet de coupler les avantages des approches *top-down* et *bottom-up* citées ci-dessus. Ceci se fait en irradiant des microgouttelettes sous vide par une source d'ions de faible énergie, puis d'analyser le système par une technique de mise en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

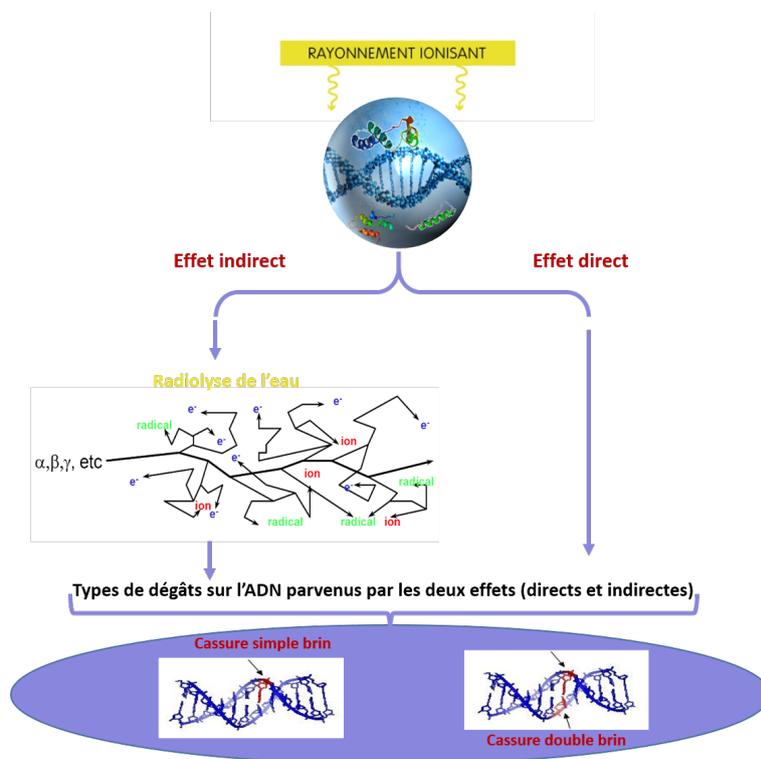


FIGURE A.3 – Schématisation des effets directs et indirects de l'irradiation d'une biomolécule.

### A.3 Irradiation des biomolécules sous vide par des ions de faible énergie

Dans le but de comprendre l'endommagement à l'échelle moléculaire de grandes biomolécules (telles que les brins d'ADN) par une faible dose d'irradiation (de l'ordre du pSv en dose équivalente), nous envisageons d'irradier des microgouttelettes

contenant des molécules d'intérêt biologique en utilisant des ions simplement chargés, possédant une énergie cinétique de quelques dizaines de keV. Les micro-gouttelettes qui sont générées par la source de mise en phase gazeuse (que j'ai décrite précédemment 2.1), peuvent être irradiées dans la même enceinte que celle dans laquelle on envoie le laser de désorption, qui est pompée à  $10^{-5}$  mbar (figure A.4). Cette phase d'irradiation aura lieu avant la désorption laser, durant la chute de la gouttelette, sur une zone d'interaction variant de quelques millimètres à plusieurs centimètres. La forme donnée au faisceau d'ions dans cette zone d'interaction et la vitesse de la gouttelette permettra de régler le temps d'irradiation allant de quelques microsecondes à quelques millisecondes.

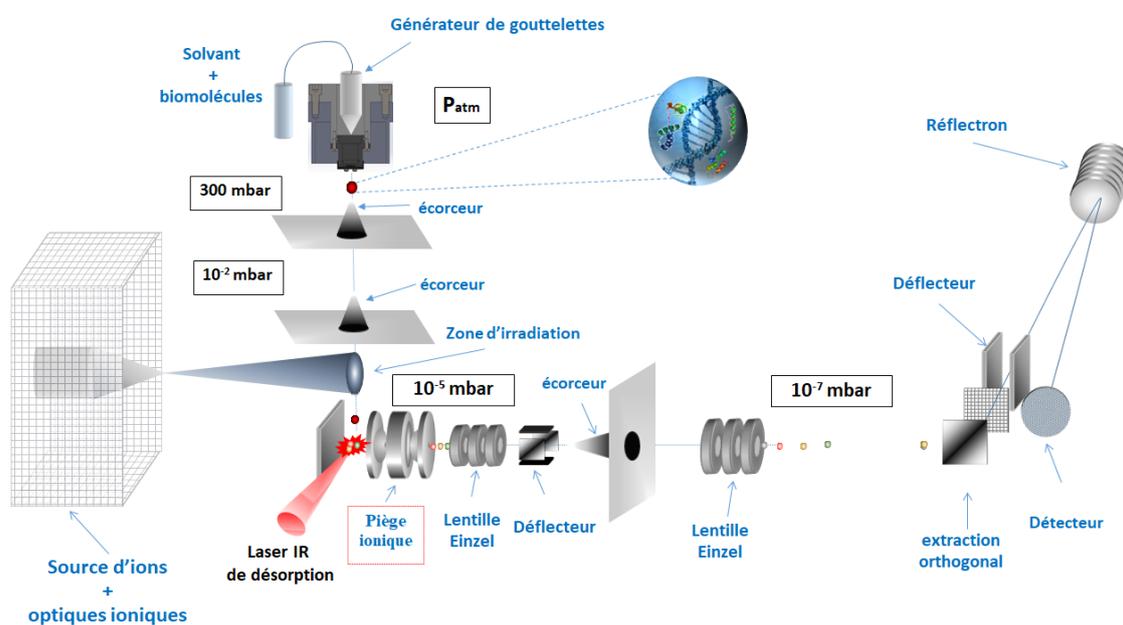


FIGURE A.4 – Dispositif de notre source de désorption laser sur microgouttelettes couplée à la plateforme d'irradiation.

Au cours de l'irradiation, le premier phénomène induit par la pénétration des ions dans la couche superficielle du solvant ; i.e. pour une longueur de pénétration de quelques centaines de nanomètres, est la radiolyse. Cette étape constitue la phase physico-chimique de l'irradiation, qui a été bien étudiée pour l'eau [195, 196]. L'étape suivante est la phase chimique de l'irradiation, qui arrive après un temps de relaxation de l'ordre de la microseconde. Le phénomène de radiolyse va déclencher une cascade de réactions, notamment par l'interaction des particules secondaires (électrons solvatés et radicaux libres) issues de la première phase, avec les biomolécules présentes dans la gouttelette. Cette phase est très peu caractérisée dans le cas de la radiolyse de l'eau et incomprise pour les biomolécules. Notre dispositif expérimental permettra, par le biais du couplage de la plateforme d'irradiation à la source de gouttelettes, d'aller sonder les effets indirects pour mieux comprendre ces mécanismes d'endommagement à l'échelle moléculaire, en s'affranchissant des limites des approches usuelles de type «top down» et «bottom up».

Avec notre source de désorption de microgouttelettes sous vide, nous pouvons donc envisager d'étudier des brins d'ADN dans un milieu aqueux. La majeure partie des dommages du matériel génétique est due aux cassures simples et doubles brins. Cet endommagement est majoritairement induit par les effets indirects d'irradiation. Le contrôle de la zone de dommage dans une microgouttelette est possible via le contrôle de l'énergie des ions (lié au pouvoir d'arrêt linéique) et le temps de l'interaction avec cette dernière. Ce champ d'étude pourra ensuite s'étendre à des systèmes plus complexes et plus pertinents du point de vue biologique. On pourra par exemple étudier des gouttelettes contenant un mélange de polypeptides et de molécules d'ADN, pour se rapprocher des conditions rencontrées dans le milieu cellulaire.

### Radio-sensibilisateurs

Alizadeh et Sanche ont montré dans une étude publiée en 2014 [197] que la présence de petites nanoparticules métalliques à proximité de l'ADN pouvait accroître considérablement l'endommagement de l'ADN en favorisant les cassures simples et doubles brins causées par les électrons de faible énergie.

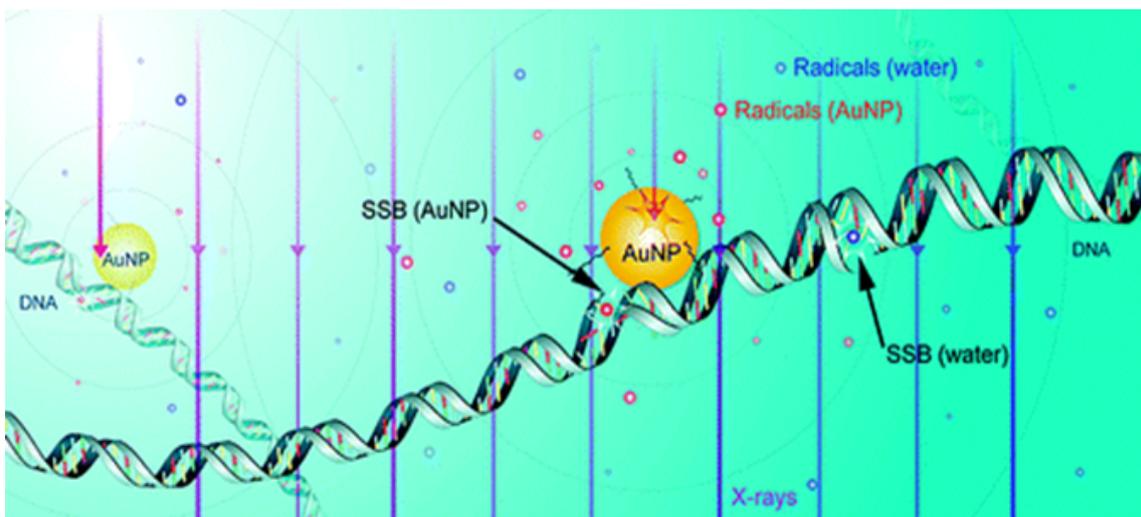


FIGURE A.5 – Représentation d'un radio-sensibilisateur de type nanoparticule d'or (AuNP) au voisinage d'un brin d'ADN.

Une possibilité intéressante offerte par ce nouveau dispositif serait d'explorer le changement du taux d'endommagement en fonction de l'environnement des biomolécules. En d'autres termes, on cherche à comprendre si la présence d'un système environnant la biomolécule peut modifier le taux d'endommagement par irradiation.

Un axe important est celui de l'ajout de radio-sensibilisateurs vectorisés dans une zone tumorale. Ceci provoque une augmentation du taux d'endommagement. Ces radio-sensibilisateurs (par exemple nanoparticules d'or ou de platine) possèdent la capacité d'augmenter l'efficacité des effets radiobiologiques. En effet, l'émission d'un grand nombre d'électrons secondaires venant de l'irradiation d'un tel système permet de causer la mort cellulaire à cause de nombreuses cassures qui sont produites au

niveau de l'ADN. De ce fait, il est nécessaire de bien comprendre l'effet des radiations en présence de ces radio-sensibilisateurs, afin de pouvoir quantifier leurs effets.

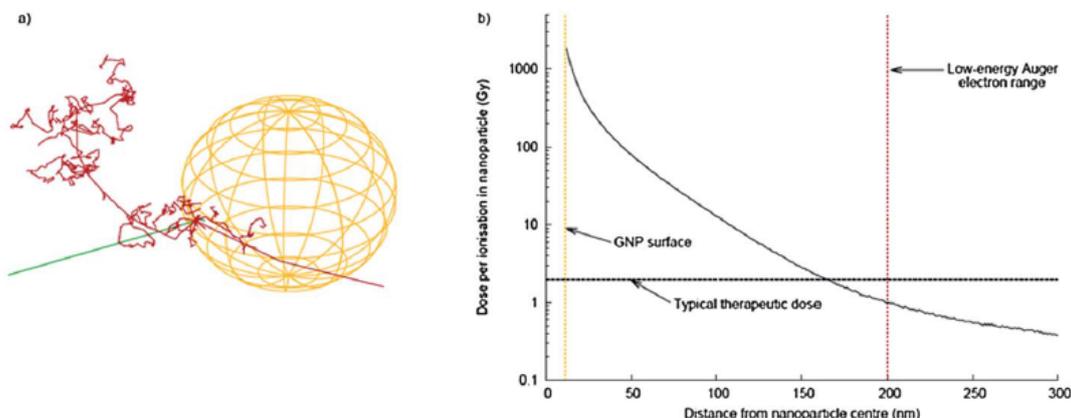


FIGURE A.6 – (a) Simulation par Geant4 (logiciel de simulation de trajectoires des particules à travers la matière) d'une nanoparticule d'or (GNP) de 20 nm de diamètre. La GNP est irradiée par un photon incident unique (vert) provoquant un événement ionisant : plusieurs électrons secondaires (rouge) sont éjectés via une cascade Auger. (b) Dose moyenne déposée en fonction de la distance du centre de la GNP. L'ajout de la GNP entraîne des distributions de dose très inhomogènes. Les électrons Auger de faible énergie déposent des doses de plusieurs milliers de Gray au voisinage de la GNP (distances < 200 nm) [198].

Dans le chapitre (4), nous avons discuté des expériences de spectroscopie IRMPD que nous avons effectuées pour caractériser des systèmes de complexes organométalliques et des nanoagrégats métalliques ligandés. Ces études permettent d'apporter des informations structurales sur ces systèmes que l'on pourra par la suite ajouter dans les microgouttelettes pour étudier leurs effets sur l'endommagement par irradiation avec notre source de désorption sous vide.

## A.4 Source plasma d'irradiation de type magnétron

La source d'irradiation qu'on a utilisée est une source d'ions fondée sur un plasma entretenu par une décharge de type magnétron, délivrant de forts courants d'ions (de l'ordre de 20 mA). Les premières sources de ce type ont été développées en 1969 par R.Geller [199]. Aujourd'hui, il existe de nombreuses sources de ce type utilisées dans plusieurs domaines (les interactions ion-surface, la fabrication de composants électroniques, le dépôt, la gravure, la découpe de métaux, l'hadronthérapie). Notre source d'ions est fabriquée par la société TECTRA (A.7). Le principe de fonctionnement de cette source repose sur l'interaction entre une onde électromagnétique et un gaz à ioniser dans un champ magnétique pour créer un plasma. Le faisceau d'ions sera ensuite extrait de ce plasma. Par absorption d'une onde de haute fréquence  $f_{HF}$  (quelques GHz), les électrons confinés dans une enceinte sous vide par un champ magnétique, peuvent se retrouver en résonance si leur fréquence cyclotronique  $f_c$ , est égale à la fréquence de la micro-onde  $f_{HF}$ . Ce phénomène de résonance électronique cyclotro-

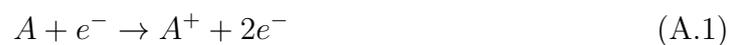
nique conduit donc à un chauffage très efficace qui permet d'accélérer les électrons qui vont ensuite entrer en collision avec le gaz pour générer et entretenir un plasma.



FIGURE A.7 – Photographie de notre source d'ions commerciale Tectra.

## A.5 Fonctionnement de notre source d'irradiation

Pour créer un faisceau des ions, il faut détacher un ou plusieurs électrons de l'atome qu'on souhaite ioniser. La formation d'un plasma à partir d'un gaz d'atomes neutres se réalise par un processus collisionnel entre des électrons énergétiques et le gaz atomique cible. Ces collisions peuvent être de plusieurs types : les collisions élastiques, les collisions d'excitation et les collisions d'ionisation. Ainsi, pour arracher un électron de la bande de valence d'un atome neutre  $A$  par impact électronique (voir A.1), il faut que l'énergie cinétique de l'électron qui entre en collision avec  $A$ , soit supérieure à son potentiel d'ionisation. En effet, par la perte d'un électron, l'atome devient chargé positivement et les deux électrons libres gagneront une énergie cinétique qui leur permet de subir de nouvelles collisions. Par conséquent, cette séquence d'ionisation produit un plasma formé des électrons et des ions positifs.



Une propriété fondamentale d'un plasma est la quasi-neutralité. Dans un grand volume, un plasma possède autant de charges négatives (électrons) que de charges positives. Ainsi, la densité volumique globale  $\rho$  des particules chargées dans un plasma s'écrit comme :

$$\rho = q(Zn_i - n_e) \quad (\text{A.2})$$

où  $Z$  est le numéro atomique,  $n_i$  et  $n_e$  sont respectivement les densités volumiques des ions et des électrons et  $q$  est la charge élémentaire.

L'équilibre d'un plasma se maintient si la condition de quasi-neutralité est vérifiée. Dans ce cas, la répartition des charges peut être décrite selon le modèle de Debye. Il s'agit d'une représentation statistique dans laquelle chaque charge va s'entourer d'une charge de signe opposé (sphère de Debye). Un électron peut aussi être assimilé à une sphère ionique, avec la possibilité de participer à plusieurs sphères de Debye. La distance minimale séparant deux charges dans un plasma et permettant de respecter la quasi-neutralité du système s'appelle longueur de Debye  $\lambda_D$ . C'est une constante fondamentale en physique des plasmas.

Par simplicité, et en vue de la grande différence de masse entre les ions positifs qui sont plus lourds et les électrons, la dynamique du système peut être décrite uniquement par cette approximation avec les propriétés des électrons ( $n_e, T_e$ ). Par ailleurs, la longueur de Debye est définie par l'équation (A.3), où  $\epsilon_0$  est la permittivité électrique du vide et  $k_B$  la constante de Boltzmann.

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 k_B T_e}{q^2 n_e}} \quad (\text{A.3})$$

Il existe plusieurs méthodes pour chauffer les électrons afin de générer un plasma.

Dans notre cas, c'est le couplage entre une onde radiofréquence et le gaz qui permet par une absorption résonnante de cette onde de chauffer les électrons et produire l'état de plasma. Un champ magnétique axial et radial de 87.5 mT permet de confiner les électrons dans la décharge pour augmenter la probabilité de collision avec les atomes et favoriser l'ionisation.

Les conditions nécessaires pour réaliser et entretenir un état de plasma sont la densité du gaz et une énergie suffisante des électrons pour l'ionisation. La condition sur la densité du gaz ( $n_g$ ) est directement liée au libre parcours moyen par l'équation (A.4). Ce libre parcours moyen représente la distance moyenne parcourue par un électron avant de rentrer en collision avec un atome neutre. Ceci dépend aussi de la section efficace de collision  $\sigma(\epsilon)$  qui représente la surface d'interaction électron-atome. La figure (A.8) montre les sections efficaces de collisions de l'Argon et du Xénon en fonction de l'énergie des électrons.

$$\lambda_{lpm} = \frac{1}{\sigma(\epsilon)n_g} \quad (\text{A.4})$$

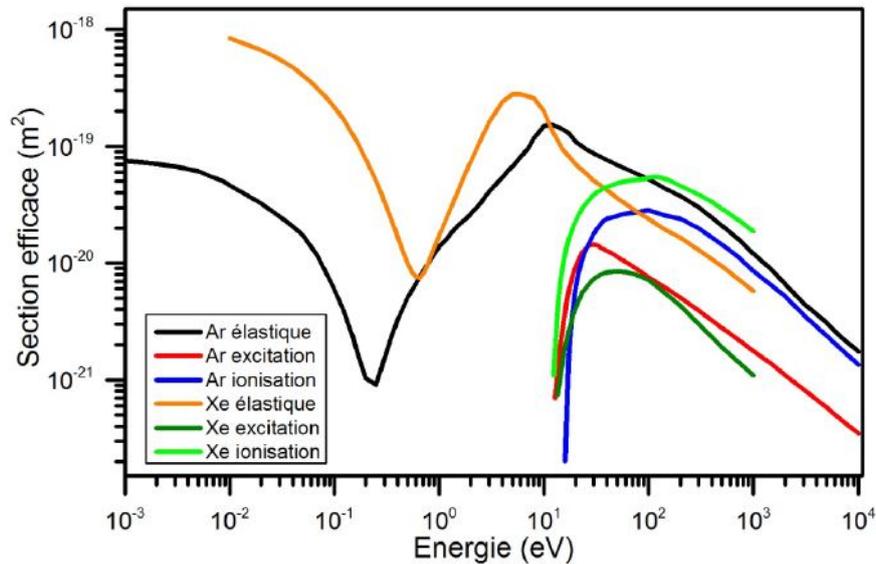


FIGURE A.8 – Sections efficaces de l'Argon et du Xénon en fonction de l'énergie de l'électron impactant.

## A.6 Couplage du système d'optique ionique à la source d'irradiation

Dans le paragraphe précédent, nous avons vu le principe de fonctionnement d'une source plasma, ainsi que les deux conditions de densité et d'excitation qui doivent toujours être réunies pour créer et maintenir cet état de la matière. Dans la partie suivante je présenterai les modifications et les améliorations apportées à notre source d'irradiation.

Afin de coupler, notre source d'irradiation à notre expérience de désorption de microgouttelette sous vide, j'ai intégré un système d'optique ionique (figure A.9) dans une enceinte sous vide à  $10^{-4}$  mbar, située à la sortie de la source Tectra. Ce système a été conçu par Aditya Agnihotri durant son post-doctorat au CIMAP, et réalisé par Jean-Marc Ramillon au CIMAP (Centre de recherche sur les Ions, les Matériaux et la Photonique). Il permet d'optimiser et d'orienter les trajectoires des ions issus de la source d'ions en direction de la microgouttelette. Cette optique permet de focaliser plus ou moins le faisceau afin d'ajuster son recouvrement avec la trajectoire de la gouttelette sous vide et donc la dose absorbée.

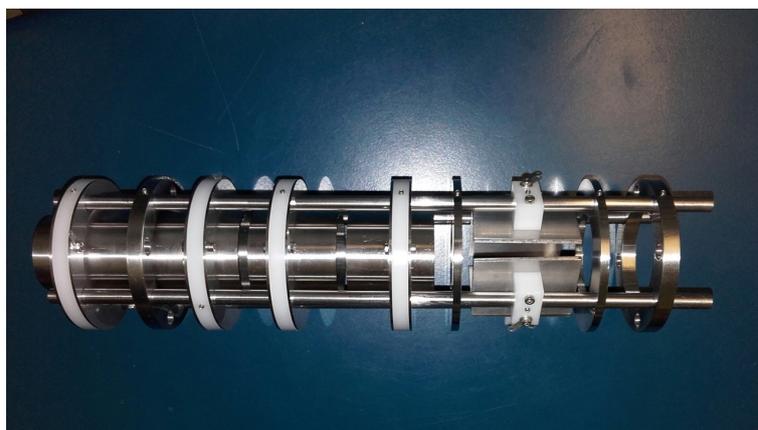


FIGURE A.9 – photographie du système d'optique ionique placé sous vide à la sortie de notre source d'ions Tectra.



# Bibliographie

- [1] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, and C. M. Whitehouse, “Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules,” Science, vol. 246, no. 4926, pp. 64–71, 1989. (pages [xi](#), [15](#)).
- [2] M. Karas and F. Hillenkamp, “Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons.,” Analytical Chemistry, 60 :2299, 1988. (pages [xi](#), [17](#)).
- [3] N. A. Pierson, L. Chen, S. J. Valentine, D. H. Russell, and D. E. Clemmer, “Number of solution states of bradykinin from ion mobility and mass spectrometry measurements,” Journal of the American Chemical Society, vol. 133, no. 35, pp. 13810–13813, 2011. (page [xii](#)).
- [4] H. V. Florance, A. P. Stopford, J. M. Kalapothakis, B. J. McCullough, A. Bretherick, and P. E. Barran, “Evidence for  $\alpha$ -helices in the gas phase : A case study using melittin from honey bee venom,” Analyst, vol. 136, no. 17, pp. 3446–3452, 2011. (page [xii](#)).
- [5] J. A. Silveira, K. A. Servage, C. M. Gamage, and D. H. Russell, “Cryogenic ion mobility-mass spectrometry captures hydrated ions produced during electrospray ionization,” The Journal of Physical Chemistry A, vol. 117, no. 5, pp. 953–961, 2013. (page [xii](#)).
- [6] 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, vol. 59, no. 2, pp. 109–114, 2006. (pages [xii](#), [35](#), [70](#), [70](#)).
- [7] A. Charvat and B. Abel, “How to make big molecules fly out of liquid water : applications, features and physics of laser assisted liquid phase dispersion mass spectrometry,” Phys. Chem. Chem. Phys., vol. 9, pp. 3335–3360, 2007. (pages [xii](#), [19](#), [21](#), [21](#), [35](#)).
- [8] P. Roepstorff, “Proposal for a nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides.,” Biomed. Mass Spec., vol. 11, p. 60, 1984. (page [5](#), [5](#)).
- [9] K. Biemann, “Appendix 5. nomenclature for peptide fragment ions (positive ions),” Methods in enzymology, vol. 193, pp. 886–887, 1990. (page [5](#)).
- [10] Y. F. Tai, “Applications of positron emission tomography (PET) in neurology,” Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, vol. 75, pp. 669–676, May 2004. (page [7](#)).
- [11] N. Nieuwjaer, A. Beydoun, F. Lecomte, B. Manil, D. Scuderi, and C. Desfrancois, “Ligand-protected gold nanoclusters probed by IRMPD spectroscopy and

- quantum chemistry calculations,” *Journal of Molecular Spectroscopy*, vol. 383, p. 111562, Jan. 2022. (pages 7, 101).
- [12] N. Nieuwjaer, A. Beydoun, F. Lecomte, B. Manil, F. Cappelluti, L. Guidoni, D. Scuderi, and C. Desfrancois, “IRMPD spectroscopy and quantum chemistry calculations on mono- and bi-metallic complexes of acetylacetonate ligands with aluminum, iron, and ruthenium ions,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 153, p. 234303, Dec. 2020. (pages 7, 101).
- [13] J. D. Watson and F. H. Crick, “Molecular structure of nucleic acids : a structure for deoxyribose nucleic acid,” *Nature*, vol. 171, no. 4356, pp. 737–738, 1953. (page 7).
- [14] I. Diaz-Acosta, J. Baker, W. Cordes, and P. Pulay, “Calculated and Experimental Geometries and Infrared Spectra of Metal Tris-Acetylacetonates : Vibrational Spectroscopy as a Probe of Molecular Structure for Ionic Complexes. Part I,” *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 105, pp. 238–244, Jan. 2001. (pages 12, 110).
- [15] S. Vivekanandan, J. R. Brender, S. Y. Lee, and A. Ramamoorthy, “A partially folded structure of amyloid-beta(1–40) in an aqueous environment,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 411, no. 2, pp. 312–316, 2011. (page 13).
- [16] S. K. Kim, W. Lee, and D. R. Herschbach, “Cluster Beam Chemistry : Hydration of Nucleic Acid Bases ; Ionization Potentials of Hydrated Adenine and Thymine,” *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 100, pp. 7933–7937, Jan. 1996. (page 14).
- [17] C. Chollet, S. Boutet-Mercey, L. Laboureur, C. Rincon, M. Méjean, J. Jouhet, F. Fenaille, B. Colsch, and D. Touboul, “Supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry for lipidomics,” *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 54, no. 10, pp. 791–801, 2019. (page 14).
- [18] B. Bothner and G. Siuzdak, “Electrospray ionization of a whole virus : Analyzing mass, structure, and viability,” *ChemBioChem*, vol. 5, no. 3, pp. 258–260, 2004. (page 15).
- [19] R. J. PFEIFER and C. D. HENDRICKS, “Parametric studies of electrohydrodynamic spraying,” *AIAA Journal*, vol. 6, no. 3, pp. 496–502, 1968. (page 15).
- [20] G. Schmelzeisen-Redeker, L. Bütfering, and F. Röllgen, “Desolvation of ions and molecules in thermospray mass spectrometry,” *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, vol. 90, no. 2, pp. 139–150, 1989. (page 16).
- [21] B. A. Thomson and J. V. Iribarne, “Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 71, no. 11, pp. 4451–4463, 1979. (page 16).
- [22] L. Konermann, E. Ahadi, A. D. Rodriguez, and S. Vahidi, “Unraveling the mechanism of electrospray ionization,” *Analytical Chemistry*, vol. 85, no. 1, pp. 2–9, 2013. PMID : 23134552. (page 17).

- [23] R. E. Honig and J. R. Woolston, "Laser-induced emission of electrons, ions, and neutral atoms from solid surfaces," Applied Physics Letters, vol. 2, no. 7, pp. 138–139, 1963. (page 17).
- [24] F. Piuzzi, I. Dimicoli, M. Mons, B. Tardivel, and Q. Zhao, "A simple laser vaporization source for thermally fragile molecules coupled to a supersonic expansion : application to the spectroscopy of tryptophan," Chemical Physics Letters, vol. 320, no. 3, pp. 282–288, 2000. (page 18).
- [25] B. B. Eyal Nir, Louis Grace and M. S. de Vries, "Remp spectroscopy of jet-cooled guanine," J. Am. Chem. Soc., vol. 121, no. 3, pp. 4896–4897, 1999. (page 18).
- [26] K. Dreisewerd, "The desorption process in maldi," Chemical Reviews, vol. 103, no. 2, pp. 395–426, 2003. (page 18).
- [27] B. A. Budnik, K. B. Jensen, T. J. D. Jørgensen, A. Haase, and R. A. Zubarev, "Benefits of 2.94  $\mu\text{m}$  infrared matrix-assisted laser desorption/ionization for analysis of labile molecules by fourier transform mass spectrometry," Rapid Communications in Mass Spectrometry, vol. 14, no. 7, pp. 578–584. (page 18).
- [28] 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, vol. 9, no. 9, pp. 879–884, 1998. (page 18).
- [29] G. Bolbach, "Matrix-assisted laser desorption/ionization analysis of non-covalent complexes : Fundamentals and applications," Current Pharmaceutical Design, vol. 11, no. 20, pp. 2535–2557(23), 2005. (page 19).
- [30] Z. R. Mädler S., Erba E.B., "Maldi-tof mass spectrometry for studying noncovalent complexes of biomolecules," Springer, Berlin, Heidelberg, vol. 331, 2012. (page 19).
- [31] 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, vol. 18, no. 11, pp. 1977–1989, 2007. (page 19).
- [32] C. Becker, L. Jusinski, and L. Moro, "Infrared laser-induced desorption of neutral organic compounds from frozen aqueous solution followed by single-photon ionization," International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, vol. 95, no. 3, pp. R1–R4, 1990. (page 19).
- [33] S. Berkenkamp, M. Karas, and F. Hillenkamp, "Ice as a matrix for ir-matrix-assisted laser desorption/ionization : mass spectra from a protein single crystal," Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 93, no. 14, pp. 7003–7007, 1996. (page 19).
- [34] J. D. Sheffer and K. K. Murray, "Infrared matrix-assisted laser desorption/ionization using a frozen alcohol matrix," Journal of Mass Spectrometry, vol. 35, no. 1, pp. 95–97, 2000. (page 19).
- [35] H. Siegbahn and K. Siegbahn, "Esca applied to liquids," Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena, vol. 2, no. 3, pp. 319–325, 1973. (page 19).

- [36] W. Keller, H. Morgner, and W. A. Müller, “Electron spectroscopy of liquid mercury under impact of metastable he(23 s) atoms,” Molecular Physics, vol. 58, no. 6, pp. 1039–1052, 1986. (page 19).
- [37] T. J. Faubel M., Schlemmer S., “A molecular beam study of the evaporation of water from a liquid jet,” Molecular Physics, no. 10, pp. 296–277, 1988. (page 19).
- [38] K. T. Faubel M., “Non-equilibrium molecular evaporation of carboxylic acid dimers,” vol. 339, p. 527–529, 1989. (page 19).
- [39] N. Nishi, K. Koga, C. Ohshima, K. Yamamoto, U. Nagashima, and J. Nagami, “Molecular association in ethanol-water mixtures studied by mass spectrometric analysis of clusters generated through adiabatic expansion of liquid jets,” vol. 110, no. 16, pp. 5246–5255, 1988. (page 19).
- [40] N. Nishi and K. Yamamoto, “Hydrophobic hydration and hydrophobic interaction of carboxylic acids in aqueous solution : mass spectrometric analysis of liquid fragments isolated as clusters,” vol. 112, no. 2, pp. 549–558, 1990. (page 19).
- [41] N. Horimoto, J.-y. Kohno, F. Mafuné, and T. Kondow, “Preparation of less volatile solute molecules and clusters in the gas phase through selective vibrational excitation of solvent in liquid beam of solution,” The Journal of Physical Chemistry A, vol. 103, no. 48, pp. 9569–9572, 1999. (page 19).
- [42] F. Mafuné, Y. Takeda, T. Nagata, and T. Kondow, “Formation and ejection of cluster ions from a liquid beam of aniline—ethanol solution by laser photoionization,” Chemical Physics Letters, vol. 199, no. 6, pp. 615–620, 1992. (page 19).
- [43] T. Kondow and F. Mafuné, “Structures and dynamics of molecules on liquid beam surfaces,” Annual Review of Physical Chemistry, vol. 51, no. 1, pp. 731–761, 2000. PMID : 11031298. (page 19).
- [44] 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, vol. 243, no. 2, pp. 177–188, 2005. (pages 19, 20, 70).
- [45] W. Kleinekofort, J. Avdiev, and B. Brutschy, “A new method of laser desorption mass spectrometry for the study of biological macromolecules,” International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, vol. 152, no. 2, pp. 135–142, 1996. (pages 19, 21).
- [46] 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, vol. 156, no. 3, pp. 195–202, 1996. (page 19).
- [47] N. Horimoto, F. Mafuné, and T. Kondow, “Relaxation processes of molecules on a solution surface studied by the two-color pumpprobe ionization technique,” The Journal of Physical Chemistry B, vol. 103, no. 44, pp. 9540–9544, 1999. (page 20).

- [48] F. Mafuné, J.-Y. Kohno, and T. Kondow, "Ejection of cluster ions from a liquid beam of an aniline-propanol solution following laser photoionization," Journal of the Chinese Chemical Society, vol. 42, no. 2, pp. 449–454, 1995. (page 20).
- [49] F. Mafuné, J.-y. Kohno, T. Nagata, and T. Kondow, "Mechanism of ion ejection from a liquid beam following laser photoionization," Chemical Physics Letters, vol. 218, no. 1, pp. 7–12, 1994. (pages 20, 78).
- [50] N. Morgner, T. Kleinschroth, H.-D. Barth, B. Ludwig, and B. Brutschy, "A novel approach to analyze membrane proteins by laser mass spectrometry : From protein subunits to the integral complex," Journal of the American Society for Mass Spectrometry, vol. 18, no. 8, pp. 1429–1438, 2007. (pages 21, 45).
- [51] N. Horimoto, J. ya Kohno, F. Mafuné, and T. Kondow, "Ejection mechanism of molecules and neutral clusters from liquid beam under irradiation of ir laser," Chemical Physics Letters, vol. 318, no. 6, pp. 536–542, 2000. (page 21).
- [52] 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, vol. 243, no. 2, pp. 177–188, 2005. (page 21).
- [53] A. Terasaki and T. Kondow, "Dynamics of an argon cluster following impulsive excitation studied by molecular-dynamics simulation," Chemical Physics Letters, vol. 474, no. 1, pp. 57–61, 2009. (pages 21, 71).
- [54] A. Terasaki, "Dynamics of clusters initiated by photon and surface impact," The Journal of Physical Chemistry A, vol. 111, no. 32, pp. 7671–7689, 2007. (pages 21, 71, 78, 82, 82).
- [55] J.-y. Kohno, F. Mafuné, and T. Kondow, "Ejection of a large neutral cluster from a liquid beam surface following ir laser irradiation," The Journal of Physical Chemistry A, vol. 108, no. 6, pp. 971–977, 2004. (pages 21, 37, 71).
- [56] K. Komatsu, T. Nirasawa, M. Hoshino-Nagasaka, and J.-y. Kohno, "Mechanism of protein molecule isolation by ir laser ablation of droplet beam," The Journal of Physical Chemistry A, vol. 120, no. 9, pp. 1495–1500, 2016. (pages 21, 71).
- [57] I. Falconer, "J.J. Thomson's Work on Positive Rays, 1906-1914," Historical Studies in the Physical and Biological Sciences, vol. 18, pp. 265–310, Jan. 1988. (page 23).
- [58] A. J. Dempster, "A new method of positive ray analysis," Phys. Rev., vol. 11, pp. 316–325, Apr 1918. (page 23).
- [59] F. L. Ph.D. and F. A. M. D.Sc., "Xlviii. the possibility of separating isotopes," The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science, vol. 37, no. 221, pp. 523–534, 1919. (page 23).
- [60] W. C. Wiley and I. H. McLaren, "Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution," Review of Scientific Instruments, vol. 26, no. 12, pp. 1150–1157, 1955. (pages 23, 36, 48).
- [61] J. H. Griffin and K. M. Downard, "Mass spectrometry analytical responses to the SARS-CoV2 coronavirus in review," TrAC Trends in Analytical Chemistry, vol. 142, p. 116328, 2021. (page 24, 24).

- [62] D. M. Ruszkiewicz, D. Sanders, R. O'Brien, F. Hempel, M. J. Reed, A. C. Riepe, K. Bailie, E. Brodrick, K. Darnley, R. Ellerkmann, O. Mueller, A. Skarysz, M. Truss, T. Wortelmann, S. Yordanov, C. L. P. Thomas, B. Schaaf, and M. Eddleston, "Diagnosis of COVID-19 by analysis of breath with gas chromatography-ion mobility spectrometry - a feasibility study," EClinicalMedicine, vol. 29-30, p. 100609, 2020. (page 24).
- [63] B. Mamyrin, V. Karataev, D. Shmikk, and V. Zagulin, "The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution," Zh. Eksp. Teor. Fiz., vol. 64, no. 1, pp. 82–89, 1973. (page 29).
- [64] E. O. Lawrence and M. S. Livingston, "The production of high speed protons without the use of high voltages," Phys. Rev., vol. 38, pp. 834–834, Aug 1931. (page 30).
- [65] E. O. Lawrence and M. S. Livingston, "The production of high speed light ions without the use of high voltages," Phys. Rev., vol. 40, pp. 19–35, Apr 1932. (page 30).
- [66] J. A. Hipple, H. Sommer, and H. A. Thomas, "A precise method of determining the faraday by magnetic resonance," Phys. Rev., vol. 76, pp. 1877–1878, Dec 1949. (page 30).
- [67] H. Sommer, "H. a. thomas, and ja hipple," Phys. Rev., vol. 82, p. 697, 1951. (page 30).
- [68] M. B. Comisarow and A. G. Marshall, "Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy," Chemical Physics Letters, vol. 25, pp. 282–283, 1974. (page 30).
- [69] R. T. McIver, R. L. Hunter, and W. D. Bowers, "Coupling a quadrupole mass spectrometer and a Fourier transform mass spectrometer," International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, vol. 64, pp. 67–77, Mar. 1985. (page 30).
- [70] P. Kofel, M. Allemann, H. Kellerhals, and K. P. Wanczek, "External generation of ions in ICR spectrometry," International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, vol. 65, no. 1, pp. 97–103, 1985. (page 30).
- [71] J. Silberring and R. Ekman, Mass spectrometry and hyphenated techniques in neuropeptide research, vol. 4. John Wiley & Sons, 2002. (page 32).
- [72] B. Stasicki, A. Charvat, M. Faubel, and B. Abel, "Visualization of laser-induced liquid micro-jet disintegration by means of high-speed video stroboscopy," vol. 5580, pp. 335 – 346, SPIE, 2005. (pages 37, 69, 71, 79).
- [73] S. M. Colby, T. B. King, J. P. Reilly, and D. M. Lubman, "Improving the resolution of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry by exploiting the correlation between ion position and velocity," Rapid Communications in Mass Spectrometry, vol. 8, no. 11, pp. 865–868, 1994. (pages 37, 48).
- [74] "Site web de la société microdrop technologies gmbh." (page 40).
- [75] A. Godard, "Sources paramétriques optiques et applications," Université Paris-Sud, 2016. (page 46).

- [76] V. M. Wallace, N. R. Dhumal, F. M. Zehentbauer, H. J. Kim, and J. Kiefer, "Revisiting the aqueous solutions of dimethyl sulfoxide by spectroscopy in the mid- and near-infrared : experiments and car-parrinello simulations," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 119, no. 46, pp. 14780–14789, 2015. (page [47](#)).
- [77] O. N. Jensen, A. Podtelejnikov, and M. Mann, "Delayed extraction improves specificity in database searches by matrix-assisted laser desorption/ionization peptide maps," *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 10, no. 11, pp. 1371–1378, 1996. (page [48](#)).
- [78] D. N. Shin, J. W. Wijnen, J. B. F. N. Engberts, and A. Wakisaka, "On the Origin of Microheterogeneity : A Mass Spectrometric Study of Dimethyl Sulfoxide Water Binary Mixture," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 105, pp. 6759–6762, July 2001. (page [50](#)).
- [79] A. Wattenberg, F. Sobott, H.-D. Barth, and B. Brutschy, "Studying noncovalent protein complexes in aqueous solution with laser desorption mass spectrometry," *International Journal of Mass Spectrometry*, vol. 203, pp. 49–57, Dec. 2000. (page [50](#)).
- [80] T. Jørgensen, P. Hvelplund, J. Andersen, and P. Roepstorff, "Tandem mass spectrometry of specific vs. nonspecific noncovalent complexes of vancomycin antibiotics and peptide ligands," *International Journal of Mass Spectrometry*, vol. 219, no. 3, pp. 659–670, 2002. In honour of Yannik Hoppilliard. (page [53](#)).
- [81] N. Roth, S. Awel, D. A. Horke, and J. Küpper, "Optimizing aerodynamic lenses for single-particle imaging," *Journal of Aerosol Science*, vol. 124, pp. 17–29, 2018. (page [63](#)).
- [82] B. B. Schneider, D. J. Douglas, and D. D. Y. Chen, "Collision-induced dissociation of bradykinin ions in the interface region of an ESI-MS," *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 12, pp. 772–779, July 2001. (page [67](#)).
- [83] A. Charvat, A. Bógehold, and B. Abel, "Time-Resolved Micro Liquid Desorption Mass Spectrometry : Mechanism, Features, and Kinetic Applications," *Australian Journal of Chemistry*, vol. 59, no. 2, p. 81, 2006. (page [69](#)).
- [84] S.-D. Leite, "Effets des rayonnements ionisants sur des biomolécules en solution : vers une caractérisation des dommages à l'échelle moléculaire," p. 173, 2014. (page [74](#)).
- [85] C. M. Copley, J. Chen, E. C. Cho, L. V. Wang, and Y. Xia, "Gold nanostructures : a class of multifunctional materials for biomedical applications," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, pp. 44–56, 2011. (pages [97](#), [123](#)).
- [86] J. Oomens, N. Polfer, D. T. Moore, L. van der Meer, A. G. Marshall, J. R. Eyler, G. Meijer, and G. von Helden, "Charge-state resolved mid-infrared spectroscopy of a gas-phase protein," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 7, no. 7, p. 1345, 2005. (page [98](#)).
- [87] V. Gabelica, F. Rosu, E. De Pauw, J. Lemaire, J.-C. Gillet, J.-C. Pouilly, F. Lecomte, G. Grégoire, J.-P. Schermann, and C. Desfrancois, "Infrared Signature

- of DNA G-Quadruplexes in the Gas Phase,” Journal of the American Chemical Society, vol. 130, pp. 1810–1811, Feb. 2008. (page 99).
- [88] J. Laskin, J. H. Futrell, and I. K. Chu, “Is dissociation of peptide radical cations an ergodic process?,” Journal of the American Chemical Society, vol. 129, no. 31, pp. 9598–9599, 2007. (page 99).
- [89] K. Rajabi, M. L. Easterling, and T. D. Fridgen, “Solvation of electrosprayed ions in the accumulation/collision hexapole of a hybrid q-ftms,” Journal of the American Society for Mass Spectrometry, vol. 20, no. 3, pp. 411–418, 2009. (page 101).
- [90] J. Martens, G. Berden, C. R. Gebhardt, and J. Oomens, “Infrared ion spectroscopy in a modified quadrupole ion trap mass spectrometer at the FELIX free electron laser laboratory,” Review of Scientific Instruments, vol. 87, p. 103108, Oct. 2016. (page 102).
- [91] J. Oomens, B. G. Sartakov, G. Meijer, and G. von Helden, “Gas-phase infrared multiple photon dissociation spectroscopy of mass-selected molecular ions,” International Journal of Mass Spectrometry, vol. 254, no. 1, pp. 1–19, 2006. (page 103).
- [92] M. Pasi, R. Lavery, and N. Ceres, “PaLaCe : A Coarse-Grain Protein Model for Studying Mechanical Properties,” Journal of Chemical Theory and Computation, vol. 9, pp. 785–793, Jan. 2013. (page 105).
- [93] J. Zhou, I. F. Thorpe, S. Izvekov, and G. A. Voth, “Coarse-Grained Peptide Modeling Using a Systematic Multiscale Approach,” Biophysical Journal, vol. 92, pp. 4289–4303, June 2007. (page 105).
- [94] P. Kar, S. M. Gopal, Y.-M. Cheng, A. Predeus, and M. Feig, “PRIMO : A Transferable Coarse-Grained Force Field for Proteins,” Journal of Chemical Theory and Computation, vol. 9, pp. 3769–3788, Aug. 2013. (page 105).
- [95] A. Laio and M. Parrinello, “Escaping free-energy minima,” Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 99, no. 20, pp. 12562–12566, 2002. (page 105).
- [96] L. Maragliano and E. Vanden-Eijnden, “A temperature accelerated method for sampling free energy and determining reaction pathways in rare events simulations,” Chemical Physics Letters, vol. 426, pp. 168–175, July 2006. (page 105).
- [97] Y. Sugita and Y. Okamoto, “Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding,” Chemical Physics Letters, vol. 314, pp. 141–151, Nov. 1999. (page 105).
- [98] “Replica-exchange multicanonical algorithm and multicanonical replica-exchange method for simulating systems with rough energy landscape - ScienceDirect.” (page 105).
- [99] A. Baumketner, S. L. Bernstein, T. Wyttenbach, N. D. Lazo, D. B. Teplow, M. T. Bowers, and J.-E. Shea, “Structure of the 21–30 fragment of amyloid-protein,” Protein Science, vol. 15, no. 6, pp. 1239–1247, 2006. (page 106).

- [100] “The Structure of the Alzheimer Amyloid 10-35 Peptide Probed through Replica-Exchange Molecular Dynamics Simulations in Explicit Solvent - ScienceDirect.” (page 106).
- [101] “The Alzheimer’s Peptides A40 and 42 Adopt Distinct Conformations in Water : A Combined MD / NMR Study - ScienceDirect.” (page 106).
- [102] C. Narayanan, D. S. Weinstock, K.-P. Wu, J. Baum, and R. M. Levy, “Investigation of the Polymeric Properties of  $\alpha$ -Synuclein and Comparison with NMR Experiments : A Replica Exchange Molecular Dynamics Study,” *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 8, pp. 3929–3942, Oct. 2012. Publisher : American Chemical Society. (page 106).
- [103] M. Grabenauer, C. Wu, P. Soto, J.-E. Shea, and M. T. Bowers, “Oligomers of the Prion Protein Fragment 106126 Are Likely Assembled from  $\alpha$ -Hairpins in Solution, and Methionine Oxidation Inhibits Assembly without Altering the Peptide’s Monomeric Conformation,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 132, pp. 532–539, Jan. 2010. Publisher : American Chemical Society. (page 106).
- [104] M. M. Seibert, A. Patriksson, B. Hess, and D. van der Spoel, “Reproducible Polypeptide Folding and Structure Prediction using Molecular Dynamics Simulations,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 354, pp. 173–183, Nov. 2005. (page 106).
- [105] F. Rao and A. Caffisch, “Replica exchange molecular dynamics simulations of reversible folding,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 119, pp. 4035–4042, Aug. 2003. (page 106).
- [106] L. Xu, X. Wang, and X. Wang, “Characterization of the internal dynamics and conformational space of zinc-bound amyloid peptides by replica-exchange molecular dynamics simulations,” *European Biophysics Journal*, vol. 42, pp. 575–586, July 2013. (page 106).
- [107] J. A. McCammon, B. R. Gelin, and M. Karplus, “Dynamics of folded proteins,” *Nature*, vol. 267, pp. 585–590, June 1977. (page 107).
- [108] “Intrinsic Curvature Properties of Photosynthetic Proteins in Chromatophores | Elsevier Enhanced Reader.” (page 107).
- [109] A. D. MacKerell Jr., N. Banavali, and N. Foloppe, “Development and current status of the CHARMM force field for nucleic acids,” *Biopolymers*, vol. 56, no. 4, pp. 257–265, 2000. (page 107).
- [110] R. D. Lins and P. H. Hünenberger, “A new GROMOS force field for hexopyranose-based carbohydrates,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 26, no. 13, pp. 1400–1412, 2005. (page 107).
- [111] W. Damm, A. Frontera, J. Tirado-Rives, and W. L. Jorgensen, “OPLS all-atom force field for carbohydrates,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 18, no. 16, pp. 1955–1970, 1997. (page 107).
- [112] P. S. Charifson, J. J. Corkery, M. A. Murcko, and W. P. Walters, “Consensus Scoring : A Method for Obtaining Improved Hit Rates from Docking Databases of Three-Dimensional Structures into Proteins,” *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 42, pp. 5100–5109, Dec. 1999. (page 107).

- [113] R. Salomon-Ferrer, D. A. Case, and R. C. Walker, "An overview of the Amber biomolecular simulation package : Amber biomolecular simulation package," Wiley Interdisciplinary Reviews : Computational Molecular Science, vol. 3, pp. 198–210, Mar. 2013. (page 107).
- [114] D. A. Case, T. E. Cheatham III, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K. M. Merz Jr., A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang, and R. J. Woods, "The Amber biomolecular simulation programs," Journal of Computational Chemistry, vol. 26, no. 16, pp. 1668–1688, 2005. eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jcc.20290>. (page 107).
- [115] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, and D. A. Case, "Development and testing of a general amber force field," Journal of Computational Chemistry, vol. 25, no. 9, pp. 1157–1174, 2004. (page 107).
- [116] M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, and J. J. P. Stewart, "Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1 : a new general purpose quantum mechanical molecular model," Journal of the American Chemical Society, vol. 107, pp. 3902–3909, June 1985. (page 108).
- [117] J. J. P. Stewart, "Optimization of parameters for semiempirical methods V : Modification of NDDO approximations and application to 70 elements," Journal of Molecular Modeling, vol. 13, pp. 1173–1213, Dec. 2007. (pages 108, 135).
- [118] J. J. P. Stewart, "Application of the PM6 method to modeling proteins," Journal of Molecular Modeling, vol. 15, pp. 765–805, July 2009. (page 108).
- [119] P. Hohenberg and W. Kohn, "Inhomogeneous electron gas," Physical review, vol. 136, no. 3B, p. B864, 1964. (page 108).
- [120] A. D. Becke, "Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior," Phys. Rev. A, vol. 38, pp. 3098–3100, Sep 1988. (page 108).
- [121] C. Lee, W. Yang, and R. G. Parr, "Development of the colle-salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density," Phys. Rev. B, vol. 37, pp. 785–789, Jan 1988. (page 108).
- [122] S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich, and H. Krieg, "A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (dft-d) for the 94 elements h-pu," The Journal of Chemical Physics, vol. 132, no. 15, p. 154104, 2010. (page 108).
- [123] M. Swart, M. Solà, and F. M. Bickelhaupt, "Inter- and intramolecular dispersion interactions," Journal of Computational Chemistry, vol. 32, no. 6, pp. 1117–1127, 2011. (page 108).
- [124] Y. Zhao and D. G. Truhlar, "The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements : two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals," Theoretical Chemistry Accounts, vol. 120, pp. 215–241, May 2008. (pages 108, 111).
- [125] C. J. Cramer and D. G. Truhlar, "Density functional theory for transition metals and transition metal chemistry," Physical Chemistry Chemical Physics, vol. 11, no. 46, p. 10757, 2009. (pages 108, 111).

- [126] L. M. Lawson Daku, F. Aquilante, T. W. Robinson, and A. Hauser, "Accurate spin-state energetics of transition metal complexes. 1. ccsd (t), caspt2, and dft study of  $[m(\text{nch})_6]^{2+}$  ( $m = \text{Fe, Co}$ )," *Journal of chemical theory and computation*, vol. 8, no. 11, pp. 4216–4231, 2012. (pages 108, 111).
- [127] J. P. Perdew, K. Burke, and M. Ernzerhof, "Generalized gradient approximation made simple," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 77, pp. 3865–3868, Oct 1996. (pages 108, 111).
- [128] F. Weigend and R. Ahlrichs, "Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn : Design and assessment of accuracy," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 7, no. 18, p. 3297, 2005. (page 109).
- [129] P. J. Hay and W. R. Wadt, "Ab initio effective core potentials for molecular calculations. potentials for the transition metal atoms sc to hg," *The Journal of chemical physics*, vol. 82, no. 1, pp. 270–283, 1985. (page 109).
- [130] M. Frisch, G. Trucks, H. Schlegel, G. Scuseria, M. Robb, J. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. Petersson, H. Nakatsuji, et al., "Gaussian 16, revision c. 01. gaussian, inc., wallingford ct. 2016," *Google Scholar* There is no corresponding record for this reference, 2020. (page 109).
- [131] J. Hutter, M. Iannuzzi, F. Schiffmann, and J. VandeVondele, "cp2k : atomistic simulations of condensed matter systems," *Wiley Interdisciplinary Reviews : Computational Molecular Science*, vol. 4, no. 1, pp. 15–25, 2014. (page 109).
- [132] B. Zhang and B. Yan., "Analytical strategies for characterizing the surface chemistry of nanoparticles," *Anal Bioanal Chem*, p. 973–982, 2010. (page 110).
- [133] S. Slabzhennikov, O. Ryabchenko, and L. Kuarton, "Normal vibration calculations for iron tris (acetylacetonate)," *Russian Journal of Coordination Chemistry*, vol. 29, no. 7, pp. 484–488, 2003. (page 110).
- [134] P. Guardia, N. Pérez, A. Labarta, and X. Batlle, "Controlled synthesis of iron oxide nanoparticles over a wide size range," *Langmuir*, vol. 26, no. 8, pp. 5843–5847, 2010. (page 110).
- [135] L. MacAleese and P. Maître, "Infrared spectroscopy of organometallic ions in the gas phase : From model to real world complexes," *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 26, no. 4, pp. 583–605, 2007. (page 110).
- [136] J. Oomens, N. C. Polfer, G. Berden, and J. R. Eyler, "Gas-phase metal ion chelation investigated with IRMPD spectroscopy : A brief review of Robert Dunbar's contributions," *European Journal of Mass Spectrometry*, vol. 25, pp. 86–96, Feb. 2019. (page 110).
- [137] M. A. Duncan, "Infrared spectroscopy to probe structure and dynamics in metal ion-molecule complexes," *International Reviews in Physical Chemistry*, vol. 22, no. 2, pp. 407–435, 2003. (page 110).
- [138] P. Sharpe and D. E. Richardson, "Metal-ligand bond energies and solvation energies for gas-phase transition-metal tris(acetylacetonate) complexes and their negative ions," p. 8. (page 110).

- [139] S. Hoyau, K. Norrman, T. B. McMahon, and G. Ohanessian, "A Quantitative Basis for a Scale of  $\text{Na}^+$  Affinities of Organic and Small Biological Molecules in the Gas Phase," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 121, pp. 8864–8875, Sept. 1999. (page 110).
- [140] S. Le Caër, M. Heninger, J. Lemaire, P. Boissel, P. Maitre, and H. Mestdagh, "Structural characterization of selectively prepared cationic iron complexes bearing monodentate and bidentate ether ligands using infrared photodissociation spectroscopy," *Chemical Physics Letters*, vol. 385, pp. 273–279, Feb. 2004. (page 110).
- [141] D. J. Miller and J. M. Lisy, "Hydrated Alkali-Metal Cations : Infrared Spectroscopy and ab Initio Calculations of  $\text{M}^+ (\text{H}_2\text{O})_{x=25}$  Ar cluster ions for  $\text{M} = \text{Li}, \text{Na}, \text{K},$  and  $\text{Cs}$ ," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 130, pp. 15381–15392, Nov. 2008. (page 110).
- [142] A. Fielicke, G. von Helden, G. Meijer, B. Simard, S. Dénommée, and D. M. Rayner, "Vibrational Spectroscopy of CO in Gas-Phase Rhodium ClusterCO Complexes," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 125, pp. 11184–11185, Sept. 2003. (page 110).
- [143] M. J. van Stipdonk, P. Basu, S. A. Dille, J. K. Gibson, G. Berden, and J. Oomens, "Infrared Multiple Photon Dissociation Spectroscopy of a Gas-Phase Oxo-Molybdenum Complex with 1,2-Dithiolene Ligands," *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 118, pp. 5407–5418, July 2014. (page 110).
- [144] N. C. Polfer, J. Oomens, D. T. Moore, G. von Helden, G. Meijer, and R. C. Dunbar, "Infrared Spectroscopy of Phenylalanine  $\text{Ag}(\text{I})$  and  $\text{Zn}(\text{II})$  Complexes in the Gas Phase," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, pp. 517–525, Jan. 2006. (page 110).
- [145] R. Otsuka, K. Hirata, Y. Sasaki, J. M. Lisy, S.-i. Ishiuchi, and M. Fujii, "Alkali and alkaline earth metal ions complexes with a partial peptide of the selectivity filter in  $\text{K}^+$  channels studied by a cold ion trap infrared spectroscopy," *ChemPhysChem*, vol. 21, no. 8, pp. 712–724, 2020. (page 110).
- [146] C. Kapota, J. Lemaire, P. Maître, and G. Ohanessian, "Vibrational Signature of Charge Solvation vs Salt Bridge Isomers of Sodiated Amino Acids in the Gas Phase," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 126, pp. 1836–1842, Feb. 2004. (page 110).
- [147] G. C. Boles, C. J. Owen, G. Berden, J. Oomens, and P. B. Armentrout, "Experimental and theoretical investigations of infrared multiple photon dissociation spectra of glutamic acid complexes with  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$ ," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 19, pp. 12394–12406, 2017. (page 110).
- [148] A. Günther, P. Nieto, G. Berden, J. Oomens, and O. Dopfer, "Irrmpd spectroscopy of metalated flavins : structure and bonding of  $\text{mq}^+$ -lumichrome complexes ( $\text{mq}^+ = \text{Li}^+ - \text{Cs}^+, \text{Ag}^+, \text{Mg}^{2+}$ )," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 16, pp. 14161–14171, 2014. (page 110).
- [149] K. J. Houthuijs, J. Martens, A. G. Arranja, G. Berden, J. F. W. Nijsen, and J. Oomens, "Characterization of holmium (iii)-acetylacetonate complexes derived from therapeutic microspheres by infrared ion spectroscopy," *Physical*

- Chemistry Chemical Physics, vol. 22, no. 27, pp. 15716–15722, 2020. (page [110](#)).
- [150] A. Schäfer, H. Horn, and R. Ahlrichs, “Fully optimized contracted gaussian basis sets for atoms li to kr,” The Journal of Chemical Physics, vol. 97, no. 4, pp. 2571–2577, 1992. (page [111](#)).
- [151] S. F. Sousa, P. A. Fernandes, and M. J. Ramos, “General performance of density functionals,” The Journal of Physical Chemistry A, vol. 111, no. 42, pp. 10439–10452, 2007. (page [113](#)).
- [152] Y. Lu and W. Chen, “Sub-nanometre sized metal clusters : from synthetic challenges to the unique property discoveries,” Chem. Soc. Rev., vol. 41, pp. 3594–3623, 2012. (page [123](#)).
- [153] L. Shang, S. Dong, and G. U. Nienhaus, “Ultra-small fluorescent metal nanoclusters : Synthesis and biological applications,” Nano Today, vol. 6, no. 4, pp. 401–418, 2011. (page [123](#)).
- [154] F. Bertorelle, I. Russier-Antoine, N. Calin, C. Comby-Zerbino, A. Bensalah-Ledoux, S. Guy, P. Dugourd, P.-F. Brevet, Sanader, M. Krstić, V. Bonačić-Koutecký, and R. Antoine, “Au<sub>10</sub> (SG)<sub>10</sub> : A Chiral Gold Catenane Nanocluster with Zero Confined Electrons. Optical Properties and First-Principles Theoretical Analysis,” The Journal of Physical Chemistry Letters, vol. 8, pp. 1979–1985, May 2017. (pages [125](#), [133](#), [134](#), [134](#)).
- [155] R. Antoine, “Atomically precise clusters of gold and silver : A new class of nonlinear optical nanomaterials,” Frontier Research Today, vol. 1, p. 1001, Sept. 2018. Publisher : Frontier Research Today S.A. (page [125](#)).
- [156] X.-D. Zhang, Z. Luo, J. Chen, X. Shen, S. Song, Y. Sun, S. Fan, F. Fan, D. T. Leong, and J. Xie, “Ultrasmall Au<sub>1012</sub>(SG)<sub>1012</sub> Nanomolecules for High Tumor Specificity and Cancer Radiotherapy,” Advanced Materials, vol. 26, no. 26, pp. 4565–4568, 2014. \_eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/adma.201400866>. (pages [125](#), [126](#)).
- [157] L. C. McKenzie, T. O. Zaikova, and J. E. Hutchison, “Structurally Similar Triphenylphosphine-Stabilized Undecagolds, Au<sub>11</sub> (PPh<sub>3</sub>)<sub>7</sub> Cl<sub>3</sub> and [Au<sub>11</sub> (PPh<sub>3</sub>)<sub>8</sub> Cl<sub>2</sub>]Cl, Exhibit Distinct Ligand Exchange Pathways with Glutathione,” Journal of the American Chemical Society, vol. 136, pp. 13426–13435, Sept. 2014. (page [129](#)).
- [158] C. F. Correia, P. O. Balaj, D. Scuderi, P. Maitre, and G. Ohanessian, “Vibrational Signatures of Protonated, Phosphorylated Amino Acids in the Gas Phase,” Journal of the American Chemical Society, vol. 130, pp. 3359–3370, Mar. 2008. (page [131](#)).
- [159] D. Scuderi, E. Bodo, B. Chiavarino, S. Fornarini, and M. E. Crestoni, “Amino acid oxidation : A combined study of cysteine oxo forms by irmpd spectroscopy and simulations,” Chemistry – A European Journal, vol. 22, no. 48, pp. 17239–17250, 2016. (page [131](#)).
- [160] Y. Liu, Z. Tian, and L. Cheng, “Size evolution and ligand effects on the structures and stability of (aul)<sub>n</sub> (l = cl, sh, sch<sub>3</sub>, ph<sub>2</sub>, p(ch<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, n = 1–13) clusters,” RSC Adv., vol. 6, pp. 4705–4712, 2016. (pages [133](#), [134](#)).

- [161] M. Katari, E. Nicol, V. Steinmetz, G. van der Rest, D. Carmichael, and G. Frison, "Improved infrared spectra prediction by dft from a new experimental database," Chemistry—A European Journal, vol. 23, no. 35, pp. 8414–8423, 2017. (page 137).
- [162] Y. Minenkov, Å. Singstad, G. Occhipinti, and V. R. Jensen, "The accuracy of dft-optimized geometries of functional transition metal compounds : a validation study of catalysts for olefin metathesis and other reactions in the homogeneous phase," Dalton Transactions, vol. 41, no. 18, pp. 5526–5541, 2012. (page 137).
- [163] Y. Xie, X. Wang, X. Han, X. Xue, W. Ji, Z. Qi, J. Liu, B. Zhao, and Y. Ozaki, "Sensing of polycyclic aromatic hydrocarbons with cyclodextrin inclusion complexes on silver nanoparticles by surface-enhanced raman scattering," Analyst, vol. 135, no. 6, pp. 1389–1394, 2010. (page 139).
- [164] I. Tijunelyte, N. Dupont, I. Milosevic, C. Barbey, E. Rinnert, N. Lidgi-Guigui, E. Guenin, and M. L. de La Chapelle, "Investigation of aromatic hydrocarbon inclusion into cyclodextrins by raman spectroscopy and thermal analysis," Environmental Science and Pollution Research, vol. 24, no. 35, pp. 27077–27089, 2017. (page 139).
- [165] P. Langevin, "L'ionization des gaz," Ann. Chim. Phys, vol. 28, pp. 289–384, 1903. (page 140).
- [166] M. Langevin, "Une formule fondamentale de théorie cinétique," in Annales de chimie et de physique, Series, vol. 5, pp. 245–288, 1905. (page 140).
- [167] J. H. Mitchell, K. E. W. Ridler, and A. M. Tyndall, "The speed of positive ions in nitrogen," Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character, vol. 146, no. 859, pp. 911–921, 1934. (page 140).
- [168] Kinetic Theory of Mobility and Diffusion : Section 5.3, ch. 5, pp. 193–224. John Wiley Sons, Ltd, 1988. (page 140).
- [169] Kinetic Theory of Mobility and Diffusion : Sections 5.1 – 5.2, ch. 5, pp. 137–193. John Wiley Sons, Ltd, 1988. (page 140).
- [170] Appendix II : Tables of Transport Cross Sections for Model Potentials, pp. 499–529. John Wiley Sons, Ltd, 1988. (page 140).
- [171] S. Lee, T. Wyttenbach, and M. T. Bowers, "Gas phase structures of sodiated oligosaccharides by ion mobility/ion chromatography methods," International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, vol. 167-168, pp. 605–614, 1997. (page 140).
- [172] J. A. McLean, B. T. Ruotolo, K. J. Gillig, and D. H. Russell, "Ion mobility–mass spectrometry : a new paradigm for proteomics," International Journal of Mass Spectrometry, vol. 240, no. 3, pp. 301–315, 2005. (page 140).
- [173] P. Dwivedi, C. Wu, L. M. Matz, B. H. Clowers, W. F. Siems, and H. H. Hill, "Gas-Phase Chiral Separations by Ion Mobility Spectrometry," Analytical Chemistry, vol. 78, pp. 8200–8206, Dec. 2006. Publisher : American Chemical Society. (page 140).

- [174] B. H. Clowers, P. Dwivedi, W. E. Steiner, H. H. Hill, and B. Bendiak, "Separation of sodiated isobaric disaccharides and trisaccharides using electrospray ionization-atmospheric pressure ion mobility-time of flight mass spectrometry," *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 16, no. 5, pp. 660–669, 2005. (page 140).
- [175] B. T. Ruotolo, S.-J. Hyung, P. M. Robinson, K. Giles, R. H. Bateman, and C. V. Robinson, "Ion mobility–mass spectrometry reveals long-lived, unfolded intermediates in the dissociation of protein complexes," *Angewandte Chemie*, vol. 119, no. 42, pp. 8147–8150, 2007. (page 140).
- [176] D. E. Clemmer, R. R. Hudgins, and M. F. Jarrold, "Naked Protein Conformations : Cytochrome c in the Gas Phase," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 117, pp. 10141–10142, Oct. 1995. (page 140).
- [177] F. Albrieux, "Etude conformationnelle de peptides et protéines," p. 201. (page 142).
- [178] A.-L. Simon, F. Chirot, C. M. Choi, C. Clavier, M. Barbaire, J. Maurelli, X. Dagan, L. MacAleese, and P. Dugourd, "Tandem ion mobility spectrometry coupled to laser excitation," *Review of Scientific Instruments*, vol. 86, p. 094101, Sept. 2015. (page 144).
- [179] S. A. Ewing, M. T. Donor, J. W. Wilson, and J. S. Prell, "Collidoscope : An Improved Tool for Computing Collisional Cross-Sections with the Trajectory Method," *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 28, pp. 587–596, Apr. 2017. (page 145).
- [180] M. F. Mesleh, J. M. Hunter, A. A. Shvartsburg, G. C. Schatz, and M. F. Jarrold, "Structural Information from Ion Mobility Measurements : Effects of the Long-Range Potential," p. 5. (page 145).
- [181] E. M. M. D. Valle, "Cyclodextrins and their uses : a review," *Process Biochemistry*, vol. 39, no. 9, pp. 1033–1046, 2004. (page 146).
- [182] "Applications of cyclodextrins in cosmetic products : A review," *JOURNAL OF COSMETIC SCIENCE*, p. 7. (page 146).
- [183] "Density functional calculations on cyclodextrins," vol. 139, pp. 363–371, Apr. 2008. (page 149).
- [184] J. J. Gamboa-Carballo, V. K. Rana, J. Levalois-Grützmacher, S. Gaspard, and U. Jáuregui-Haza, "Structures and stabilities of naturally occurring cyclodextrins : a theoretical study of symmetrical conformers," *Journal of Molecular Modeling*, vol. 23, p. 318, Nov. 2017. (page 149).
- [185] P. Sigmund, "Stopping of heavy ions, vol. 204 of springer tracts of modern physics," 2004. (page 166).
- [186] U. Weinrich, "Gantry Design for Proton and Carbon Hadrontherapy Facilities," p. 5, 2006. (page 167).
- [187] B. Fayard, A. Touati, F. Abel, M. A. Herve du Penhoat, I. Despiney-Bailly, F. Gobert, M. Ricoul, A. L'Hoir, M. F. Politis, M. A. Hill, D. L. Stevens, L. Sabatier, E. Sage, D. T. Goodhead, and A. Chetioui, "Cell Inactivation and Double-Strand Breaks : The Role of Core Ionizations, as Probed by Ultrafast X Rays," *Radiation Research*, vol. 157, pp. 128–140, Feb. 2002. (page 166).

- [188] M. A. H. d. Penhoat, B. Fayard, F. Abel, A. Touati, F. Gobert, I. Despiney-Bailly, M. Ricoul, L. Sabatier, D. L. Stevens, M. A. Hill, D. T. Goodhead, and A. Chetioui, "Lethal Effect of Carbon K-Shell Photoionizations in Chinese Hamster V79 Cell Nuclei : Experimental Method and Theoretical Analysis," *Radiation Research*, vol. 151, pp. 649–658, June 1999. (page 166).
- [189] F. Gobert, M. Lamoureux, M. H. du Penhoat, M. Ricoul, A. Boissière, A. Touati, F. Abel, M. Politis, B. Fayard, J. M. Guigner, L. Martins, I. Testard, L. Sabatier, and A. Chetioui, "Chromosome aberrations and cell inactivation induced in mammalian cells by ultrasoft x-rays : correlation with the core ionizations in dna," *International Journal of Radiation Biology*, vol. 80, no. 2, pp. 135–145, 2004. (page 166).
- [190] B. Boudaiffa, P. Cloutier, D. Hunting, M. A. Huels, and L. Sanche, "Resonant Formation of DNA Strand Breaks by Low-Energy (3 to 20 eV) Electrons," *Science*, vol. 287, pp. 1658–1660, Mar. 2000. (page 166).
- [191] B. Liu, S. B. Nielsen, P. Hvelplund, H. Zettergren, H. Cederquist, B. Manil, and B. A. Huber, "Collision-induced dissociation of hydrated adenosine monophosphate nucleotide ions : Protection of the ion in water nanoclusters," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 97, p. 133401, Sep 2006. (page 168).
- [192] S. Bari, P. Sobocinski, J. Postma, F. Alvarado, R. Hoekstra, V. Bernigaud, B. Manil, J. Rangama, B. Huber, and T. Schlathölter, "Fragmentation of - and -alanine molecules by ions at bragg-peak energies," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 128, no. 7, p. 074306, 2008. (page 168).
- [193] S. Ptasíńska, S. Denifl, V. Grill, T. D. Märk, P. Scheier, S. Gohlke, M. A. Huels, and E. Illenberger, "Bond-selective h ion abstraction from thymine," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 44, no. 11, pp. 1647–1650, 2005. (page 168).
- [194] T. Schlathölter, F. Alvarado, S. Bari, A. Lecointre, R. Hoekstra, V. Bernigaud, B. Manil, J. Rangama, and B. Huber, "Ion-induced biomolecular radiation damage : From isolated nucleobases to nucleobase clusters," *ChemPhysChem*, vol. 7, no. 11, pp. 2339–2345, 2006. (page 168).
- [195] C. von Sonntag et al., *The chemical basis of radiation biology*. Taylor & Francis London, 1987. (page 169).
- [196] C. von Sonntag, *Free-radical-induced DNA damage and its repair*. Springer, 2006. (page 169).
- [197] E. Alizadeh and L. Sanche, "Low-energy-electron interactions with DNA : approaching cellular conditions with atmospheric experiments," *The European Physical Journal D*, vol. 68, p. 97, Apr. 2014. (page 170).
- [198] K. T. Butterworth, S. J. McMahon, F. J. Currell, and K. M. Prise, "Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization," *Nanoscale*, vol. 4, no. 16, p. 4830, 2012. (page 171).
- [199] R. Geller, "Electron cyclotron resonance ion sources and ecr plasmas, edited by inst," 1996. (page 171).



**Titre :**

Contributions au développement d'une nouvelle technique de mise en phase gazeuse pour l'étude de la structure et l'endommagement de biomolécules.

**Résumé :**

Il existe un lien étroit entre la structure et la fonction des biomolécules, et déterminer leur structure est donc d'un intérêt capital. Les techniques de mise en phase gazeuse couplées à la spectrométrie de masse permettent d'étudier ces structures. Dans cette thèse, je présente le travail du développement instrumental d'une source de mise en phase gazeuse par désorption laser sur microgouttelettes. Cette technique originale possède les avantages des sources usuelles (ESI et MALDI) pour isoler de manière « douce » des molécules en phase gazeuse. Elle possède également un avantage majeur pour les études de l'endommagement de biomolécules à l'échelle moléculaire par la possibilité d'irradier en phase liquide ces molécules d'intérêt biologiques. Ceci ouvre une voie pour l'irradiation des biomolécules dans un milieu complexe, en présence de radio-sensibilisateurs vectorisés par exemple. En parallèle de ce travail de développement expérimental, je présente les résultats de simulations de trajectoires d'ion dans un dispositif d'extraction retardée couplé à un spectromètre de masse par temps de vol. Ces simulations ont pour objectif de mieux comprendre les caractéristiques des ions éjectés lors de la désorption.

Un axe de recherche complémentaire, utilisant des expériences de spectroscopie de dissociation induite par absorption multi-photonique dans l'infrarouge et de spectrométrie de mobilité ionique m'a permis de mener des études structurales sur des complexes organo-métalliques, des nano-agrégats d'or et des complexes d'inclusion entre des macromolécules et des principes actifs. La discussion de la structure de ces grands systèmes est rendue possible par la combinaison de ces différentes techniques et par comparaison avec des spectres simulés via des calculs de chimie quantique.

**Mots clés :**

Désorption laser, Spectrométrie de masse, Biomolécules en phase gazeuse, Complexes organométalliques, Nanoagrégats, Complexes d'inclusion, IRMPD, Spectrométrie de mobilité ionique, Calculs de chimie quantique.

**Title :**

Contributions to the development of a new gas phase technique for the study of the structure and damage of biomolecules.

**Abstract :**

The link between the structure and the function of biomolecules is a close one, and it is then important to determine their structure. Gas-phase techniques coupled to mass spectrometry allow to study these structures. In this thesis, I present the instrumental development of a gas phase source by laser desorption on micro droplets. This original technique has the advantages of the usual sources (ESI and MALDI) to isolate in a "soft" way molecules in gas phase. It also has a major advantage for the study of biomolecule damage at the molecular level by the possibility to irradiate in liquid phase these molecules of biological interest. This opens a way for the irradiation of biomolecules in a complex environment, in the presence of vectorized radiosensitizers for instance. In parallel of this instrumental development, I present the results of simulations of ion trajectories in a delayed extraction device coupled to a time-of-flight mass spectrometer. The goal of these simulations is to better understand the characteristics of the ions ejected during desorption.

A complementary line of research, using infrared multiphoton dissociation spectroscopy experiments and ion mobility spectrometry allowed me to study the structures of organometallic complexes, gold nanoclusters and inclusion complexes between macromolecules and active principles. The discussion of the global structure of these large systems is possible by combining these different techniques and by comparison with quantum chemistry calculations.

**Keywords :**

Laser desorption, Mass spectrometry, Gas phase biomolecules, Organometallic complexes, Nano-clusters, Inclusion complexes, IRMPD, Ion mobility spectrometry, Quantum chemistry calculations.