



HAL
open science

Processus radio-induits dans des systèmes moléculaires d'intérêt biologique isolés

Jean-Christophe Pouilly

► **To cite this version:**

Jean-Christophe Pouilly. Processus radio-induits dans des systèmes moléculaires d'intérêt biologique isolés : Vers plus de pertinence biologique. Biophysique. Université de Caen Normandie, 2022. tel-03940897

HAL Id: tel-03940897

<https://hal.science/tel-03940897>

Submitted on 16 Jan 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

HABILITATION À DIRIGER DES RECHERCHES

Processus radio-induits dans des systèmes moléculaires d'intérêt biologique isolés

Vers plus de pertinence biologique

Jean-Christophe POULLY

Diplôme délivré par l'Université de Caen Normandie suite à la soutenance du 14/02/2022 devant le jury composé de :

- **Gilles Ohanessian (Président)**
- **Isabelle Compagnon (Rapporteuse)**
- **Niloufar Shafizadeh (Rapporteuse)**
- **Serge Martin (Rapporteur)**
- **Benoît Gervais (Garant)**

Table des matières

Chapitre 1 : Introduction	3
Chapitre 2 : Nouvelles approches expérimentales pour l'étude de petites molécules neutres	10
I) Mesurer l'énergie des états excités de nucléobases de l'ADN et de l'ARN	10
II) Une nouvelle source de molécules à désorption par laser continu pour l'étude de nucléosides de l'ADN et de l'ARN.....	14
Chapitre 3 : Influence de la nanohydratation sur les processus induits par l'ionisation de bases de l'ADN/ARN	18
I) Fragmentation et réarrangement d'agrégats d'adénine nanohydratés	18
II) Évaporation d'eau à partir d'agrégats de thymine hydratés ionisés	21
Chapitre 4 : Influence d'un environnement moléculaire non-covalent autre que le solvant.....	26
I) Ionisation et fragmentation d'agrégats d'acides aminés et d'acide lactique par collision avec des faisceaux d'ions	26
II) Dissociation de petits peptides nanosolvatés après transfert d'électron du sodium.....	32
III) Implication de l'éther-couronne dans les processus induits par la capture ou le transfert d'électron dans des tripeptides protonés	35
Chapitre 5 : Augmentation de la taille du système et de la pertinence biologique.....	45
I) Étude structurale de modèles peptidiques du collagène isolés.....	45
II) Irradiation de modèles peptidiques du collagène	56
1. Processus induits par l'absorption d'un photon VUV ou X	58
a) Peptides isolés	58
b) Triples hélices.....	60
2. Processus induits par la collision avec un ion carbone à l'énergie du pic de Bragg.....	66
III) Perspectives	68
Chapitre 6 : Conclusion.....	70
Chapitre 7 : De nouvelles observables grâce à de nouveaux outils expérimentaux.....	71
I) Mesure résolue en temps de processus radio-induits : expériences pompe-sonde couplant XFEL et piège à ions	71
II) Dénaturation radio-induite de brins d'ADN et protéines : expériences couplant la spectrométrie de mobilité ionique et les rayonnements ionisants	72

Chapitre 1 : Introduction

Une plaisanterie connue des physiciens est la suivante : un fermier dont la vache ne produit plus de lait va demander de l'aide à l'université, et un physicien théoricien planche pendant deux semaines sur le problème, noircissant des pages d'équations. Il revient enfin vers le fermier, en lui disant : « J'ai trouvé la solution ! Je vais vous expliquer en détail : tout d'abord, supposons que votre vache est sphérique et dans le vide... » Ce manuscrit parle d'un domaine de recherche dans lequel cette supposition devient (presque) réalité puisque ce sont des molécules d'intérêt biologique qui se trouvent sous vide... L'intérêt est effectivement de simplifier le problème et de mieux contrôler l'état du système en l'isolant, ce qui veut dire le faire passer de la phase condensée (solide ou liquide) à la phase gazeuse, donc expérimentalement le mettre dans une chambre séparée de l'atmosphère, et où le vide aura été préalablement fait. C'est techniquement possible depuis plusieurs siècles grâce à des pompes telles que celle inventée par Sprengel au XIX^e siècle,¹ ce qui a permis dès le début du XX^e siècle d'étudier des molécules en phase gazeuse, une étape très importante ayant été franchie lors de l'implémentation de la spectrométrie de masse dans les montages expérimentaux.² Depuis, le chemin parcouru a été considérable, et la physique-chimie moléculaire en phase gazeuse est à présent un domaine de recherche extrêmement actif au niveau mondial, en particulier en ce qui concerne les systèmes biomoléculaires. Certaines techniques sont même devenues routinières dans les laboratoires de biologie, notamment moléculaire, comme le séquençage et l'identification des protéines par spectrométrie de masse. Plus récemment, le couplage de cette dernière à la spectrométrie de mobilité ionique a permis d'étendre encore les possibilités d'analyse, notamment de mélanges complexes, grâce à l'ajout d'une dimension structurale.³ Justement, parmi les propriétés moléculaires des systèmes biologiques, la structure géométrique a une place de choix, à cause du lien étroit qu'elle possède avec l'activité biologique. Par exemple, la double hélice de l'ADN est cruciale pour la conservation, la transmission et l'utilisation de l'information génétique par les organismes vivants, notamment la traduction en protéines par le ribosome. De plus, ces dernières doivent se replier et adopter leur structure native pour devenir actives, et un mauvais repliement peut induire des maladies telles que celles d'Alzheimer ou de Parkinson. Les études structurales peuvent être menées expérimentalement grâce aux techniques de spectroscopie IR et de mobilité ionique couplées à la spectrométrie de masse, comme je l'ai fait pendant ma thèse.⁴ Un autre intérêt d'isoler les molécules est de pouvoir, dans certains cas, appliquer des méthodes théoriques d'un niveau suffisamment élevé (notamment de chimie quantique) pour simuler des propriétés moléculaires et ainsi les comparer avec l'expérience, ce qui permet une grande compréhension des phénomènes. C'est notamment le cas dans le domaine de l'interaction rayonnement-matière, par exemple pour décrire les processus qui sont déclenchés par l'ionisation d'un système moléculaire tel qu'un dimère d'uracile, une nucléobase de l'ARN, dans lequel des calculs de structure électronique comparés à des résultats expérimentaux ont montré qu'un transfert de proton intermoléculaire se produit en l'absence de liaison H.⁵ Cependant, le simple fait d'étudier du point de vue physico-chimique des molécules ou des briques élémentaires de molécules présentes dans des organismes vivants n'a pas forcément d'intérêt pour les biologistes, c'est pourquoi lors de mon arrivée au laboratoire, j'ai profité de la présence de radiobiologistes au sein du GANIL pour initier une collaboration qui s'est notamment réalisée à travers le projet IRHEMME (IRradiation du cartilage lors d'une Hadronthérapie: Effets bystander, Modifications structurales et Fragmentation de la Matrice Extracellulaire). Ces recherches, dont je reparlerai dans le Chapitre 5, s'inscrivent dans un effort international visant à comprendre les bases physiques et chimiques de l'interaction entre matière biologique et rayonnements ionisants, cette interaction se produisant par exemple lors de certains traitements contre le cancer comme la radiothérapie et l'hadronthérapie.⁶ Ces dernières consistent à envoyer un faisceau hautement énergétique de photons ou d'ions, respectivement, dans une tumeur pour la détruire grâce au dépôt d'énergie induit par l'ionisation de la matière. On parle

souvent de dose déposée : c'est la quantité d'énergie par unité de masse, et donc de volume si la masse volumique est uniforme. Ce dépôt de dose est non-uniforme : il dépend de la distance parcourue par la particule ionisante dans la matière, comme le montre la Figure 1. Pour les photons, la dose augmente rapidement avec la profondeur jusqu'à un maximum situé à quelques centimètres, et diminue doucement. La situation est très différente pour les ions à une énergie cinétique de l'ordre de 100 MeV/u : la dose est d'abord quasiment constante, puis augmente rapidement jusqu'à atteindre un maximum étroit, appelé le pic de Bragg, et tombe à zéro lorsque les protons s'arrêtent. Pour les ions carbones, la fragmentation du noyau induit la formation d'ions plus légers qui s'arrêtent après les carbones, ce qui donne naissance à une petite dose résiduelle après le pic de Bragg. Celui-ci permet donc en principe de cibler la tumeur dans la direction du faisceau incident afin de la détruire, tout en diminuant la dose reçue par les tissus sains environnants en comparaison avec les photons. Un autre avantage de l'hadronthérapie est la moindre diffusion latérale des ions et donc la plus grande précision du dépôt de dose. Le proton est l'ion le plus utilisé jusqu'à présent pour ce type de traitement, dans des centres médicaux tels que CYCLHAD qui vient d'être construit à Caen, juste à côté du GANIL. À terme, ce centre inclura également un cyclotron pouvant accélérer des ions autres que le proton, pour réaliser des programmes de recherche en physique, chimie, biologie et médecine dirigés vers l'hadronthérapie. En effet, un meilleur contrôle du traitement nécessite un effort pluridisciplinaire, et en particulier de mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents. Je vais donc à présent introduire le contexte des recherches sur l'irradiation des molécules en phase gazeuse par des rayonnements ionisants.

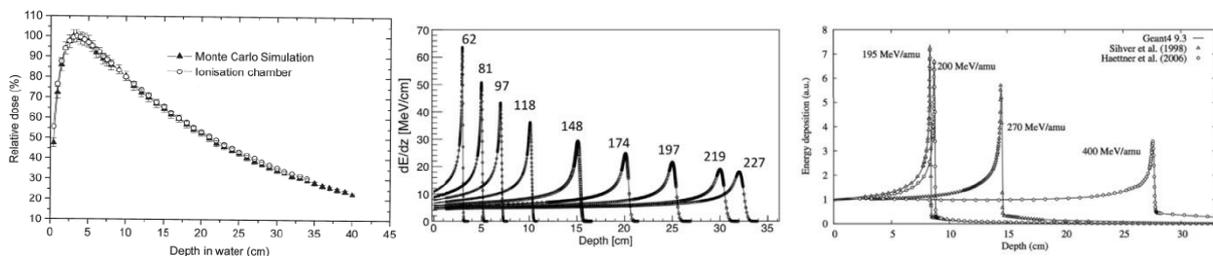


Figure 1 : dose relative en fonction de la profondeur dans l'eau mesurée et simulée pour un faisceau de photons issu d'un accélérateur d'électrons à une énergie cinétique de 15 MeV⁷ (à gauche) ; pouvoir d'arrêt de protons en fonction de la profondeur dans l'eau mesuré et simulé pour des faisceaux d'énergies cinétiques différentes indiquées en MeV/u (au milieu) ; pouvoir d'arrêt d'ions carbones en fonction de la profondeur dans l'eau mesuré et simulé avec le logiciel Géant4 pour un faisceau d'énergies cinétiques différentes⁸ (à droite).

L'étude des collisions entre faisceaux d'ions atomiques accélérés et systèmes atomiques et moléculaires en phase gazeuse remonte aux années 1950, les techniques utilisées venant de la Physique nucléaire et des particules, très présentes en Normandie depuis la construction de la centrale nucléaire de Flamanville et l'usine de retraitement de la Hague, et ayant connu un essor majeur à partir de la seconde guerre mondiale. Une expérience typique consistait par exemple à envoyer un faisceau d'ions He⁺ accélérés par un générateur van de Graaff à une énergie de l'ordre de 100 keV sur une vapeur d'hydrogène, et à analyser l'effet de la collision sur la charge des particules d'hélium grâce à des déviateurs électrostatiques situés après la cellule de collision. Des phénomènes de capture d'électron pouvaient alors être détectés et quantifiés en termes de section efficace. Quand l'angle et l'énergie cinétique des électrons de basse énergie, délicats à détecter correctement à cause notamment du champ magnétique de la Terre et de leur sensibilité aux champs électriques faibles, ont pu être mesurés, l'ionisation de la cible a commencé à être étudiée.⁹ La spectrométrie de masse a également été utilisée afin de connaître le rapport m/z des produits ioniques issus de l'atome ou de la molécule cible après la collision. De plus, le développement des techniques de mesure des particules en coïncidence a permis de détecter des ions ou/et électrons de la cible et du projectile en coïncidence, et

donc par exemple de connaître simultanément le nombre d'électrons capturés par le projectile et le rapport m/z des ions de la cible créés lors d'une collision donnée. Cette technique a notamment été appliquée à la mesure de l'énergie cinétique perdue par l'ion projectile et donc transférée à la molécule cible, pour chaque voie de fragmentation.¹⁰ Dans les années 80, les détecteurs de particules munis d'anodes à lignes à retard ont rendu possible la mesure de la position des projectiles ou/et des ions de la cible, et ainsi notamment la reconstruction des vecteurs quantité de mouvement des ions de la cible émis lors de la collision entre un ion et un système poly-atomique simple, grâce aux systèmes d'acquisition des données qui permettent un couplage entre la détection de la position et du temps d'arrivée en coïncidence, et grâce à la conservation de la quantité de mouvement totale. La nouvelle observable est alors l'énergie cinétique de recul (KER) des ions de la cible, qui donne des informations sur l'état électronique de la cible juste avant sa fragmentation en au moins deux ions. Ces techniques sont encore aujourd'hui populaires et ont permis des avancées majeures, par exemple dans la description du phénomène de la relaxation interatomique coulombienne dans les petits agrégats (dimères, trimères) de gaz rare ou de petites molécules produits par jet supersonique, pas seulement dans la communauté de la physique des collisions mais surtout dans celle de la photoionisation.^{11,12} Un autre moyen populaire pour produire une vapeur de molécules est le chauffage dans un four, mais les molécules doivent être peu réactives thermiquement, ce qui réduit la gamme des systèmes accessibles à l'étude. C'est entre autres pour cela qu'une attention particulière a été portée aux fullerènes, leurs propriétés électroniques et géométriques particulières permettant de mettre en évidence des processus de multi-capture électronique et de transfert de charge intra- et intermoléculaires.¹³⁻¹⁶ Les énergies de dissociation du C_{60}^{2+} correspondant à la perte de deux, quatre et six atomes de carbone après collision avec un proton ont notamment été mesurées, et le caractère statistique de la fragmentation a été démontré.¹⁰ En ce qui concerne les molécules d'intérêt biologique, seules des briques élémentaires des protéines et de l'ADN/ARN ont été étudiées avant 2010 : l'ionisation simple et multiple, le transfert de charge, d'énergie et d'atomes, la fragmentation des acides aminés, nucléobases et nucléosides ont été observés.¹⁷⁻²⁴ De plus, leurs agrégats ont permis une première approche dans la compréhension de l'influence d'un environnement moléculaire sur l'ionisation et les phénomènes induits par la collision. J'en donnerai un exemple dans le Chapitre 4. Les premiers travaux d'irradiation de molécules plus grandes que des nucléosides ou des dipeptides ont nécessité l'utilisation de méthodes nouvelles, comme je le détaille dans le paragraphe suivant. Le groupe de T. Schlathölter de l'Université de Groningue (Pays-Bas) a été pionnier en la matière, en publiant en 2010 les résultats de l'irradiation d'un pentapeptide protoné par des faisceaux d'ions H^+ , He^+ et He^{2+} .²⁵ Les spectres de masse sont différents de ceux obtenus par des techniques de fragmentation classiques telles que la dissociation induite par collision avec un gaz inerte (CID), par capture d'électron (ECD) ou par absorption de photon IR ou UV, ce qui est potentiellement intéressant pour l'identification de peptides en protéomique. Par contre, ces spectres ressemblent à ceux que les mêmes auteurs ont publiés légèrement après, issus de l'irradiation par photons VUV de 15 à 20 eV, pour lesquels l'ionisation domine.²⁶ Cela fait penser à une fragmentation gouvernée par l'ionisation, et qui dépend peu du rayonnement ionisant. C'est une illustration de l'intérêt d'étudier plusieurs natures de rayonnement, notamment les ions et les photons, sur les mêmes systèmes : j'en reparlerai au Chapitre 5. Il est donc crucial pour la suite de mettre en perspectives les travaux utilisant les photons ionisants.

Les études de photoionisation de systèmes moléculaires en phase gazeuse ont débuté il y a quelques dizaines d'années, avant que les synchrotrons ne deviennent aussi nombreux, populaires et faciles d'accès, puisqu'on peut trouver des articles sur l'absorption UV multi-photonique de molécules organiques par laser impulsif nanoseconde dès les années 1980.^{27,28} L'ionisation de molécules par faisceaux d'électrons de quelques dizaines d'eV d'énergie cinétique avait commencé bien avant, au début du XX^e siècle, grâce à la facilité technique de réaliser ces faisceaux.² En ce qui concerne les

systèmes d'intérêt biologique ionisés par un seul photon, les travaux du groupe de S. Leach font figure de précurseurs : au début des années 2000, ils ont étudié par spectrométrie de masse l'ionisation et la fragmentation de bases de l'ADN/ARN et d'acides aminés par rayonnement synchrotron.^{29,30} L'avantage de cette source de lumière est de pouvoir balayer l'énergie du photon (la résolution étant de l'ordre de $\frac{\Delta E}{E} \approx 0,1\%$) dans une gamme donnée, et ce de manière continue, ce qui est impossible avec les autres sources aux énergies de photon VUV et X. Ceci a permis la mesure de l'énergie d'ionisation de ces molécules, ainsi que de l'énergie d'apparition de leurs fragments après ionisation, mettant en évidence le transfert d'énergie du photon vers la molécule. Cependant, le mécanisme précis de fragmentation ainsi que le ou les états électroniques impliqués étaient encore inconnus. Par la suite, les techniques de détection d'ion et d'électron en coïncidence ont été utilisées pour mesurer la distribution d'énergie cinétique de l'électron émis lors de la photoionisation à une énergie de photon donnée, pour un ion créé donné. Par exemple, pendant ma thèse, en collaboration avec M. Hochlaf, L. Poisson et le groupe de L. Nahon au synchrotron SOLEIL, nous avons étudié, par spectroscopie électronique et vibrationnelle, la 2-pyridone et la 2-hydroxypyridine, des modèles des bases de l'ADN, autour de leur énergie d'ionisation.³¹ Par ailleurs, la taille des systèmes étudiés a progressivement augmenté, des nucléosides³² aux dipeptides,³³ mais les limites de l'utilisation des fours comme moyen de vaporisation des molécules ont été rapidement atteintes à cause de la fragilité thermique de ces systèmes. L'émergence des techniques de mise en phase gazeuse « douce », telles que les sources électrospray et à désorption laser assistée par matrice, ont permis d'étudier pour la première fois des systèmes beaucoup plus gros isolés et chargés, comme des peptides, protéines, nucléotides ou oligonucléotides d'ADN/ARN. Les premiers à avoir ionisé de tels systèmes avec des photons VUV et X sont les groupes de T. Schlathölter et d'A. Giuliani (Synchrotron SOLEIL). Tous deux ont développé des montages expérimentaux incluant une source électrospray et un piège à ions radiofréquence (RF) de l'ordre d'1 MHz dans lequel les molécules sont irradiées pendant une durée de l'ordre de 100 ms à 1 s, ce qui est nécessaire pour obtenir un signal d'ionisation ou/et de fragmentation car la densité d'ions dans le piège (de l'ordre de 10^{7-8} cm^{-3}) est inférieure d'un facteur 10 à 50 à celle d'un jet moléculaire sortant d'un four. Afin d'irradier uniquement l'ion moléculaire d'intérêt, un quadripôle à RF les sélectionne selon leur rapport masse-sur-charge (m/z) avant qu'ils soient injectés dans le piège. Après l'irradiation, les ions contenus dans le piège sont analysés par un spectromètre de masse, et des informations sur l'effet des rayonnements ionisants peuvent alors être déduites du rapport m/z des produits de l'irradiation. La première étude de ce genre est celle de S. Bari et co.²⁶ sur l'ionisation du peptide leucine-enkephaline protoné par un faisceau de photons VUV du synchrotron BESSY2 (Berlin, Allemagne), dans la gamme d'énergie 8 – 40 eV. L'absorption d'un photon par le peptide mène à la formation de fragments monochargés, principalement les petits ions immoniums. Une claire évolution du spectre de masse est aussi observée lorsque l'énergie du photon augmente, ce qui a été interprété comme une transition de l'excitation vers l'ionisation, étant donné que l'énergie d'ionisation des peptides monochargés avait été mesurée auparavant autour de 11 eV par impact d'électron.³⁴ Par contre, l'ionisation non-dissociative n'avait pas pu être identifiée de manière non-ambiguë. Une preuve directe de ce processus a été fournie peu de temps après cette étude par A. Milosavljevic et co.³⁵ Les auteurs ont mesuré l'énergie d'ionisation d'une protéine (le cytochrome C) à 12,75 eV pour l'état de charge 8+, la seule voie de fragmentation observée étant la perte d'une molécule neutre de masse 44 uma depuis la protéine ionisée. Les mêmes auteurs ont par la suite montré que l'énergie d'ionisation d'une protéine augmente avec sa densité des charges positives.³⁶ Ils ont aussi mesuré les spectres d'absorption X du cytochrome C autour des énergies de liaison des électrons de l'orbitale 1s des atomes C, N et O, et trouvé qu'ils sont très similaires à ceux des protéines en phase condensée.³⁷ Ceci veut dire que les phénomènes d'excitation et d'ionisation à ces énergies (quelques centaines d'eV) après photoabsorption ne sont que peu affectés par

l'environnement moléculaire, et illustre la pertinence des mesures spectroscopiques sur des systèmes en phase gazeuse. De plus, une transition entre ionisation simple et double a été démontrée pour les trois atomes C, N et O au sein du cytochrome C, ce qui a été expliqué par l'existence d'une désexcitation Auger menant à l'émission d'un électron d'énergie cinétique bien précise, après excitation ou éjection d'un électron 1s.

J'ai mentionné au début de cette introduction l'apport que peut constituer la comparaison directe entre les travaux expérimentaux et théoriques dans les études de molécules en phase gazeuse, mais à quel point est-ce le cas pour les processus radio-induits dans les systèmes biomoléculaires ? Autrement dit, est-ce que des calculs peuvent aider à comprendre les résultats expérimentaux, les compléter, les prédire, voire remplacer les expériences ? Ici, je vais d'abord laisser de côté le processus d'ionisation en lui-même, par exemple l'évolution de la section efficace en fonction du nombre d'électrons émis, de l'énergie cinétique du projectile, ou d'un autre paramètre lors d'une collision donnée, et me restreindre à la fragmentation de la molécule cible après ionisation. Je parlerai dans un second temps de travaux visant à simuler les collisions entre ions atomiques et molécules.

Il est important de souligner qu'il existe une large gamme de méthodes théoriques pour traiter la fragmentation moléculaire, allant de l'analyse de résultats expérimentaux par le formalisme statistique de Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus (RRKM), à la simulation temporelle de l'évolution du système par dynamique moléculaire au moyen de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT), en passant par des calculs de chimie quantique statiques. J'ai d'ailleurs récemment utilisé ces derniers pour interpréter les résultats d'expériences de fragmentation métastable du 3-aminophénol après ionisation par absorption UV multi-photonique, en collaboration avec S. Eden (Open University, Milton Keynes, Royaume-Uni).³⁸ La stratégie adoptée est classique, et a déjà été appliquée à de nombreux cas : on calcule l'énergie potentielle de différents réactants, états de transition et produits dans leur état électronique fondamental, puis on en déduit les barrières et énergies de réaction de différentes voies de dissociation. On peut alors par exemple attribuer une formule brute voire un tautomère particulier à un pic donné d'un spectre de masse, dans le cas où le rapport m/z seul est ambigu. De plus, ces calculs peuvent apporter des informations sur la localisation (ou délocalisation) des charges et/ou des électrons célibataires (dans le cas de radicaux), ainsi que sur les mécanismes menant aux fragments observés. Les énergies issues des calculs de chimie quantique peuvent être correctes à quelques pourcents près, si le système n'est pas trop gros et donc le niveau de calcul suffisamment élevé (voir par exemple l'étude du transfert de proton intermoléculaire après photoionisation de dimères d'uracile et ses dérivés⁵). De plus, ces méthodes ne nécessitent aucune connaissance préalable (mis à part la structure géométrique), contrairement aux analyses RRKM, pour lesquelles les énergies relatives sont par exemple nécessaires au calcul des constantes cinétiques de réaction.³⁹ Par contre, aucune de ces méthodes ne permet une simulation temporelle de la fragmentation ni une prise en compte de l'anharmonicité des vibrations. C'est le cas de la dynamique moléculaire par DFT dans l'approximation de Born-Oppenheimer (la vitesse des noyaux est alors négligeable devant celle des électrons). Dans ces simulations, le mouvement des noyaux est décrit classiquement, et la surface d'énergie potentielle est calculée par DFT, à chaque pas (typiquement 0,1 fs) pendant une durée allant jusqu'à la picoseconde. Une gamme de conditions initiales (énergie interne, conformation...) est prise en compte, ce qui permet de sonder l'influence de chaque paramètre sur les processus de fragmentation. Un effort notable et relativement abouti est celui visant à simuler le spectre des molécules organiques après ionisation par impact électronique (voir la revue de Bauer et Grimme⁴⁰). Un autre grand avantage de cette méthode est la possibilité d'explorer la fragmentation dans les états excités du système moléculaire, comme Lopez-Tarifa et co.⁴¹ l'ont fait pour l'uracile doublement ionisé. De plus, des chemins réactionnels contre-intuitifs peuvent être trouvés, étant donné l'absence

de biais dans la simulation. Toutefois, comme je le montrerai dans ce manuscrit, la fragmentation se produit aussi à des temps beaucoup plus longs, de l'ordre de la nanoseconde, microseconde ou même milliseconde. Des méthodes existent pour étendre la durée de ces dynamiques moléculaires, comme l'utilisation d'approximations dans les calculs par DFT : des simulations ont été réalisées durant des centaines de picosecondes sur des hydrocarbures aromatiques polycycliques par exemple.⁴² Lorsqu'on désire aller au-delà, il faut faire appel à des champs de forces réactifs : ils ne décrivent pas les électrons explicitement, mais sont paramétrés pour permettre des ruptures de liaison. Par contre, ces paramètres doivent potentiellement être ajustés lorsqu'on change de système : par exemple, AIREBO a été développé pour les molécules hydrocarbonées.⁴³ À ma connaissance, ce type d'approche n'a pas encore été appliqué aux biomolécules isolées, malgré son intérêt potentiel pour mieux comprendre entre autres les processus de transfert de proton, d'hydrogène voire de méthyle ou de sodium que j'évoquerai tout au long de ce manuscrit. De plus, des systèmes plus gros que les briques élémentaires des protéines et ADN pourraient être étudiés. En revanche, cette méthode est limitée par l'absence de prédiction de voies de fragmentation non-prévues...

Il existe également des simulations de collisions entre ions projectiles et molécules cibles, comme les travaux très récents de Qian et co.⁴⁴ sur la dynamique de fragmentation de la cytosine après collision avec un proton d'énergie cinétique 0,15 – 1 keV. Les auteurs utilisent la DFT dépendante du temps pour décrire les électrons de valence, et la mécanique classique pour les ions. Ils prédisent la capture d'électrons par le proton et la fragmentation de la molécule, et citent un article⁴⁵ que nous avons publié avec le groupe de J. Greenwood (Queen's University, Belfast) suite à une série d'expériences d'irradiation de nucléosides de l'ADN par des protons à 5 keV, dont je reparlerai brièvement dans le Chapitre 2. Très récemment également, une méthode a été développée afin de décrire la fragmentation et la redistribution de l'énergie interne moléculaire après ionisation par collision avec un projectile (ion ou électron).⁴⁶ Elle utilise des dynamiques moléculaires par DFT combinées à des calculs statiques au même niveau, ainsi qu'une méthode statistique M₃C qui maximise l'entropie pour simuler les voies de fragmentation. L'avantage est de pouvoir choisir le projectile (nature et état de charge), et donc de pouvoir comparer les cas de plusieurs d'entre eux pour une molécule donnée. Par contre, étant donnée la courte durée des dynamiques moléculaires (500 fs) et le niveau de calcul DFT requis, cette approche n'est applicable qu'aux briques élémentaires des molécules d'intérêt biologique.

Nous venons donc de voir qu'il y a une dizaine d'années, les conséquences de l'interaction directe entre les rayonnements ionisants et les systèmes moléculaires d'intérêt biologique connaissent un intérêt croissant, mais les études étaient surtout limitées à des systèmes de taille réduite, et les mécanismes de fragmentation n'avaient pas été clarifiés. De plus, l'influence des autres molécules liées de manière non-covalente au système était encore peu comprise. C'est la raison pour laquelle un montage expérimental unique a été développé au laboratoire afin d'irradier des biomolécules environnées d'un nombre contrôlé de molécules d'eau par des faisceaux d'ions.⁴⁷ Bien que j'aie activement participé à ce développement technique, en particulier concernant la source électrospray, je ne le décrirai pas en détail car il fera l'objet de l'HDR d'Alain Méry, qui a mené ces recherches. Dans ce manuscrit, j'ai choisi de présenter certains de mes travaux qui illustrent une volonté de décrire et comprendre les processus radio-induits dans les systèmes moléculaires d'intérêt biologique, avec une emphase sur les systèmes non-covalents, qui sont au cœur de ma recherche depuis une quinzaine d'années. Les interactions non-covalentes étant indispensables au fonctionnement de la majorité des molécules biologiques, il est logique que mon approche ait été de tendre vers plus de pertinence biologique. Nous verrons aussi que ces interactions plus faibles que les liaisons covalentes ont l'avantage d'être plus sensibles à une excitation, et constituent donc une sonde fine de l'augmentation de l'énergie vibrationnelle dans le système. Dans le Chapitre 2 seront présentées des méthodes de

spectrométrie de masse qui permettent d'avoir de nouvelles informations sur de petites molécules neutres. Ensuite, les Chapitre 3 et Chapitre 4 contiennent des études visant à prendre en compte l'environnement moléculaire des systèmes d'intérêt biologique, en irradiant la biomolécule liée à quelques dizaines de molécules d'eau au maximum (on parle alors de nanohydratation), ou à d'autres molécules. Les systèmes d'intérêt biologique étant souvent de taille conséquente dans l'organisme (les plus petites protéines ont une masse de l'ordre de 10 kDa), je présenterai dans le Chapitre 5 des résultats sur des systèmes plus gros, ayant été choisis pour leur pertinence dans l'étude de la matrice extracellulaire sous irradiation. Enfin, le Chapitre 7 est consacré à des projets tournés vers de nouvelles observables grâce à des outils expérimentaux à la pointe de la technique.

Chapitre 2 : Nouvelles approches expérimentales pour l'étude de petites molécules neutres

Une approche traditionnelle en Science consiste à diviser un système en sous-parties, étudier chacune des sous-parties séparément, puis leurs interactions, pour comprendre le fonctionnement du système entier. Cela implique une certaine hiérarchie dans les interactions, ce qui est en l'occurrence le cas pour les systèmes moléculaires : en effet, l'énergie de liaison des électrons dans l'atome est supérieure à celle des liaisons covalentes, qui sont elles-mêmes plus fortes que les liaisons non-covalentes. Cette approche a donc été appliquée aux propriétés intrinsèques des biomolécules, qui sont souvent des polymères composés de centaines ou milliers d'atomes, mais d'un nombre beaucoup plus limité de « briques élémentaires », telles que les acides aminés pour les protéines, les nucléobases de l'ADN et de l'ARN, les saccharides ou oses, les groupements phosphates, les lipides... Ces briques élémentaires ont aussi l'avantage d'être mises en phase gazeuse par des techniques simples telles que l'évaporation thermique. En effet, il suffit de chauffer le liquide ou la poudre de la molécule dans un four pour créer une vapeur moléculaire. Cependant, il faut s'assurer que seule la molécule intacte est présente en phase gazeuse, et qu'elle n'a pas subi de transformation chimique due au chauffage. Généralement, on détecte ces transformations grâce à une variation de la grandeur physique mesurée (spectre de masse,⁴⁸ spectre micro-ondes,⁴⁹ figure de diffraction⁵⁰...) lorsque la température de chauffage augmente. Cependant, même lorsque la molécule est intacte, sa structure géométrique peut être modifiée par le chauffage, comme nous l'avons récemment montré suite à une série d'expériences menées à l'Open University (Milton Keynes, Royaume-Uni) en collaboration avec le groupe de Samuel Eden.⁵¹ Je reviendrai sur ce point plus loin dans ce chapitre.

L'étude en phase gazeuse de briques élémentaires des systèmes moléculaires biologiques intéresse les chercheurs depuis longtemps, puisqu'on peut trouver des publications qui datent des années 70.^{52,53} L'une d'elles présente d'ailleurs les premières mesures directes de l'énergie de liaison de paires de nucléobases de l'ADN neutres au moyen de techniques de spectrométrie de masse.⁵³ Ces valeurs expérimentales font encore référence aujourd'hui, et elles ont ouvert la voie à des décennies de travaux qui ont vu notamment l'amélioration et le développement des méthodes de calcul de chimie quantique qui permettent une compréhension extrêmement détaillée des processus grâce à la comparaison directe avec l'expérience.⁵⁴ Je vais tout de suite donner un autre exemple d'application de la spectrométrie de masse à la mesure d'une quantité difficile à obtenir expérimentalement dans les molécules en phase gazeuse.

I) Mesurer l'énergie des états excités de nucléobases de l'ADN et de l'ARN

La majorité des montages de spectrométrie de masse utilisés pour l'étude de petites molécules neutres comportent une source de molécules en phase gazeuse, celles-ci entrant en interaction avec une source de rayonnement ionisant (laser UV ou VUV, faisceau d'électrons ou d'ions, synchrotron...). Cette configuration permet d'obtenir des informations sur les produits moléculaires ou atomiques chargés issus de l'interaction, en les analysant selon leur rapport m/z par un spectromètre multipolaire ou à temps de vol, le plus souvent. En collaboration avec les équipes de Samuel Eden (Open University, Milton Keynes, Royaume-Uni) et de Peter van der Burgt (National University of Ireland Maynooth, Irlande), nous avons ainsi montré que la fragmentation du 5-fluoro-uracile après ionisation par impact électronique de 10 à 100 eV est différente de celle de l'uracile.⁵⁵ Le 5-fluoro-uracile fait partie des nucléobases halogénées, des molécules utilisées dans le traitement de certains cancers pour inhiber la réplication de l'ADN. Cette méthode d'ionisation ne donne accès qu'aux processus se produisant après

ionisation, c'est-à-dire dans le cation radicalaire. En utilisant un laser UV accordable, il est possible d'ioniser les nucléobases de l'ADN ou de l'ARN si elles absorbent au moins deux photons. En effet, leur énergie d'ionisation se situe vers 8 – 10 eV,⁵⁶ la gamme de longueur d'onde du laser de l'équipe de Samuel Eden (220 – 280 nm, ce qui correspond à 4,43 – 5,64 eV) est donc parfaitement adaptée. Par contre, pour que l'ionisation ait lieu, il faut aussi que l'état électronique atteint après l'absorption du premier photon ait une grande force d'oscillateur et une durée de vie suffisante pour permettre l'absorption d'un second photon, la durée de l'impulsion laser étant de quelques nanosecondes. L'état singulet S_2 des nucléobases de l'ADN/ARN a une grande force d'oscillateur et une durée de vie extrêmement courte, de l'ordre de 100 fs,⁵⁷ mais il peut se produire une désexcitation vers les états singulet S_1 ou triplet T_1 dont la durée de vie est supérieure.^{58,59} Entre l'absorption du premier et du second photon, et donc dans un état excité, il peut même se produire des réactions au sein de la molécule, comme l'ouverture du cycle de l'uracile : ce phénomène a été mis en évidence par l'équipe de S. Eden grâce au seuil d'apparition de la perte de CO de l'uracile radical cation en faisant varier la longueur d'onde du photon UV.⁶⁰ L'absorption UV multi-photonique étend donc le domaine d'application de la configuration « classique » des montages de spectrométrie de masse utilisés pour ioniser les molécules neutres en phase gazeuse.

Toutefois, les montages simples décrits au paragraphe précédent ne permettent pas de connaître l'ion précurseur d'un fragment donné, ce qui limite la connaissance des processus initiés par l'ionisation de la molécule. Il existe plusieurs façons de contourner cette limitation : parmi elles, je vais parler de l'utilisation d'un spectromètre de masse à temps de vol (TOF) du type « réflectron », permettant la mesure de voies de dissociation d'ions métastables. La Figure 2 illustre le montage de l'équipe de S. Eden : après avoir été ionisés par le laser et accélérés par les champs électriques de la zone d'extraction du spectromètre TOF, les ions monochargés parcourent la zone sans champ (Field-free region, FFR) et sont réfléchis par une électrode de potentiel ajustable V_R , avant d'être détectés par des galettes à micro-canaux.

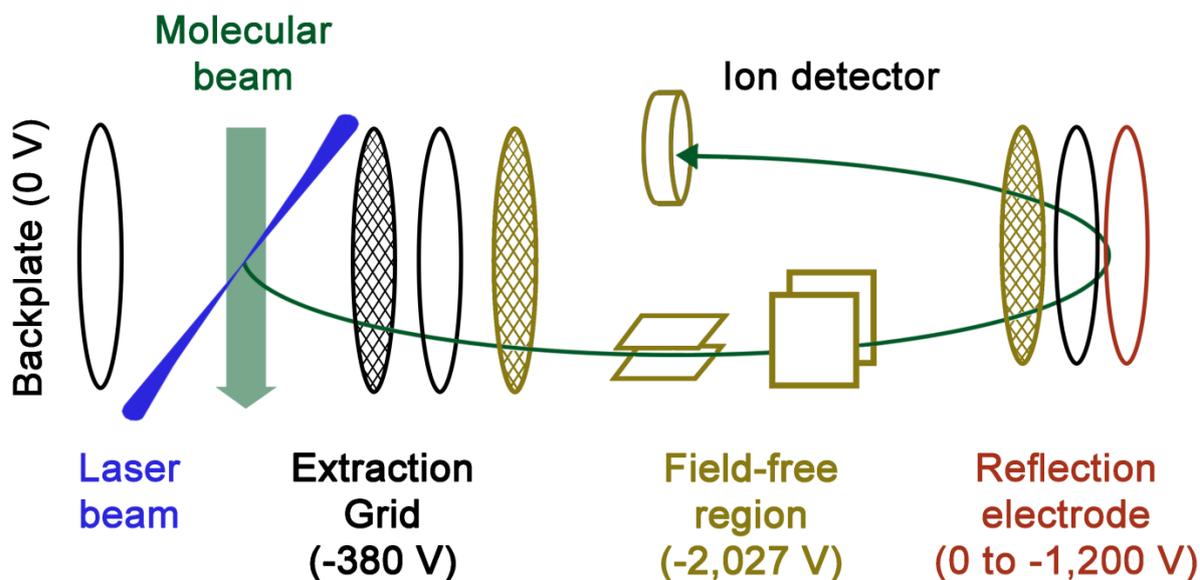


Figure 2 : montage de l'équipe de S. Eden (Open University, Milton Keynes, Royaume-Uni) utilisant un spectromètre de masse TOF de type réflectron.

La condition de réflexion pour un ion monochargé de masse m_i est la suivante :

$$V_R \geq V_{Ri} = V_{FFR} - E_{ci}$$

avec v_{FFR} la vitesse de l'ion et $E_{ci} = \frac{1}{2}m_i v_{FFR}^2$ son énergie cinétique dans la FFR. Si $V_R < V_{Ri}$, l'ion ne sera plus réfléchi et le pic correspondant disparaîtra donc du spectre de masse. De plus, s'il fragmente *dans la FFR* en un ion plus léger de masse m_f , sa vitesse reste la même,¹ et la condition de réflexion devient alors :

$$V_R \geq V_{Rf} = V_{FFR} - E_{ci} = V_{FFR} - \frac{1}{2}m_f v_{FFR}^2$$

En mesurant V_{Ri} et V_{Rf} , on peut donc calculer $\frac{m_f}{m_i} = \frac{V_{FFR}-V_{Rf}}{V_{FFR}-V_{Ri}}$, et ainsi connaître la masse de l'ion précurseur métastable d'un ion fragment donné. Le terme « métastable » est utilisé en référence à l'échelle de temps de la fragmentation, de l'ordre de la microseconde, qui est beaucoup plus longue que celle de la plupart des fragments, formés en quelques nanosecondes après l'ionisation par absorption UV multi-photonique. Un exemple de visualisation de ce phénomène via une « carte de fragmentation » est donné dans la Figure 3 pour la thymine et l'uracile : on voit immédiatement que pour l'uracile, tous les pics du spectre de temps de vol disparaissent au même potentiel $V_{Ri} = -212 V$, sauf un, pour lequel le signal est encore visible pour des potentiels inférieurs : c'est le signe d'une fragmentation métastable.⁶² On a mesuré $V_{Rf} = -907 V$, ce qui correspond à $\frac{V_{FFR}-V_{Rf}}{V_{FFR}-V_{Ri}} = \frac{-2027+907}{-2027+212} = 0,617$ et donc à des masses $m_f = 69$ et $m_i = 112$. Par conséquent, nous avons attribué cette voie à la perte du groupement HNCO du radical cation métastable de l'uracile. Il est intéressant de constater que ce processus possède l'énergie d'apparition la plus basse mesurée par ionisation après absorption d'un seul photon.³⁰ Nous avons également montré que cette voie de fragmentation était due à l'absorption de deux photons de 220 nm, ce qui donne une énergie de 11,28 eV, et donc bien supérieure à $E_I = 9,15$ eV l'énergie d'ionisation de l'uracile mesurée par absorption d'un seul photon.³⁰ Le surplus d'énergie n'étant pas suffisant pour atteindre un état excité de l'ion, cette fragmentation métastable ne se produit pas par effet tunnel par exemple, mais dans l'état électronique fondamental, lorsque la quantité d'énergie vibrationnelle est voisine de la limite de dissociation. De plus, comme on peut le voir dans la Figure 4, cette perte de HNCO métastable possède un seuil vis-à-vis de la longueur d'onde du laser UV, ce qui est l'indication d'un rôle joué par l'état excité de la molécule *neutre* atteint par le premier photon absorbé, comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent. Ici, nous avons proposé que ce seuil $E_S = 5,57$ eV corresponde à l'énergie du photon nécessaire pour accéder à l'état S_1 avec une quantité d'énergie vibrationnelle ΔE égale à la barrière de la perte de NHCO *dans le radical cation*, créé par l'absorption du second photon. Si c'est bien le cas, on peut écrire que $\Delta E = 2E_S - E_I = 1,80$ eV. On peut alors en déduire l'énergie de l'état excité atteint par le premier photon : $E_1 = E_S - \Delta E = 3,77$ eV, ce qui est très proche des valeurs calculée (3,72 eV⁶³) et mesurée (3,833 eV⁶⁴) pour l'état S_1 de l'uracile neutre, ce qui va dans le sens de notre interprétation. Les mêmes observations ont été faites pour la thymine.

Mesurer l'énergie des états excités des molécules neutres isolées est difficile, c'est pourquoi il n'existe à notre connaissance qu'une seule valeur expérimentale précédente pour l'uracile et la thymine. La méthode présentée ici est potentiellement applicable à d'autres molécules, à condition toutefois de pouvoir accéder à une voie de fragmentation métastable du cation radicalaire. Si celle-ci est trop haute

¹ Ici, on ne tient pas compte de l'énergie cinétique de recul de l'ion, typiquement de quelques eV,⁶¹ et donc négligeable devant celle de l'ion dans la FFR, de l'ordre de 2 keV.

en énergie, la gamme de longueur d'onde du laser ne sera pas suffisante, le seuil $E_S = 5,57$ eV mesuré pour l'uracile étant déjà proche de l'énergie d'un photon de 220 nm (5,64 eV), la plus basse longueur d'onde du laser utilisé dans l'équipe de S. Eden. De plus, il faut aussi que l'état excité ne soit ni trop haut en énergie, pour la même raison, ni dissociatif. Malgré ces limitations, certaines molécules aromatiques, à commencer par les autres nucléobases de l'ADN/ARN, mais aussi leurs nucléosides et nucléotides, devraient pouvoir être étudiées. Je présenterai d'ailleurs les résultats d'autres types d'études concernant l'uridine et la thymidine dans la partie suivante.

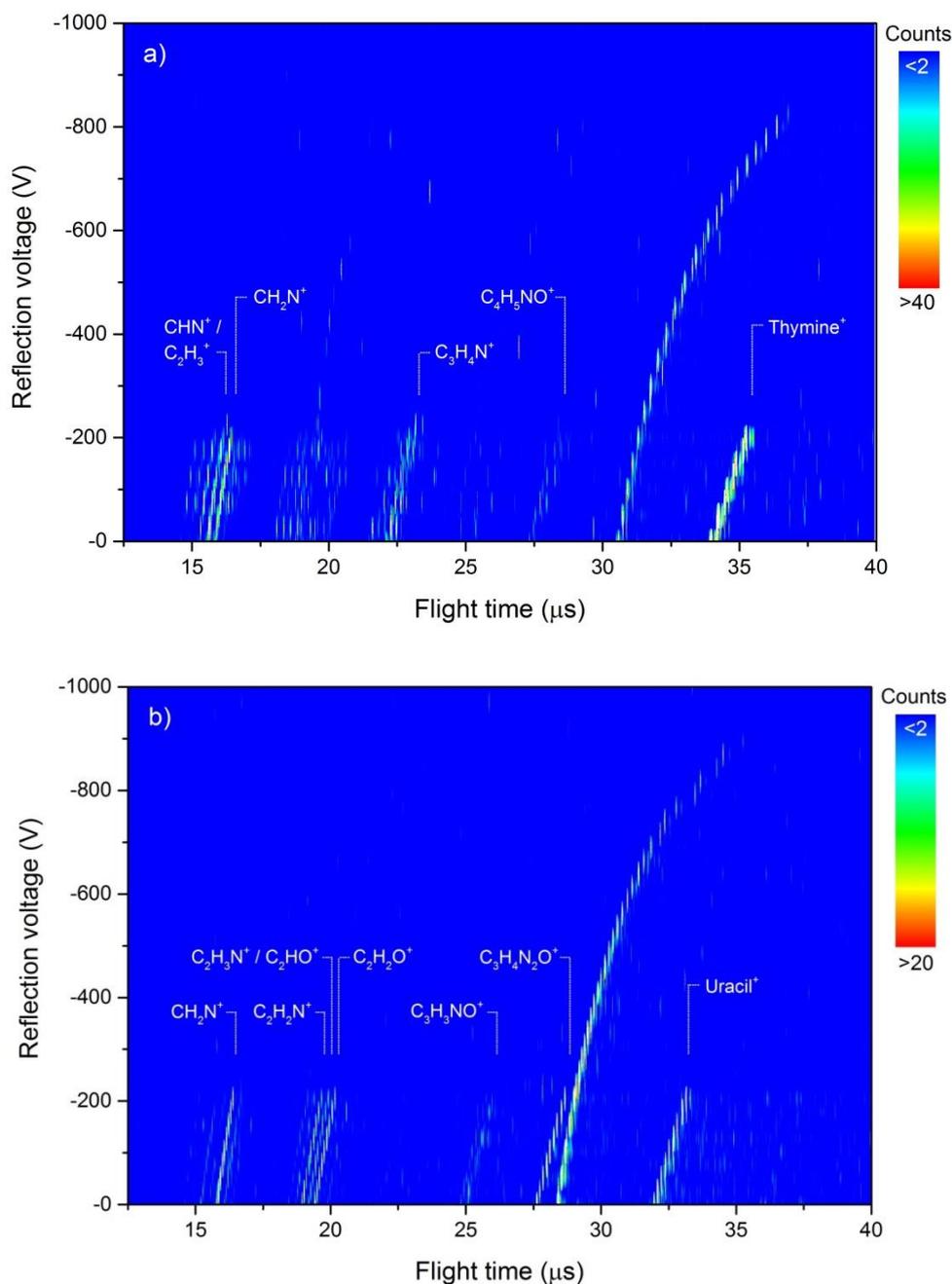


Figure 3 : spectre de temps de vol des cations formés après absorption UV (220 nm) multi-photonique de la thymine (en haut) et de l'uracile (en bas) en fonction du potentiel de réflexion V_R . La voie de fragmentation métastable est celle qui est présente à V_R très négatif.

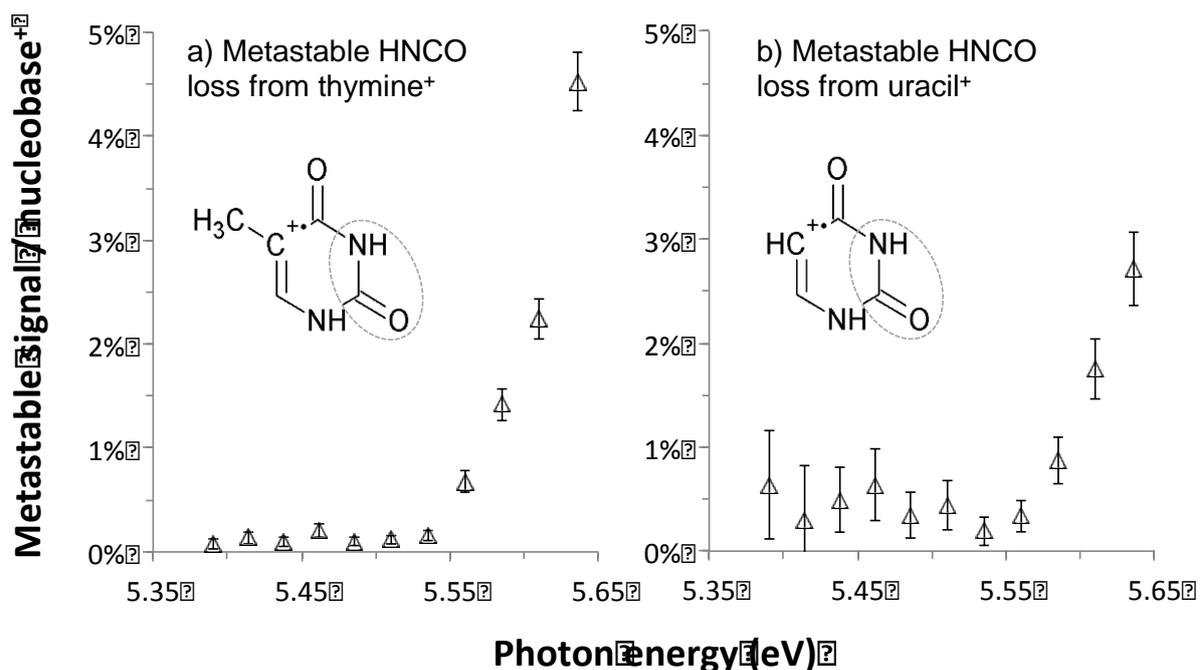


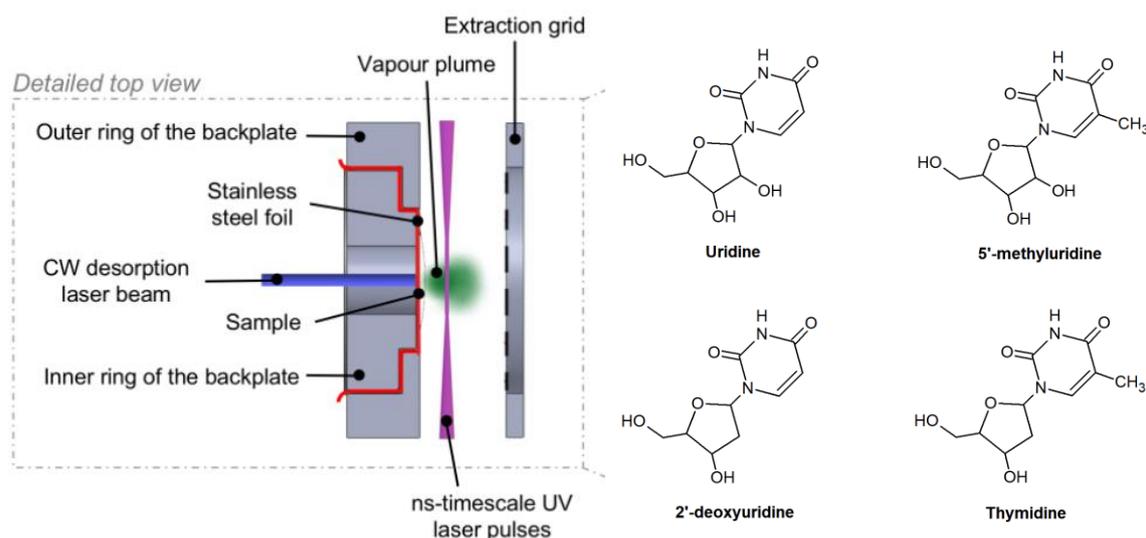
Figure 4 : abondance de la perte de HCNCO du radical cation métastable de thymine (à gauche) et d'uracile (à droite), en fonction de l'énergie du photon UV.

II) Une nouvelle source de molécules à désorption par laser continu pour l'étude de nucléosides de l'ADN et de l'ARN

Nous avons vu dans la partie précédente que l'on pouvait étudier des nucléobases de l'ADN/ARN par spectrométrie de masse après les avoir évaporées dans un four puis ionisées. Dans l'ADN et l'ARN, chaque nucléobase est liée à un groupement sucre, lui-même relié à un groupement phosphate, ces derniers formant le squelette de la molécule. La question qui semble alors naturelle est : quelle est l'influence du reste de la molécule sur les processus induits dans les nucléobases ? Une méthode consiste alors à augmenter progressivement la taille des briques élémentaires, la première étape étant donc d'ajouter un groupement sucre à la nucléobase pour former un nucléoside. Nous avons étudié par spectrométrie de masse, en collaboration avec le groupe de Jason Greenwood de la Queen's University Belfast, le comportement sous irradiation des nucléosides de l'ADN (adénosine, thymidine, guanosine et cytidine).⁴⁵ Nos résultats obtenus par ionisation grâce à un laser UV femtoseconde montrent en premier lieu que ces molécules, réputées thermiquement fragiles, peuvent être produites intactes en phase gazeuse par une source à désorption par laser continu. Je détaillerai le fonctionnement de ce type de source dans le paragraphe suivant. Par ailleurs, nous avons montré que ces nucléosides fragmentent presque systématiquement après ionisation par des protons de 5 keV d'énergie cinétique. La collision avec des protons de cette énergie mène principalement à la capture d'un électron des orbitales de valence de la molécule par le proton, comme l'ont montré les travaux du groupe de Bernadette et Michel Farizon.^{65,66} L'électron peut ainsi venir initialement de la nucléobase ou du sucre (énergie d'ionisation EI = 9,1 eV⁶⁷), les deux composants des nucléosides, mais on observe une corrélation entre l'abondance des fragments du sucre, l'énergie d'ionisation et l'affinité protonique (AP) de la nucléobase... Par exemple, les fragments détectés sont majoritairement ceux du sucre pour la thymidine (EI = 9,2 ± 0,2 eV ; AP = 9,13 eV)⁶⁸, et ceux de la nucléobase pour la guanosine (EI = 8,0 ± 0,2 eV ; AP = 9,95 eV)⁶⁸. Par conséquent, on peut expliquer les résultats par le fait que la charge positive se retrouve sur le site de plus basse énergie avant la fragmentation. Ceci implique un transfert

de proton ou de trou à une échelle de temps inférieure à la nanoseconde. Ce transfert de charge ultra-rapide au sein de nucléosides après ionisation a depuis été confirmé par des mesures pompe-sonde avec des lasers femtoseconde.^{69,70}

Étant donné le succès des expériences décrites dans le paragraphe précédent, une source à désorption par laser continu a également été développée par le groupe de S. Eden à l'Open University. En effet, celui-ci désirait étudier les nucléosides de l'ADN/ARN par absorption UV multi-photonique et impact électronique. La Figure 5 détaille le fonctionnement de la source : un laser continu de longueur d'onde 445 nm et de puissance maximale 1 W irradie la face arrière d'une feuille d'acier inoxydable de 10 µm d'épaisseur fixée à la première électrode du spectromètre de masse TOF, et provoque la désorption des molécules d'un film préalablement étalé sur la face avant de la feuille. La plume de molécules est alors irradiée par une impulsion laser UV de quelques nanosecondes se propageant parallèlement au plan des électrodes, et les ions positifs créés par ionisation sont ensuite accélérés par une tension négative pulsée appliquée sur l'électrode d'extraction, la première électrode étant à la masse. Les avantages de ce type de source comparée à un four placé sous vide, vis-à-vis de la décomposition thermique des molécules, sont les suivants : d'abord, la vitesse de chauffage est bien plus élevée, ce qui augmente la probabilité de sublimer les molécules sans les décomposer thermiquement ; ensuite, seule la partie irradiée du film est chauffée, et non la totalité de l'échantillon ; enfin, après sublimation, les molécules se trouvent directement isolées et ne touchent aucune autre surface chaude.



La nouvelle source a permis l'étude des nucléosides de l'ADN/ARN thymidine/uridine et d'analogues, notamment l'influence de la température de chauffage de la feuille sur les processus induits par l'absorption multi-photonique. D'abord, nous avons prouvé pour la première fois que l'uridine, la 5-méthyluridine, et la 2'-désoxyuridine pouvaient être mis en phase gazeuse sans décomposition grâce à cette source. Le spectre de masse obtenu après ionisation par absorption multi-photonique de l'uridine à une longueur d'onde de 265 nm est visible dans la Figure 6d : l'ion majoritaire est la nucléobase (uracile) protonée (notée BH⁺), formé par rupture de la liaison N-glycosidique puis transfert de deux H ou un H et un proton depuis le sucre vers la nucléobase. Le fragment noté S⁺, contenant le groupement sucre et nécessitant un transfert d'hydrogène provenant de la nucléobase, est moins abondant. Ces fragments ont déjà été observés dans les études précédentes d'ionisation de nucléosides. Curieusement, nous avons constaté une augmentation de l'abondance relative de ce fragment S⁺

lorsque la puissance du laser de désorption augmente de 0,30 à 0,50 W (voir la Figure 6). D'habitude, une modification du spectre de masse lorsque la température de chauffage augmente est le signe d'une décomposition thermique de la molécule. Ici, ce n'est a priori pas le cas car le rapport de l'abondance des fragments B^+ et BH^+ est constant sur toute la gamme de puissance laser (voir la Figure 6), ce rapport étant très sensible à la décomposition thermique. Il est extrêmement intéressant de noter que cette augmentation de l'abondance du fragment S^+ apparaît lorsque la longueur d'onde du laser ns devient inférieure à 250 nm. Dans un étude précédente,⁶² nous avons interprété l'existence d'un seuil en longueur d'onde par l'apparition d'un fragment comme le signe de l'ouverture d'un processus dans un état électronique excité de la molécule neutre après absorption du premier photon UV (voir la section I) de ce chapitre). L'énergie du photon est alors égale au seuil énergétique de ce processus, donc ici environ 5 eV. La dépendance vis-à-vis de la puissance du laser de désorption indique que ce processus est sensible à la population d'isomères présents en phase gazeuse après désorption. En effet, une température plus grande peut permettre au système de passer des barrières énergétiques avant d'absorber le premier photon. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons calculé (avec des méthodes utilisant la théorie de la fonctionnelle de la densité) les barrières associées à la rotation du groupement CH_2OH du sucre (inférieures à 0,3 eV) ainsi que celles de la décomposition thermique (supérieures à 0,6 eV). Par conséquent, plusieurs isomères peuvent effectivement coexister en phase gazeuse à partir d'une certaine température de chauffage des molécules, sans décomposition thermique.

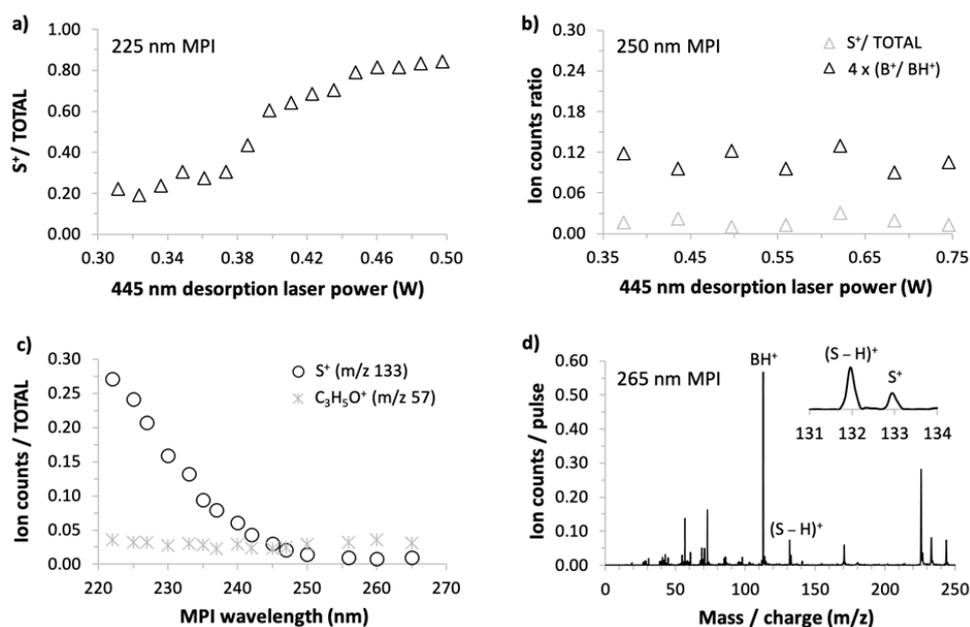


Figure 6 : résultats obtenus par absorption multi-photonique de l'uridine à une puissance laser d'environ 5×10^6 $W \cdot cm^{-2}$. Abondance relative du fragment S^+ à une longueur d'onde du laser ns de 225 nm (a) et de 250 nm (b) en fonction de la puissance du laser de désorption, en fonction de la longueur d'onde du laser (c), rapport des abondances des fragments B^+ et BH^+ à une longueur d'onde du laser ns de 250 nm en fonction de la puissance du laser de désorption (b), Abondance relative du fragment $C_3H_5O^+$ en fonction de la longueur d'onde du laser ns (c), spectre de masse de l'uridine à une longueur d'onde du laser ns de 265 nm (d).

Le processus d'isomérisation en question impliquerait donc le groupement CH_2OH du sucre, mais pour en savoir plus, il faudrait par exemple mener des expériences avec des molécules sélectionnées en conformation. C'est le but du nouveau développement expérimental du groupe de S. Eden, dans lequel un jet supersonique de molécules neutres passe entre deux électrodes hémisphériques entre lesquelles une haute tension (jusqu'à 12 kV) est appliquée et crée un champ électrique inhomogène. Celui-ci exerce une force perpendiculaire à la direction de propagation du faisceau sur les molécules ayant un moment dipolaire permanent. Si celui-ci est suffisamment différent selon les différents

isomères d'une même molécule, une séparation spatiale des isomères pourra être effectuée. Les premiers résultats de ce montage ont été obtenus dans le cadre de la thèse d'André Rebelo,⁷¹ qui a soutenu le 19/02/2021 devant un jury dont je faisais partie. Il a ainsi séparé efficacement le nitrométhane ($\mu = 3,46$ D) de son dimère ($\mu = 0,55$ D) et obtenu, après ionisation par impact électronique, le spectre de masse de ce dimère dans une seule conformation, ce qui est inédit à ma connaissance. Certaines voies de fragmentation observées peuvent ainsi être attribuées à la structure géométrique de cette conformation : c'est une tâche ardue expérimentalement, surtout en ce qui concerne les systèmes neutres.

Chapitre 3 : Influence de la nanohydratation sur les processus induits par l'ionisation de bases de l'ADN/ARN

Après nous être intéressé à des molécules isolées sous irradiation, nous allons voir comment on peut étudier l'influence du solvant (dans les tissus biologiques, l'eau) sur les processus radio-induits, afin de tenter de comprendre son rôle et se rapprocher des conditions biologiques. Ces molécules d'eau sont liées de manière non-covalente à la biomolécule, et dans ce chapitre, je vais exposer des résultats d'expériences d'ionisation et fragmentation de nucléobases de l'ADN ou de l'ARN neutres et environnées d'un certain nombre de molécules d'eau, avec une distribution allant jusqu'à quelques dizaines.

I) Fragmentation et réarrangement d'agrégats d'adénine nanohydratés

Dans le chapitre précédent, j'ai présenté des résultats d'expériences réalisées en collaboration avec le groupe de S. Eden de l'Open University, sur l'irradiation de nucléobases de l'ADN/ARN isolées. Ici, je vais exposer nos recherches conjointes vers la compréhension de l'effet de la nanohydratation sur les processus d'ionisation et de fragmentation. Le montage expérimental développé à l'Open University et permettant l'irradiation d'agrégats de nucléobases de l'ADN/ARN hydratés est visible dans la Figure 7 : la poudre de molécules est chauffée dans un four placé dans une ligne de gaz porteur qui se termine par une buse trouée donnant dans une chambre à vide (chambre d'expansion). La différence de pression entre la ligne de gaz (de l'ordre de 1 bar) et la chambre d'expansion (de l'ordre de 10^{-4} mbar) crée un jet supersonique qui refroidit le mélange de gaz tampon (argon ou hélium principalement) et de molécules et induit leur agrégation. Lorsqu'on veut étudier des agrégats hydratés, on ajoute un réservoir d'eau chauffé à la ligne de gaz et on chauffe toute la ligne jusqu'à la buse pour éviter la condensation de l'eau sur les parois. La partie centrale du jet (la plus froide) est sélectionnée par un écorceur situé entre la chambre d'expansion et la chambre de diagnostic, où les agrégats sont irradiés par un laser UV impulsif de quelques nanosecondes ou un faisceau d'électrons. Les produits ioniques sont alors extraits par un champ électrique impulsif dans un spectromètre TOF de type réflectron. Nous avons ainsi étudié des agrégats d'adénine hydratés par absorption UV multi-photonique (MPI) et impact électronique.⁷² D'abord, examinons les spectres de masse de la Figure 8 obtenus par MPI dans des conditions où les agrégats sont petits et le monomère domine largement. On peut voir l'effet de la présence du réservoir d'eau chauffé sur les produits ioniques : le plus attendu est la présence des agrégats composés du radical cation de l'adénine avec quelques molécules d'eau, due à l'ionisation d'agrégats après l'absorption d'au moins deux photons d'énergie 5,52 eV par l'adénine, son énergie d'ionisation étant d'environ 8,5 eV.⁵⁶ Celle-ci diminue avec le degré d'hydratation, pour atteindre 7,8 eV pour trois molécules d'eau, comme S. Kim et co. l'ont montré.⁷³ Au moins une partie de ces ions a très probablement subi l'évaporation d'une ou plusieurs molécules d'eau ou/et d'adénine après ionisation, un processus dont je reparlerai en détail dans la partie suivante. Cette évaporation refroidit le radical cation de l'adénine, ce qui réduit son énergie interne vibrationnelle et donc la probabilité de fragmentation multiple. L'intensité des petits fragments diminue donc par rapport aux gros, notamment à $C_4H_4N_4^+$, qui domine le spectre de l'adénine hydratée. Le seul petit fragment dont l'intensité augmente drastiquement est observé à $\frac{m}{z} = 18$: on pourrait penser à l'ion H_2O^+ , formé après transfert d'électron d'une molécule d'eau au radical cation de l'adénine, mais ce processus est endothermique, l'énergie d'ionisation des agrégats d'eau étant supérieure à 10 eV.⁷⁴ Nous avons donc attribué ce pic à l'ion NH_4^+ provenant de la fragmentation de l'adénine protonée, qui est d'ailleurs détectée à $\frac{m}{z} = 136$ (voir la Figure 8) : en effet, le transfert de proton dans le dimère d'adénine est exothermique (affinité protonique de l'adénine :

9,78 eV⁵⁶ ; acidité du radical cation : 9,58 eV⁷⁵) et le fragment NH₄⁺ a été observé aussi bien après collision de basse énergie cinétique (30 eV) sur un gaz rare⁷⁶ qu'après irradiation avec un laser UV nanoseconde.⁷⁷ Je reviendrai sur ce phénomène de protonation intra-agrégats dans le Chapitre 4.

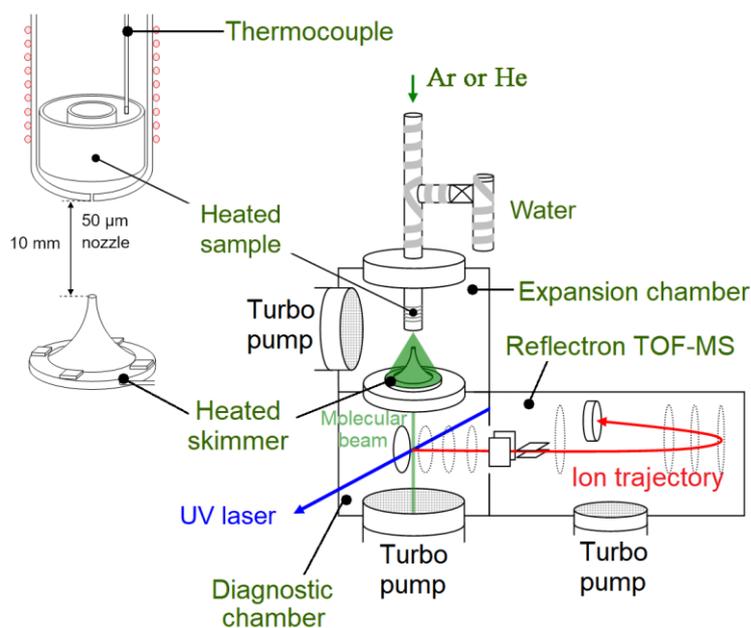


Figure 7 : schéma du montage expérimental du groupe de S. Eden dédié à l'étude des agrégats moléculaires hydratés.

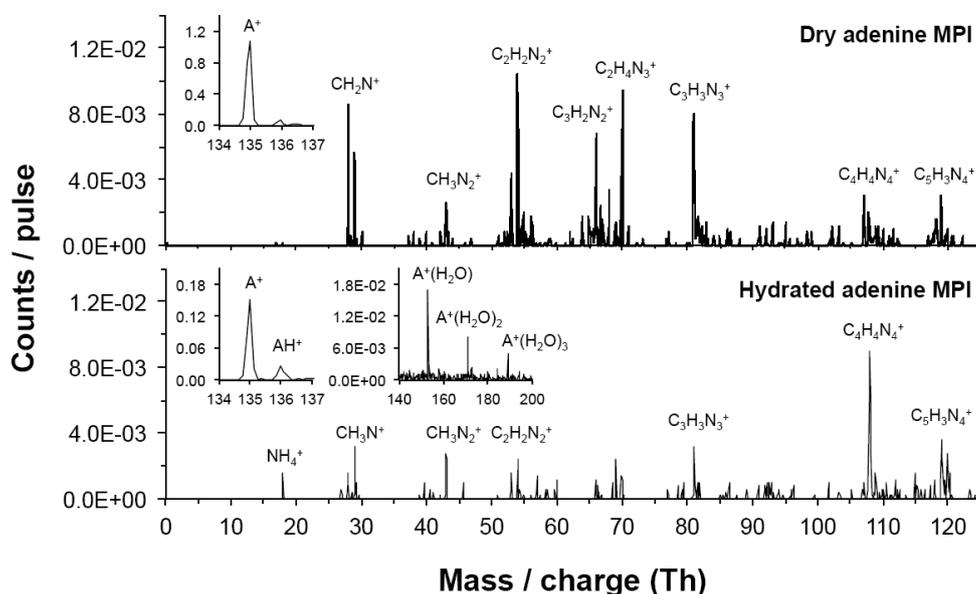


Figure 8 : spectres de masse des produits de l'adénine (en haut) et de l'adénine hydratée (en bas, température du réservoir d'eau : 100 °C) après absorption multi-photonique (température de la poudre d'adénine : 237 °C ; pression d'argon : 0,8 bar ; longueur d'onde du laser : 225 nm ; puissance surfacique moyenne : 4.10⁵ W.cm⁻²).

Lorsqu'on se place dans des conditions de plus forte agrégation (augmentation de la température de la poudre d'adénine et de la pression d'argon), on observe sur la Figure 9 un plus grand nombre de molécules d'eau autour du radical cation de l'adénine après ionisation, aussi bien par absorption UV multi-photonique (MPI) que par impact électronique (EII). Les agrégats d'eau ne sont observés que par EII, car l'eau est transparente à la longueur d'onde du laser (220 nm). Ils sont protonés, comme

tous les agrégats d'eau formés par ionisation dissociative, quelle que soit la méthode.⁷⁸⁻⁸⁰ De plus, dans les deux spectres, on remarque une série de pics à $\frac{m}{z} = 136 + n18$: dans celui des agrégats ionisés par EII, ces pics sont attribuables à l'adénine protonée hydratée, probablement formée par ionisation d'une molécule d'eau dans un agrégat d'adénine hydraté, puis transfert de proton à l'adénine et évaporation. Par contre, ce mécanisme est hautement improbable dans le cas de la MPI, car seule l'adénine absorbe les photons à 220 nm et est ionisée. Celle-ci peut transférer un proton à une autre molécule d'adénine (A) dans un dimère, mais la formation de l'adénine protonée requiert la dissociation du dimère dont l'énergie de liaison est de 1,34 eV dans $A_2^+(H_2O)$.⁸¹ Comme celle des molécules d'eau est bien plus basse (0,49 eV dans $A_2^+(H_2O)$ ⁸¹), on peut penser que toutes les molécules d'eau s'évaporeront avant l'adénine, empêchant ainsi la formation de l'adénine protonée hydratée. Pour expliquer la présence des pics à $\frac{m}{z} = 136 + n18$, il faut faire appel à des calculs de chimie quantique réalisés par Zhang et co.,⁸² et qui prédisent la formation spontanée d'hypoxanthine, une nucléobase rare de masse 136 uma, à partir d'une structure particulière de l'agrégat $A(H_2O)_4$, mais pas lorsque le nombre de molécules d'eau est inférieur à quatre. Toutefois, les auteurs ne présentent pas d'autres réactions, on ne peut donc pas comparer leurs probabilités. Le mécanisme qu'ils proposent est montré dans la Figure 10.

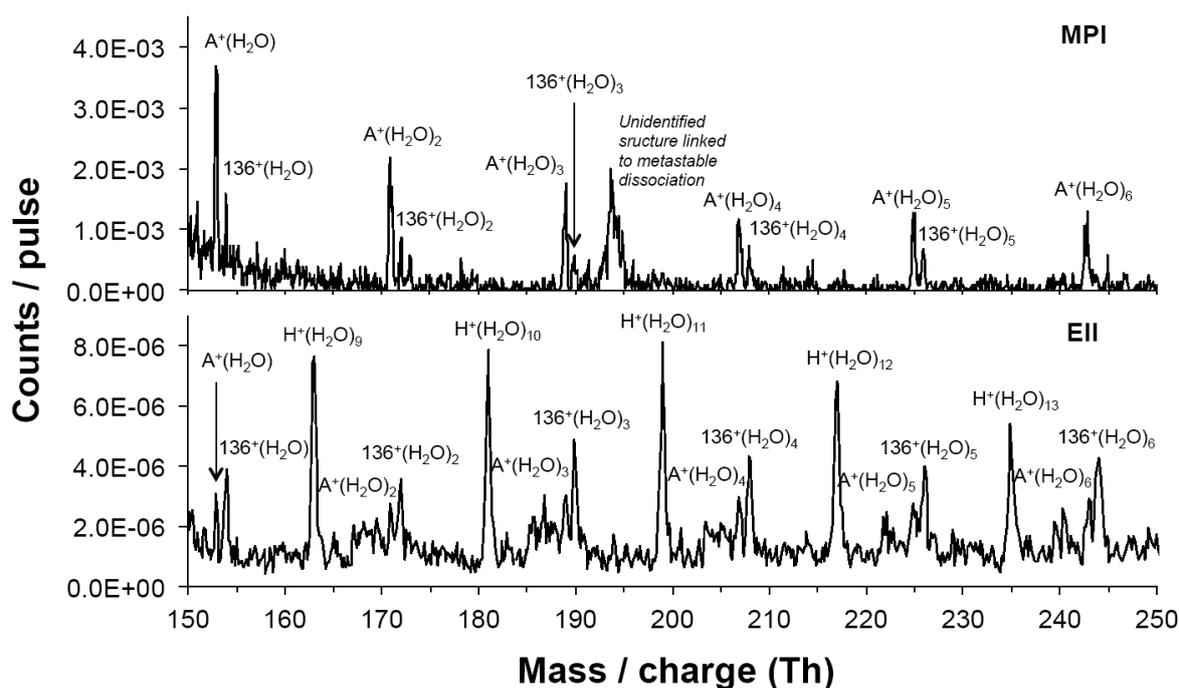


Figure 9 : spectres de masse des produits d'agrégats d'adénine hydratés (température de la poudre d'adénine : 276 °C ; température du réservoir d'eau : 70 °C ; pression d'argon : 1,8 bar) après absorption multi-photonique (en haut ; longueur d'onde du laser : 220 nm ; puissance surfacique moyenne : 3.10^6 W.cm^{-2}) et impact électronique (en bas ; énergie cinétique : 200 eV).

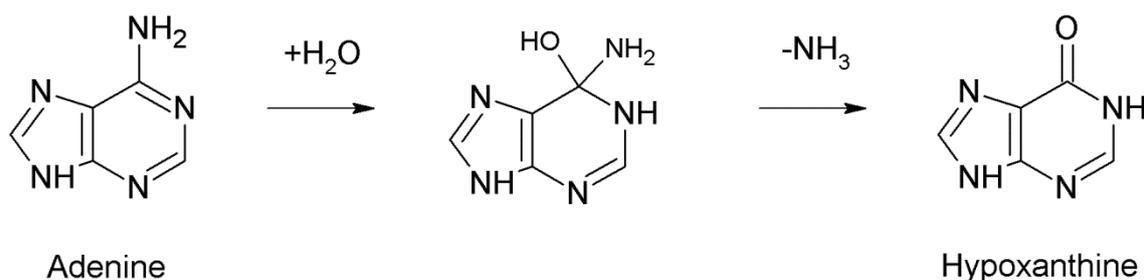


Figure 10 : mécanisme proposé par Zhang et co. pour la formation d’hypoxanthine à partir d’adénine hydratée.⁸²

Nos résultats expérimentaux sont les premiers qui vont dans le sens de la formation d’hypoxanthine dans des agrégats d’adénine hydratés. Un moyen de confirmer ceci serait d’enregistrer le spectre IR des ions situés à $\frac{m}{z} = 136 + n18$: en effet, on devrait alors détecter une raie intense autour du nombre d’onde 1700 cm^{-1} , typique de l’élongation C=O présente dans l’hypoxanthine mais ni dans l’adénine ni dans l’eau. Par contre, une spectroscopie d’absorption n’est pas possible car la densité de molécules en phase gazeuse est trop faible. Une solution est alors de détecter les fragments formés après la photoabsorption et d’enregistrer un spectre d’action, qui pourrait de surcroît être comparé à des calculs de chimie quantique, comme je l’ai fait durant ma thèse de doctorat.⁴ La difficulté résiderait alors dans la nécessité de sélectionner les ions précurseurs afin qu’eux seuls absorbent les photons IR. Ceci peut être réalisé par un spectromètre de masse quadripolaire, qui ne laisse passer que les ions d’un rapport $\frac{m}{z}$ donné, et d’un piège à ions : je parlerai longuement d’expériences utilisant ces outils dans les chapitres suivants. Enfin, il faudrait une source de photons IR dans la gamme des nombres d’ondes inférieurs à 2000 cm^{-1} : cela pourrait être un laser IR OPO du type de celui utilisé par le groupe de T. Rizzo à l’Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne,⁸³ ou un laser à électrons libres (FEL) tel que celui du Centre Laser Infrarouge d’Orsay (CLIO) où j’ai obtenu beaucoup de mes données de thèse, ou FELIX aux Pays-Bas. L’avantage du laser OPO est sa petite taille, qui permettrait de l’installer dans le laboratoire de l’Open University, alors que le FEL est une grande installation, il faudrait donc déplacer le montage expérimental là-bas. Par contre, l’avantage du FEL est sa grande intensité, de l’ordre de quelques dizaines de mJ par impulsion, environ dix fois plus que l’OPO.

II) Évaporation d’eau à partir d’agrégats de thymine hydratés ionisés

Après s’être intéressé dans la partie précédente à la fragmentation et au réarrangement d’une nucléobase dans des agrégats hydratés, nous allons maintenant explorer le phénomène d’évaporation d’une molécule d’eau dans le radical cation de thymine hydraté métastable formé par MPI.⁸⁴ Le montage expérimental est celui de la Figure 7, et la partie intéressante du spectre de masse obtenu est visible dans la Figure 11. On peut voir une série de pics à $\frac{m}{z} = 126 + n18$, attribués au radical cation de la thymine lié à n molécules d’eau ($T^+(H_2O)_n$) : nous avons déjà détecté ces espèces dans des conditions similaires mais pour l’adénine (voir la partie précédente), nous pouvons donc les attribuer ici à l’ionisation des agrégats de thymine hydratés, probablement suivie d’une évaporation d’une ou plusieurs molécules d’eau. Ce dernier phénomène est celui qui va nous intéresser plus particulièrement ici : en effet, sur le spectre de la Figure 11, nous pouvons remarquer des pics à des rapports $\frac{m}{z}$ (environ 169, 187, 205 et 223) ne pouvant être attribués à des agrégats ou des fragments. Nous avons déjà rencontré ce type de pic dans la partie I) du Chapitre 2, et l’avons attribué à la fragmentation d’un ion métastable dans la zone de vol libre du spectromètre de masse. Le temps de vol du fragment est alors supérieur à celui créé par dissociation rapide, car l’ion métastable a une masse supérieure lorsqu’il se situe dans la première zone d’accélération du spectromètre de masse. Ici, nous avons comparé les

temps de vol mesurés à ceux calculés pour différents ions précurseurs et fragments, et trouvé que ces pics correspondent à la perte d'une molécule d'eau des ions $T^+(H_2O)_n$ métastables dans la zone de vol libre du spectromètre de masse (voir les flèches sur la Figure 11) selon la réaction suivante :

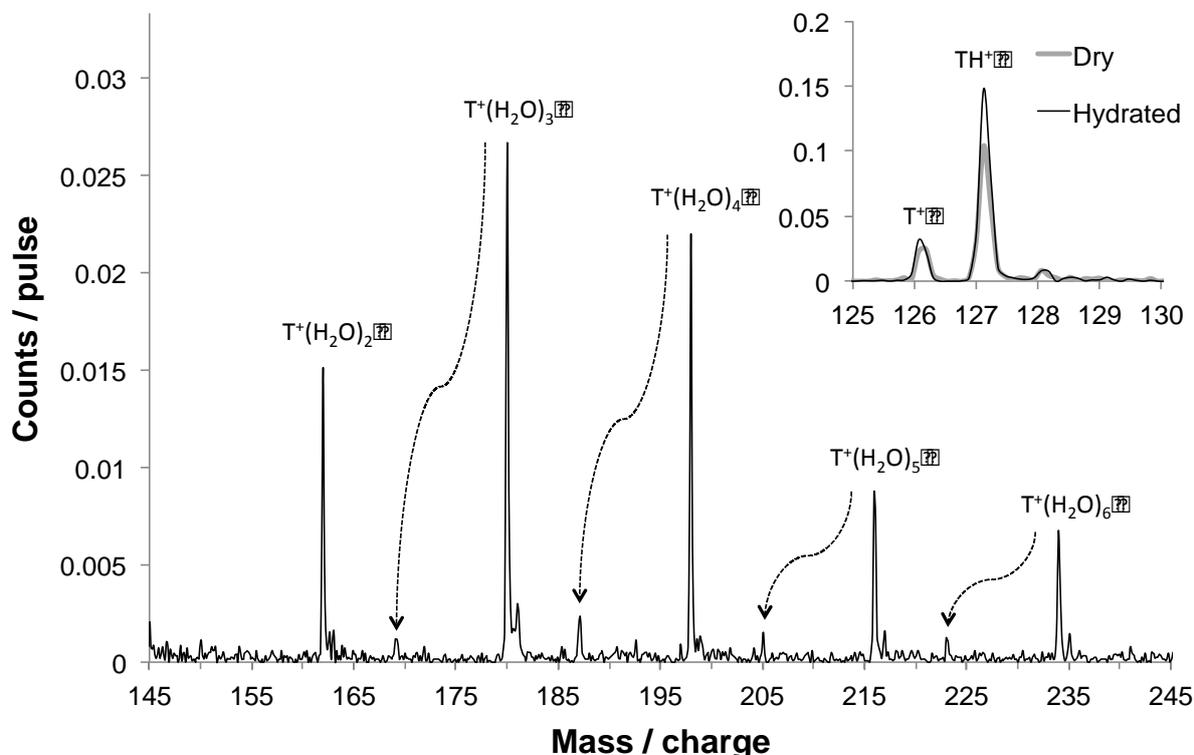
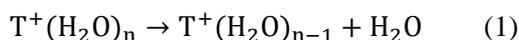


Figure 11 : spectre de masse partiel des produits d'agrégats de thymine hydratés (température de la poudre de thymine : 250 °C ; température du réservoir d'eau : 50 °C ; pression d'argon : 1,1 bar) après absorption multiphotonique (longueur d'onde du laser : 220 nm ; puissance surfacique moyenne : 8.10^7 W.cm⁻²). L'insert montre également une partie du spectre de masse pris dans des conditions identiques mais sans eau. Les flèches symbolisent la perte d'une molécule d'eau des ions $T^+(H_2O)_n$ métastables.

À partir des aires sous les pics du spectre de temps de vol, on peut calculer le taux de cette réaction en fonction du nombre de molécules d'eau initialement présentes dans l'ion, et les résultats se trouvent dans le Tableau 1. On peut remarquer que ce taux chute lorsque le nombre de molécules d'eau est inférieur à quatre : ceci peut être dû à plusieurs raisons. D'une part, la température des ions peut être d'autant plus basse que l'ion a déjà évaporé un nombre élevé de molécules d'eau avant d'entrer dans la zone de vol libre. D'autre part, l'énergie de liaison d'un ion $T^+(H_2O)_n$ peut dépendre de n : en effet, il a été montré que dans certains cas, il existe des agrégats particulièrement stables de par leur structure géométrique, on parle alors de « nombres magiques ». Un exemple bien connu est le cas des agrégats de l'acide aminé sérine.⁸⁵ Dans le cas des agrégats de thymine hydratés, Kim et co.⁸⁶ ont interprété les résultats de leur étude comme le signe que l'ion $T^+(H_2O)_4$ est plus stable que les autres, à cause d'une couche d'hydratation complète à $n = 4$. Comme nos données semblent en contradiction, j'ai mené des calculs de chimie quantique sur une série d'agrégats neutres et chargés jusqu'à $n = 4$, notamment en optimisant leur structure géométrique et en calculant leur énergie relative dans l'état électronique fondamental. Les résultats sont visibles de la Figure 12 à la Figure 14 en ce qui concerne la structure des conformères de plus basse énergie. Il est intéressant de constater que les structures sont similaires pour $T(H_2O)_n$ et $T^+(H_2O)_n$ lorsque $n = 1$ et 2, mais différentes pour $n > 2$. En effet, dans le cas des agrégats neutres, seules des liaisons H constituent les interactions non-covalentes, alors que dans le cas

des agrégats chargés, la charge positive de la thymine, qui se trouve majoritairement sur le carbone lié au groupement méthyle, entre en interaction avec le dipôle d'une ou deux molécules d'eau situées « au-dessus » (voir par exemple le conformère 1 de $T^+(H_2O)_3$) ou/et « en-dessous » du plan de la thymine (voir par exemple le conformère 1 de $T^+(H_2O)_4$) et stabilise la structure. Il est intéressant de constater l'absence d'une couche d'hydratation fermée pour $n = 4$. À partir de ces énergies, j'ai calculé les énergies de liaison BE_{min} et BE_{ave} d'une molécule d'eau, BE_{min} impliquant les conformères de plus basse énergie, et BE_{ave} étant la moyenne de toutes les voies d'évaporation possibles avec un réarrangement minimal, sans pondération. Dans les deux cas, l'énergie de liaison diminue progressivement avec le nombre n de molécules d'eau, ce qui est de nouveau en contradiction avec une couche fermée pour $n = 4$ (cf. Figure 15). De plus, l'évolution de l'énergie de liaison est non-linéaire : la chute est la plus grande entre $n = 1$ et 2. Par contre, les calculs ne prédisent pas un changement assez significatif d'énergie de liaison entre $n = 3$ et 4 pour expliquer l'augmentation significative d'évaporation observée expérimentalement. Cela suggère que l'énergie de liaison n'est pas le seul paramètre pertinent dans ce processus : le nombre de voies d'évaporation différentes dans une même gamme d'énergie de liaison peut aussi jouer un rôle, surtout dans un ion métastable dont l'énergie interne vibrationnelle doit par définition être proche de la barrière pour que la dissociation (ici, l'évaporation d'une molécule d'eau) se produise.⁸⁷

Tableau 1 : taux de perte d'H₂O dans le radical cation de thymine hydraté, et énergies de liaison d'une molécule d'eau BE_{min} et BE_{ave} calculées au niveau MP2/6-31+g(d,p) (voir le texte et la Figure 15).

Agrégat initial	Taux de perte d'H₂O	BE_{min} (eV)	BE_{ave} (eV)
$T^+(H_2O)_6$	18.6 ± 5.4 %	Non calculée	Non calculée
$T^+(H_2O)_5$	12.5 ± 3.3 %	Non calculée	Non calculée
$T^+(H_2O)_4$	17.5 ± 2.6 %	0,58	0,52
$T^+(H_2O)_3$	8.1 ± 1.4 %	0,63	0,55
$T^+(H_2O)_2$	Pas de signal détecté	0,77	0,61

Il serait intéressant de répéter ces mesures en faisant varier la longueur d'onde du laser UV, afin de voir si l'évaporation d'eau des ions métastables possède un seuil d'apparition, ce qui serait l'indication d'un rôle joué par l'état excité de la molécule *neutre* atteint par le premier photon absorbé, comme nous l'avons vu dans les parties I) et II) du Chapitre 2. Ceci permettrait d'obtenir l'effet d'un certain nombre de molécules d'eau sur l'énergie de l'état excité S_1 de la thymine, ce qui n'a jamais été étudié expérimentalement, à ma connaissance.

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'effet de quelques molécules d'eau sur les processus induits par l'ionisation de nucléobases de l'ADN après l'absorption de plusieurs photons UV ou impact électronique. L'évaporation de l'eau se produit jusqu'à plusieurs microsecondes après l'ionisation et est due à l'apport d'énergie vibrationnelle dans le système et son transfert de la nucléobase au solvant. Un résultat surprenant est la confirmation de la réactivité induite par plusieurs molécules d'eau autour de l'adénine, pour former l'hyoxanthine, une réaction qui avait été prédite théoriquement. L'ionisation de l'eau peut aussi induire un transfert de proton vers la nucléobase. Par conséquent, l'eau peut jouer un rôle actif et ne pas seulement constituer un réservoir à énergie vibrationnelle qui réduit la fragmentation de la biomolécule. Nous allons voir d'autres exemples de ce rôle actif de l'environnement moléculaire dans le chapitre suivant.

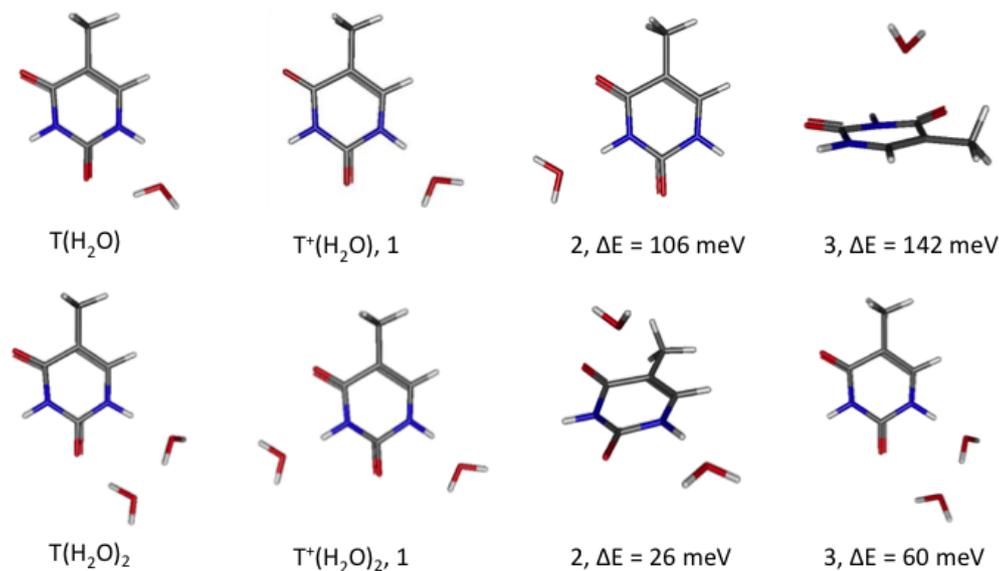


Figure 12 : structure des conformères de plus basse énergie des agrégats de thymine neutres et ionisés liés à une et deux molécules d'eau, optimisée au niveau MP2/6-31+g(d,p). L'énergie relative des conformères par rapport au conformère 1 est aussi indiquée (correction du point zéro d'énergie vibrationnelle incluse).

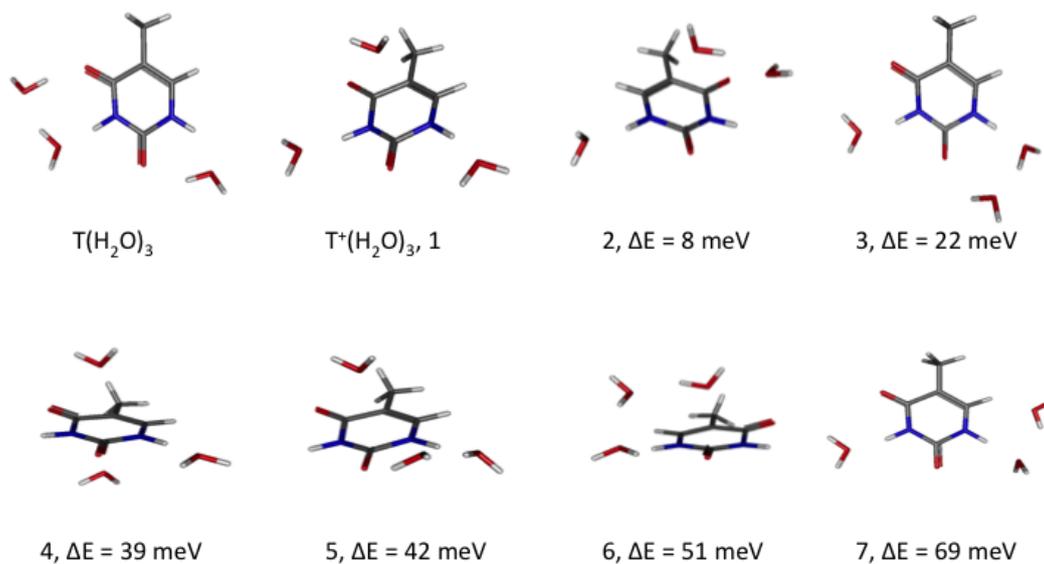


Figure 13 : structure des conformères de plus basse énergie des agrégats de thymine neutres et ionisés liés à trois molécules d'eau, optimisée au niveau MP2/6-31+g(d,p). L'énergie relative des conformères par rapport au conformère 1 est aussi indiquée (correction du point zéro d'énergie vibrationnelle incluse).

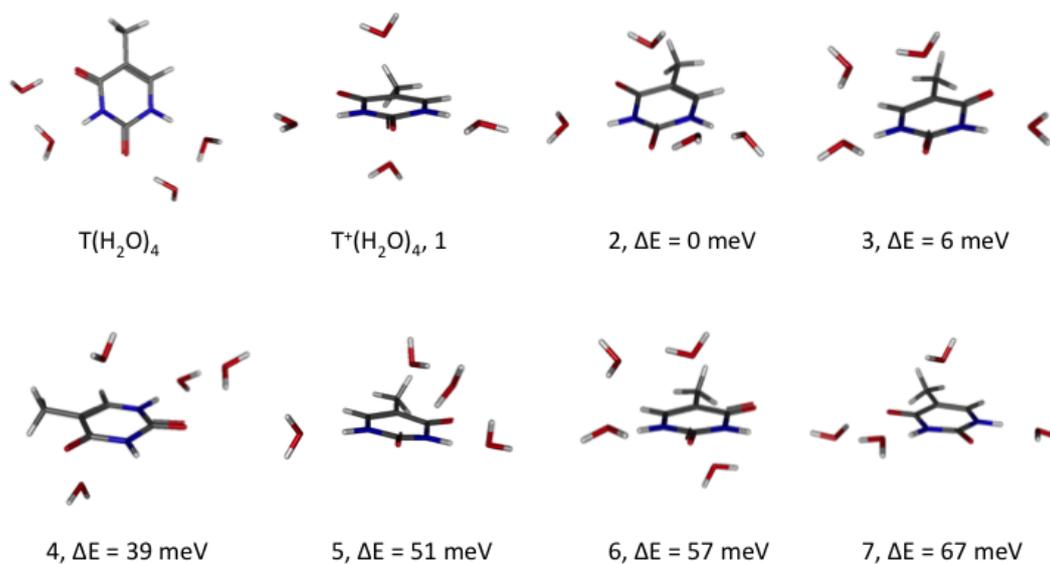


Figure 14 : structure des conformères de plus basse énergie des agrégats de thymine neutres et ionisés liés à quatre molécules d'eau, optimisée au niveau MP2/6-31+g(d,p). L'énergie relative des conformères par rapport au conformère 1 est aussi indiquée (correction du point zéro d'énergie vibrationnelle incluse).

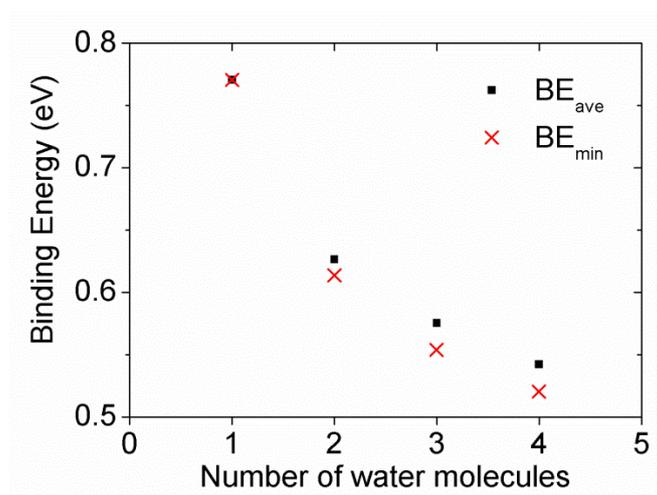


Figure 15 : énergies de liaison minimale (BE_{\min}) et moyenne (BE_{ave}) d'une molécule d'eau dans les agrégats du radical cation de thymine avec n molécules d'eau, calculées au niveau MP2/6-31+g(d,p), en fonction de n (voir le texte pour plus de détails).

Chapitre 4 : Influence d'un environnement moléculaire non-covalent autre que le solvant

Dans le chapitre précédent, j'ai montré que la nanohydratation influence les processus induits par l'irradiation de nucléobases de l'ADN/ARN. Mais l'eau n'est pas la seule espèce à pouvoir être liée de manière non-covalente aux biomolécules : les fonctions biologiques nécessitent très souvent ce type de liaison, par exemple lors du passage d'ions tels que le sodium ou le chlore à travers les protéines transmembranaires, ou encore dans le contexte de la reconnaissance spécifique d'un médicament par son récepteur (j'en parlerai brièvement dans le Chapitre 5). Par conséquent, il est important d'étudier les effets d'un environnement moléculaire non-covalent autre que l'eau sur les processus moléculaires radio-induits. Je donnerai ici deux exemples : l'irradiation d'agrégats d'acides aminés par des ions, et l'activation de complexes peptide – éther couronne par plusieurs méthodes de spectrométrie de masse de routine.

I) Ionisation et fragmentation d'agrégats d'acides aminés et d'acide lactique par collision avec des faisceaux d'ions

Cette partie a pour but la description d'études concernant des acides aminés, les constituants des protéines, et l'acide lactique, un produit de la fermentation bactérienne et du métabolisme des mammifères. L'objectif était d'irradier les agrégats de ces molécules neutres avec des faisceaux d'ions et d'analyser les cations produits par spectrométrie de masse à temps de vol. Une nouveauté dans l'analyse et le traitement des données, par rapport à ce dont j'ai parlé auparavant, réside dans la détection des fragments ioniques en coïncidence. Ce genre de techniques de détection vient de la physique nucléaire, où la collision entre un projectile à très haute énergie cinétique (de l'ordre du MeV ou GeV) et un noyau-cible peut créer plusieurs particules chargées, dont l'énergie cinétique et la trajectoire fournissent des renseignements sur les processus nucléaires sous-jacents. Ici, l'idée est d'enlever au moins deux électrons à un système moléculaire neutre, créer au moins deux fragments chargés positivement, les extraire dans un spectromètre TOF en utilisant une impulsion de tension dont le front montant constitue l'instant t_0 , et détecter les temps d'arrivée $t_1, t_2 \dots$ des fragments ioniques issus d'une même collision avec une résolution temporelle suffisante pour les distinguer. Celle des galettes à micro-canaux est de l'ordre de quelques nanosecondes, ce qui est bien plus petit que la différence de temps de vol (de l'ordre de 0,1-1 μ s) entre deux ions moléculaires de la taille des briques élémentaires des biomolécules. La condition pour que le système d'acquisition puisse faire la différence entre un ion issu d'une collision donnée et un ion issu de la suivante est de rester dans le régime de collision unique : dans ce cas, une seule collision au maximum se produit par extraction des ions dans le TOF. Par conséquent, le taux de comptage (nombre d'ions détectés par seconde) doit rester bien inférieur à la fréquence d'extraction, souvent de l'ordre du kHz pour les TOF, car le temps de vol est de l'ordre de la dizaine ou centaine de microsecondes. Cette technique de détection d'ions en coïncidence permet d'obtenir des informations supplémentaires sur les processus radio-induits, notamment concernant l'ionisation multiple, comme nous allons le voir. Au laboratoire CIMAP, il existe un montage qui permet de former des agrégats de molécules neutres en phase gazeuse et de les irradier avec un faisceau d'ions dont l'énergie cinétique est de l'ordre de la dizaine de keV, sur une ligne de l'installation ARIBE (voir la Figure 16).

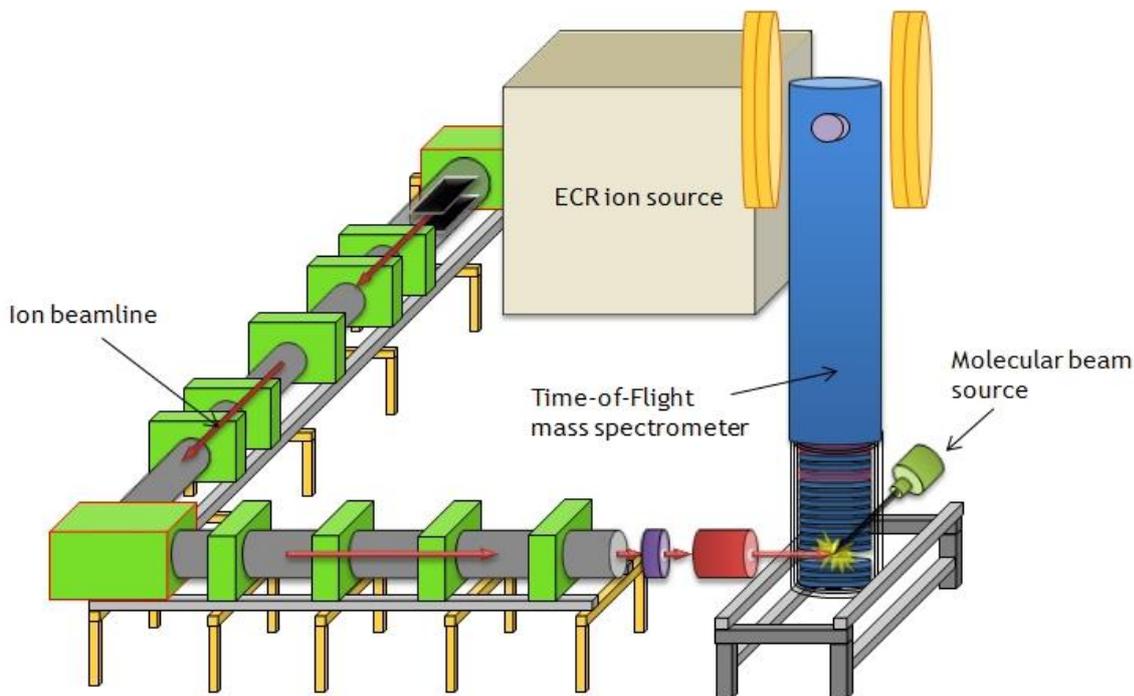


Figure 16 : schéma du montage expérimental utilisé au CIMAP pour l'irradiation d'agrégats moléculaires par des faisceaux d'ions. Les éléments magnétiques sont de couleur verte.

Les ions atomiques sont produits par une source à résonance électronique cyclotronique (ECR), qui permet de créer des faisceaux d'ions multichargés avec une intensité de l'ordre du microampère et une énergie cinétique de l'ordre de $10 \text{ keV}/z$ (avec z la charge de l'ion). À cette énergie, le processus majoritaire d'interaction est la capture par l'ion d'un ou plusieurs électrons au système moléculaire neutre cible, qui devient alors chargé positivement. D'autre part, la source d'ARIBE est capable de fournir un panel d'ions différents, de He à Xe, et différents états de charge d'un même ion, allant jusqu'au Xe^{30+} . Ces hauts états de charge sont intéressants pour les collisions avec les systèmes en phase gazeuse, car ils donnent lieu à la capture de plusieurs électrons à la cible, ce qui permet d'étudier les processus moléculaires induits par la multi-ionisation. De plus, la gamme de paramètre d'impact sondée par l'ion peut être élargie en augmentant la charge, car la capture d'électron est largement gouvernée par le modèle de la barrière coulombienne.⁸⁸ Après avoir été extrait de la source par une tension de l'ordre de 10 kV , le faisceau d'ions est pulsé par une tension appliquée sur deux plaques parallèles à la direction de propagation, il est guidé et mis en forme par des dipôles et des quadripôles magnétiques, passe par la zone d'interaction du TOF, et son intensité est mesurée par une cage de Faraday située en bout de ligne. Dans la zone d'interaction arrive également le faisceau d'agrégats moléculaires formé par une source d'agrégation gazeuse représentée sur la Figure 17. Ce faisceau passe par deux écorceurs pour réduire sa divergence, avant d'être irradié orthogonalement par le faisceau d'ions pendant quelques microsecondes, entre deux plaques de la zone d'extraction du spectromètre TOF (voir la Figure 17). Pour que le faisceau d'ions puisse traverser cette zone, on applique une tension de 0 V sur les plaques, et après sa sortie de la zone d'extraction, on applique une tension de quelques kV à l'instant t_0 de façon à extraire orthogonalement les cations produits par l'irradiation, en utilisant le spectromètre TOF dans un mode Wiley-McLaren. Les cations sont alors post-accélérés par une anode dont le potentiel est de -19 kV , ce qui induit l'émission d'électrons qui sont déviés par des bobines de Helmholtz vers des galettes à micro-canaux (MCP, voir la Figure 17). Le signal de sortie des galettes est amplifié puis envoyé à une carte informatique qui enregistre en coïncidence les instants t_n correspondant à la détection des n ions produits par chaque extraction. On peut alors en déduire le temps de vol de chaque ion et construire des spectres de temps de vol, qui

peuvent être convertis en spectres de masse via une calibration, mais aussi ne garder dans ces spectres que le signal issu des collisions ayant produit un ion, deux, trois, etc... Nous appelons ces spectres 1, 2, 3 (...) stops. Lorsque le spectre de masse contient tous les évènements, il est appelé « spectre inclusif ».

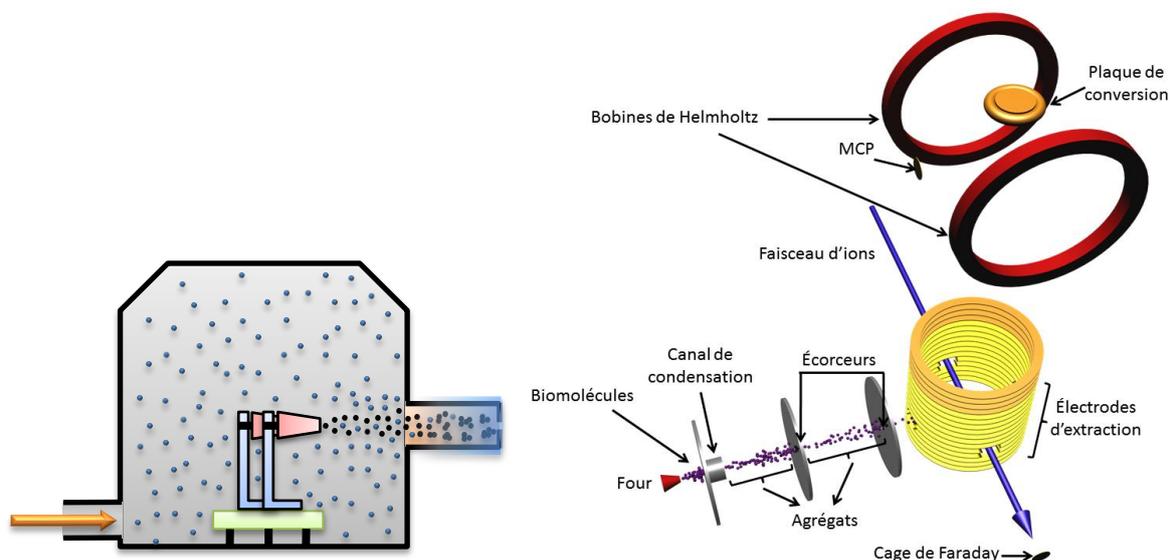


Figure 17 : à gauche : schéma de la source d'agrégation gazeuse. Un flux d'hélium gazeux (flèche) est injecté dans une enceinte dans laquelle est placé un four qui chauffe une poudre de molécules. Ce flux entraîne les molécules à travers un canal de condensation refroidi à l'azote liquide (77 K), ce qui provoque la formation d'agrégats, qui sortent par un trou de quelques mm de diamètre. À droite : schéma en 3D de l'interaction entre les agrégats et le faisceau d'ions, et du spectromètre de masse à temps de vol.

Nous avons étudié les agrégats des acides aminés glycine, alanine et valine, ainsi que d'acide lactique, par collision avec un faisceau O^{3+} à 30 keV, et les spectres de masse inclusifs sont visibles dans la Figure 18. Dans tous les cas, les agrégats simplement chargés dominent le spectre, et il s'avère que ce sont des espèces protonées en grande majorité. Nous avons voulu tester l'influence de l'affinité protonique (AP) des molécules sur l'abondance du monomère protoné par rapport au radical cation. Si l'on compare dans la Figure 19 les spectres de l'alanine ($AP = 902 \text{ kJ.mol}^{-1}$)⁵⁶ et de l'acide lactique ($AP = 817,4 \pm 4.3 \text{ kJ.mol}^{-1}$)⁵⁶ dans la région du monomère simplement chargé, on constate que le radical cation de l'acide lactique est beaucoup plus abondant (d'un facteur 10 environ) que celui de l'alanine, ce qui va dans le sens d'un transfert de proton à l'origine de la formation du monomère protoné. Ce phénomène a déjà été observé dans les agrégats d'acides aminés ionisés par absorption de photons VUV⁸⁹ ou impact électronique,⁹⁰ mais c'est la première fois pour des collisions avec un faisceau d'ions. Par conséquent, quelle que soit la nature du rayonnement ionisant, il semble que le transfert de proton se produise. Ces agrégats étant liés principalement par des liaisons H, on peut penser que ces liaisons sont impliquées dans le transfert. Nous verrons ce qu'il en est un peu plus loin.

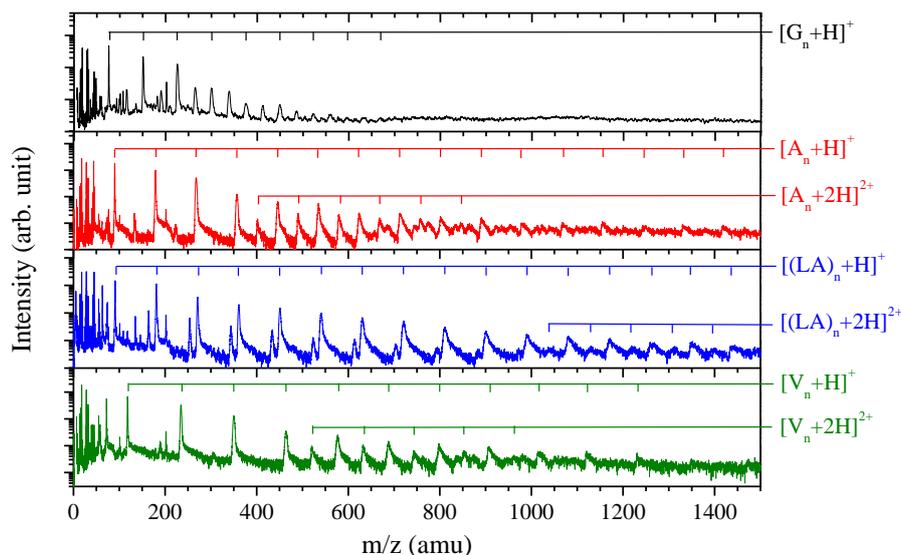


Figure 18 : tracé semi-logarithmique des spectres de masse inclusifs obtenus après irradiation d'agrégats de glycine, alanine, acide lactique et valine (de haut en bas) par des ions O^{3+} à 30 keV.

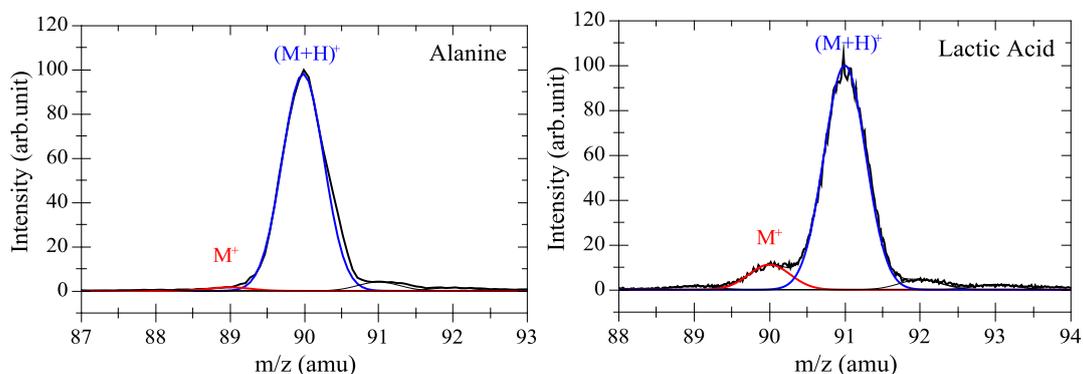


Figure 19 : spectres de masse de l'acide lactique et de l'alanine dans la région du monomère. La molécule protonée est indiquée par $(M+H)^+$ et le radical cation par M^+ . Les courbes gaussiennes ajustant l'expérience sont visibles en rouge et bleu.

Ensuite, nous avons étudié la partie du spectre où figurent les fragments du monomère, c'est-à-dire celle qui apparaît dans la Figure 20. Il est notable que dans tous les cas sauf la valine, on observe un pic correspondant au monomère protoné qui perd une molécule de CO (28 uma). Nos mesures sur l'alanine isotopique montrent que c'est le CO du groupement carboxyle qui est perdu (voir la Figure 20). Dans la littérature, cette voie de fragmentation est connue comme étant celle de plus basse énergie dans les expériences de dissociation induite par collision (CID) d'acides aminés protonés sur du gaz rare. Une exception est la valine, pour laquelle la voie de plus basse énergie est la perte de 46 uma, ce qui donne un pic à 72 uma, présent dans notre spectre. Nos résultats sont donc compatibles avec une fragmentation des monomères protonés formés par l'ionisation d'agrégats par des ions multichargés, ce qui voudrait dire que ces derniers ont laissé les monomères protonés dans un état vibrationnel excité. Ceci est cohérent avec le fait qu'on observe des signes de la fragmentation d'ions métastables, comme nous allons le voir maintenant. En effet, la présence de ce phénomène, que nous avons déjà rencontré dans les chapitres précédents, peut être déduite de l'analyse des spectres de temps de vol. Prenons l'exemple des agrégats de valine : lorsqu'on regarde la Figure 21, on remarque que certains pics ne sont pas totalement symétriques : du signal supplémentaire apparaît à des temps de vol plus longs, donc à droite du pic. Ce signal est attribué à des ions de même rapport m/z mais se formant lors de la fragmentation d'ions plus lourds pendant leur accélération dans la zone d'extraction du spectromètre, c'est-à-dire à une échelle de temps de l'ordre de la microseconde. Nous avons vu

auparavant que ce type de fragmentation se produisait lorsque l'énergie vibrationnelle des ions était proche de la barrière d'énergie potentielle de la voie de fragmentation en question (voir le Chapitre 2). Dans le cas de la valine, nous avons calculé le temps de vol du fragment de masse 72 lorsqu'il est issu de la dissociation du monomère à la fin de la zone d'extraction du spectromètre, et refait la même chose pour l'évaporation d'une molécule de valine issue du trimère et du dimère. Les résultats, visibles dans la Figure 21, prouvent bien que ces processus sont à l'origine du signal observé, puisque celui-ci chute aux temps de vol correspondants. De plus, il est frappant de constater que ce signal est présent uniquement dans les spectres 2- et 3-stops de la Figure 21 : en fait, il est aussi observé dans le spectre 1-stop mais pour les gros agrégats, au-dessus de 9 molécules. Ceci veut dire que la fragmentation métastable est bien plus probable lorsque plusieurs fragments chargés sont produits par la collision. Pour tenter de comprendre, il faut d'abord se rappeler que nous avons observé très peu d'espèces multichargées dans le spectre de masse, on peut donc faire l'approximation que seuls des monocations sont présents. Par conséquent, le spectre 1-stop est composé des monocations provenant d'agrégats ionisés *une seule fois*, ils ne peuvent donc pas avoir subi une séparation de charge, mais seulement de l'évaporation et/ou de la fragmentation. Par contre, dans les spectres multi-stops, les monocations viennent d'agrégats ionisés *plusieurs fois*, ce qui implique une séparation des charges via une cassure des liaisons covalentes ou non-covalentes. Ce dernier phénomène se produit systématiquement pour les petits agrégats de taille inférieure à la taille critique, qui est justement de 9 pour les agrégats de valine doublement chargés (cf. Figure 18). Par conséquent, l'observation d'évaporation métastable dans le spectre 1-stop pour les agrégats doublement chargés de taille supérieure à 9 indique que la double ionisation laisse le système dans un état vibrationnel plus excité que l'ionisation simple. De plus, l'augmentation de la fragmentation métastable dans les spectres 2- et 3-stops confirme que l'ionisation multiple augmente l'énergie vibrationnelle dans le système après collision. Ceci est cohérent avec le modèle la barrière coulombienne qui décrit la capture d'un ou plusieurs électrons par l'ion projectile : il stipule que le paramètre d'impact doit diminuer lorsque le nombre d'électrons capturés augmente.⁹¹ Si l'ion passe plus près du système, la probabilité d'excitation électronique de ce dernier est plus grande, et donc la quantité d'énergie vibrationnelle après conversion interne augmentera, et la fragmentation métastable aussi.⁹²

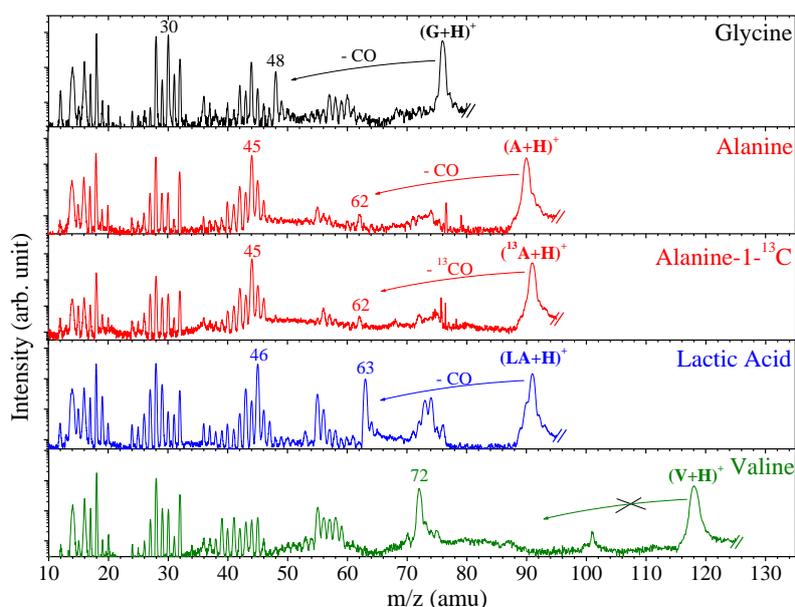


Figure 20 : tracé semi-logarithmique des spectres de masse obtenus après irradiation d'agrégats de glycine, alanine, alanine-1-¹³C, acide lactique et valine (de haut en bas) par des ions O³⁺ à 30 keV. Seule la région jusqu'au monomère est visible.

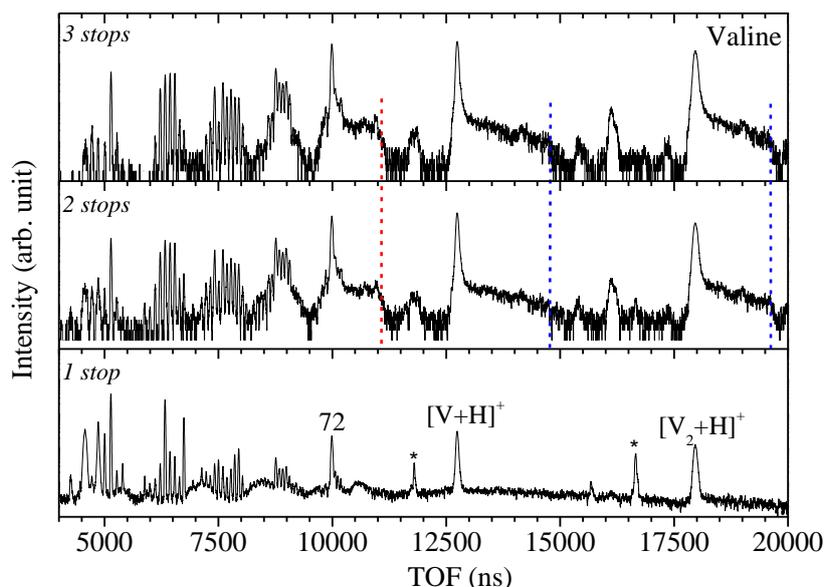


Figure 21 : tracé semi-logarithmique des spectres de temps de vol 1, 2 et 3-stops obtenus après irradiation d'agrégats de valine par des ions O^{3+} à 30 keV. Les monomère et dimère protonés de valine sont notés $[V+H]^+$ et $[V_2+H]^+$, respectivement. La position d'un fragment de masse 72 uma de la valine est également indiquée. Les pointillés rouges (bleus) indiquent le temps de vol de ce fragment (du monomère et du dimère) lorsqu'il est issu de la dissociation du monomère (du dimère et du trimère) à la fin de la zone d'extraction du spectromètre. Les astérisques indiquent des pics dus à des pollutions.

J'ai également mené des calculs de structure et d'énergie de dimères d'acides aminés et d'acide lactique neutres et ionisés, dans leur état électronique fondamental à 0 K, pour en savoir plus sur leur comportement vis-à-vis d'un éventuel transfert de proton induit par l'ionisation. Les résultats sont montrés dans la Figure 22. On constate que pour la glycine et l'alanine, un transfert de proton se produit spontanément après ionisation de l'un des conformères de basse énergie potentielle, menant à la création d'un groupement $R-NH_3^+$ dans l'une des deux molécules du dimère, alors que pour l'acide lactique, ce n'est pas le cas. De plus, pour une même molécule, l'énergie potentielle du conformère ayant subi ce transfert est très basse (0,8 – 1 eV) comparée à celle des autres. Ces résultats sont qualitativement cohérents avec les observations expérimentales, puisque les monomères protonés sont plus abondants pour les acides aminés que pour l'acide lactique, et confirment le rôle joué par le transfert de proton intermoléculaire induit par l'ionisation. On pourrait objecter que l'acide lactique protoné est tout de même largement majoritaire par rapport au radical cation, bien que les calculs présentés dans la Figure 22 ne prédisent pas de transfert de proton, mais il faut garder à l'esprit que ces calculs sont faits à température nulle, c'est-à-dire sans énergie vibrationnelle, alors que l'on a démontré ici que suite à la collision des agrégats avec l'ion, cette quantité d'énergie est suffisante pour que le monomère protoné fragmente, elle est donc loin d'être nulle, et favorise sans doute le transfert de proton, même dans les agrégats d'acide lactique ionisés. Depuis notre publication,⁹³ de nombreux travaux ont confirmé que ce processus se produit dans une vaste gamme de conditions expérimentales et pour de nombreuses molécules organiques : de l'ionisation par impact d'électrons d'agrégats de valine en phase gazeuse⁹⁴ ou dans des gouttelettes d'hélium,⁹⁵ à l'ionisation d'agrégats de nucléobases par absorption d'un photon VUV⁹⁶ ou impact d'ions,⁹⁷ en passant par l'ionisation d'agrégats d'acides carboxyliques par impact d'électrons et photoabsorption.⁹⁸ Récemment, nous avons aussi observé un transfert de proton induit par l'ionisation par photoabsorption VUV et X dans des complexes non-covalents impliquant un antibiotique, la vancomycine, à l'aide d'un montage que je détaillerai dans le Chapitre 5. Une question restant largement en suspens concernant les agrégats d'acides aminés est celle de la durée nécessaire à ce processus : il n'y a pour l'instant aucune mesure ni calcul. Des expériences pompe-sonde utilisant des lasers femtosecondes pourraient y remédier,

comme celles qui ont déjà été appliquées aux agrégats de nucléobases de l'ADN/ARN⁹⁹ et d'autres molécules organiques,¹⁰⁰⁻¹⁰³ et qui ont montré que cette durée peut être inférieure à 50 fs mais aussi de l'ordre de la dizaine de picosecondes dans certains cas. Je prévois de faire des mesures d'ionisation résolues en temps sur des systèmes plus pertinents biologiquement que les briques élémentaires de l'ADN/ARN ou des protéines, à l'aide d'un laser X à électrons libres (XFEL), un grand instrument qui fournit des impulsions de photons X femtosecondes : ce point sera détaillé dans le Chapitre 7.

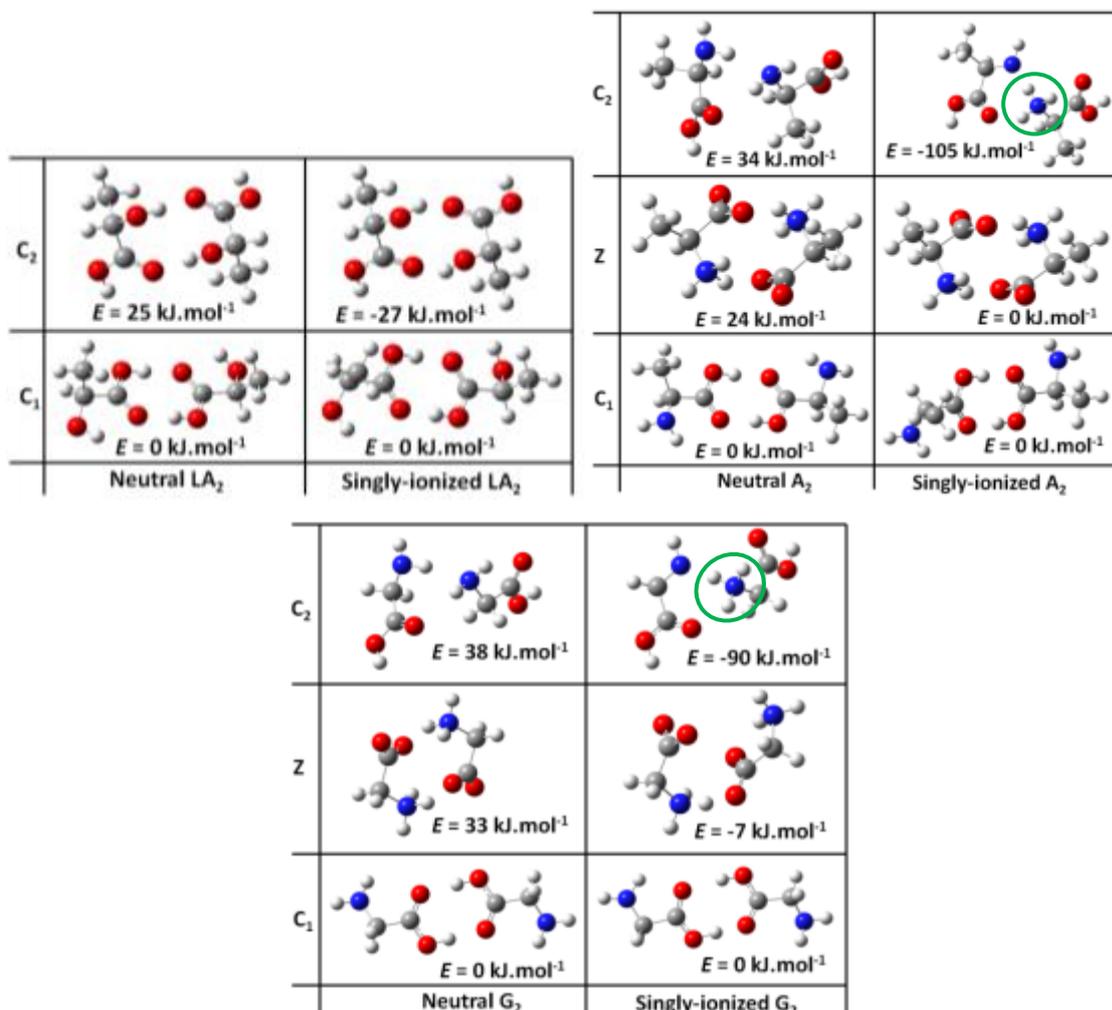


Figure 22 : structures de conformères de basse énergie de dimères de glycine (en bas), d'acide lactique (en haut à gauche) et d'alanine (en haut à droite), neutres et ionisés une fois, dans leur état électronique fondamental, calculées au niveau MP2/D95++(d,p). Leur énergie potentielle relative corrigée par le point zéro est également indiquée. Les atomes de carbone, oxygène, azote et hydrogène sont visibles en gris, rouge, bleu et blanc, respectivement. Les groupements protonés $R-NH_3^+$, formés par le transfert de proton après ionisation, sont entourés en vert.

II) Dissociation de petits peptides nanosolvatés après transfert d'électron du sodium

J'étudie les processus dans les petits peptides protonés après transfert d'électron depuis mon stage de Master en 2005 dans le groupe de Steen B. Nielsen à l'Université d'Århus (Danemark). Nous avons alors publié un article sur la réduction de la fragmentation de ces systèmes par la nanosolvation.¹⁰⁴ Des années plus tard, je suis retourné à Aarhus pour continuer ces recherches dans le cadre du programme européen COST Nano-IBCT, en me focalisant cette fois sur la différence entre deux molécules de solvant : l'acétonitrile et l'éther 18-couronne-6 (CE). Cette dernière n'est pas un solvant

à proprement parler, mais plutôt une molécule utilisée pour sa capacité à se lier fortement de manière non-covalente à des cations ou des groupements chargés positivement tels que Na^+ , Ca^{2+} , NH_4^+ , R-NH_3^+ (voir la Figure 23)... Comme il existe ce type de groupement dans les trois acides aminés à chaîne latérale basique (histidine H, lysine K et arginine R), le CE est beaucoup utilisé dans les travaux se rapportant à la protéomique, par exemple pour contrôler la structure et l'état de charge des protéines en phase gazeuse.^{105,106} Dans notre cas, les systèmes étudiés sont des tripeptides (Lysine-Tryptophane-Lysine ou KWK et Lysine-Tyrosine-Lysine ou KYK) doublement protonés mis en phase gazeuse par une source électrospray. Nous avons utilisé un accélérateur d'ions suivi d'un aimant pour sélectionner ces tripeptides isolés ou nanosolvatés selon leur rapport m/z et réaliser des collisions avec une vapeur de sodium. Cet atome possède une énergie d'ionisation très faible (un peu plus de 5 eV⁵⁶), la section efficace de transfert d'un électron au dication est donc assez grande pour que la durée d'acquisition d'un spectre de masse soit raisonnable (de l'ordre d'une heure) avec le courant d'ions issu d'une source électrospray (environ 1 pA). Les espèces cationiques créées après transfert sont alors analysées selon leur rapport m/z par un dispositif électrostatique. À partir des spectres de masse, on identifie les principaux processus induits par le transfert d'un électron (perte d'un H, de NH_3 , rupture d'une liaison N- C_α) à partir du rapport m/z des fragments, et on calcule l'aire sous chaque pic pour en déduire la probabilité de chacun des processus. Les résultats pour KYK sont visibles dans la Figure 24 (ils sont similaires pour KWK) : pour le peptide isolé, on constate que les processus sont différents de ceux d'une étude précédente du groupe d'E. Williams,¹⁰⁷ où les fragments majoritaires sont issus de la rupture des liaisons peptidiques après capture d'un électron libre. Par contre, lorsque le peptide est initialement lié à quelques molécules d'eau, les résultats de la même étude montrent que les voies de fragmentations et leurs probabilités deviennent similaires aux nôtres. Or le groupe d'E. Williams a montré que la fragmentation après capture d'un électron libre (ECD) était statistique et se produisait dans l'état fondamental électronique du peptide, les changements dans la fragmentation étant dus à la baisse de l'énergie vibrationnelle moyenne par degré de liberté du système, suite à l'augmentation de sa taille et/ou l'évaporation des molécules d'eau. Par conséquent, nous pouvons en déduire que le peptide a moins d'énergie vibrationnelle après transfert d'électron du sodium qu'après capture d'un électron libre. Ceci a déjà été constaté lors de l'étude d'autres systèmes,¹⁰⁸ et attribué à plusieurs facteurs : d'abord, l'énergie cinétique (quelques eV dans le cas des expériences d'E. Williams) de l'électron libre capturé doit être convertie en énergie électronique, vibrationnelle ou rotationnelle du peptide, celle-ci étant appelée « énergie de recombinaison » dans le cas d'un système chargé positivement. Cette énergie a été mesurée dans la gamme 4 – 7 eV, par exemple au minimum 4,3 eV pour $[\text{KYK}+2\text{H}]^{2+}$.¹⁰⁷ La situation est différente en ce qui concerne le transfert d'un électron initialement lié : la barrière doit être surpassée et la probabilité de transfert dépend du paramètre d'impact, tout comme l'énergie transférée au peptide. Holm et co.¹⁰⁹ ont d'ailleurs montré que cette énergie augmente avec la taille du système dans le cas d'agrégats de $\text{Ca}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_n$. Un autre facteur possible est l'effet cinétique, dû au fait que la durée disponible pour la dissociation est de l'ordre de la microseconde pour les expériences où l'électron est capturé par le sodium, et de la seconde pour l'ECD. Cependant, je montrerai plus loin que cet effet ne joue a priori aucun rôle.

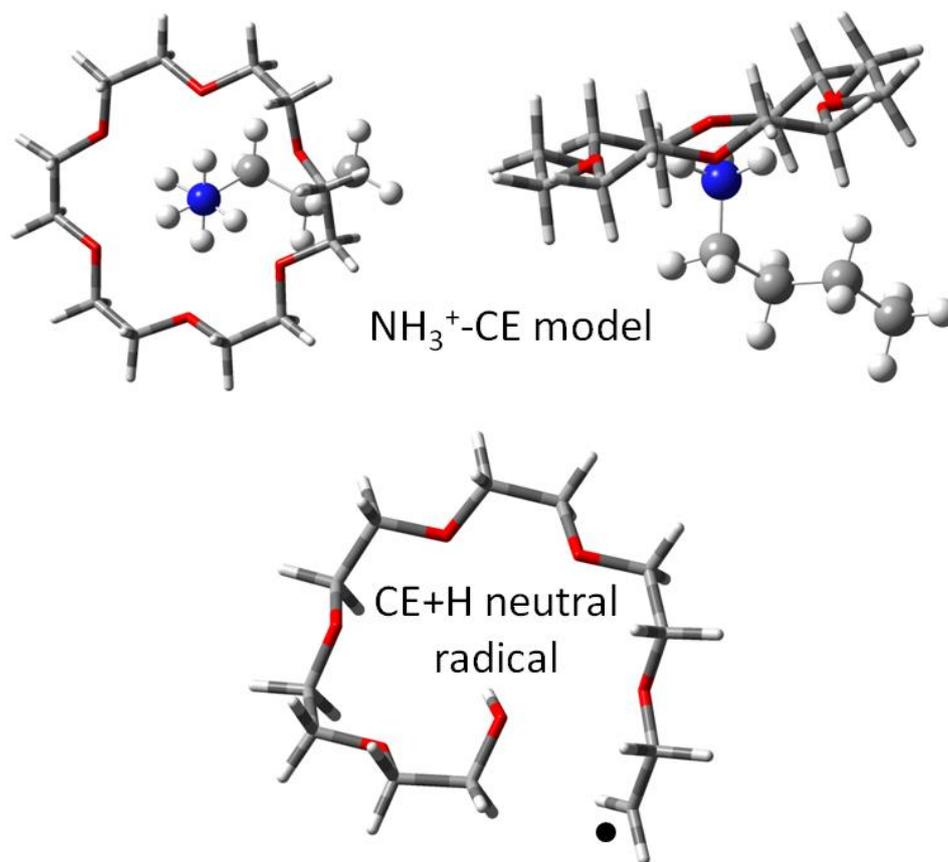


Figure 23 : structures optimisées de modèles de l'interaction entre la chaîne latérale d'une lysine et un CE (en haut) et du radical neutre formé par transfert de H vers le CE après capture d'électron (en bas). Le niveau de calcul est B3LYP/6-311++g(2d,p). Les atomes C, N, H et O sont représentés en gris, bleu, blanc et rouge, respectivement. Le point noir représente la position de l'électron célibataire dans le radical.

Dans la Figure 24, on peut aussi voir l'effet de la nanosolvation sur les processus induits par le transfert d'un électron du sodium, dans le cas du peptide KYK (les résultats sont similaires pour KWK, voir notre article sur ce sujet¹¹⁰). Ce qui saute aux yeux est l'influence majeure du CE dès la première molécule attachée, alors qu'il faut deux molécules d'acétonitrile pour que la fragmentation du peptide soit légèrement réduite (la probabilité pour que le peptide reste intact augmente). Cet effet pourrait en principe être dû à l'évaporation du solvant, qui « refroidit » le système, mais ce n'est pas le cas pour CE : en effet, la quantité de peptide intact est la même, qu'un CE soit encore attaché ou pas. Une autre explication doit donc être trouvée, et elle réside sans doute dans l'augmentation de la taille du système nanosolvaté par rapport au système isolé : l'énergie vibrationnelle se redistribue alors dans un nombre de degrés de liberté supérieur et la probabilité de casser une liaison donnée se trouve réduite. Cet effet a été observé de nombreuses fois dans la fragmentation de systèmes moléculaires en phase gazeuse, j'en reparlerai dans le Chapitre 5. L'observation la plus intéressante est l'augmentation de la probabilité de perte de H lorsque le peptide a deux CE au lieu d'un seul, ainsi que lorsque les CE restent attachés au peptide après capture d'électron (voir la Figure 24). Cette perte de H a pour origine les groupements R-NH₃⁺ qui deviennent des radicaux hypervalents après transfert d'électron, et ces groupements sont les sites de liaison des CE. Ceci est surprenant car on pouvait s'attendre à un effet de « cage » de la part du CE, qui est lié aux trois H du groupement R-NH₃ et donc tendrait à les maintenir à leur position. Une explication à ce phénomène serait un transfert de H vers le CE, et mes calculs de chimie quantique prédisent une ouverture du cycle du CE+H radicalaire formé (voir la Figure 23). J'ai exploré cette hypothèse d'une implication du CE dans les processus induits par capture ou transfert d'électron dans des travaux plus récents que je vais détailler dans la partie suivante.

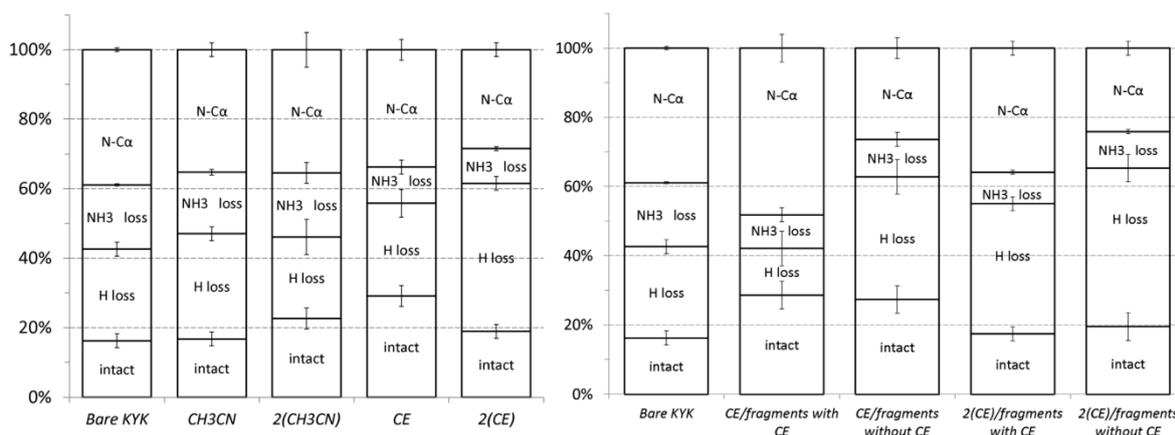


Figure 24 : histogrammes représentant la probabilité des différents processus induits dans le peptide $[KYK+2H]^{2+}$ isolé (« Bare KYK ») et nanosolvaté (CH_3CN est l'acétonitrile et CE l'éther 18-couronne-6) après transfert d'électron du sodium. Ces probabilités ont été calculées à partir des spectres de masse obtenus à l'Université d'Aarhus.

III) Implication de l'éther-couronne dans les processus induits par la capture ou le transfert d'électron dans des tripeptides protonés

J'ai déjà évoqué dans la partie précédente l'intérêt que l'éther 18-couronne-6 (CE) a récemment suscité dans les recherches visant à améliorer les techniques de protéomique, où le CE est lié de manière non-covalente et plus ou moins fortement aux groupements chargés des peptides ou protéines en phase gazeuse. Ces ions moléculaires subissent alors une activation dans un spectromètre de masse afin d'obtenir des informations sur leurs structures primaire à quaternaire, le plus souvent par collision de basse énergie (de l'ordre de 10 eV par charge) avec un gaz inerte comme He, Ar ou N_2 , mais aussi par capture d'un électron libre ou transfert d'un électron d'un anion moléculaire, ou encore par irradiation de particules de matière (ions, électrons...) ou de photons. Dans la grande majorité de ces études, le CE est considéré comme passif lors de l'activation, c'est-à-dire qu'il peut simplement s'évaporer. Curieusement, il a été montré que ce processus d'évaporation peut induire une diminution de la charge totale de protéines multiprotonées lorsque celles-ci ont initialement plusieurs CE attachés, mais ce phénomène n'avait pas été expliqué.¹⁰⁵ C'est chose faite, depuis les études que nous avons menées récemment dans le cadre de la thèse de M. Abdelmouleh,¹¹¹ en collaboration avec les équipes de G. Frison du Laboratoire de Chimie Moléculaire (LCM) à l'École Polytechnique, et de G. van der Rest de l'Institut de Chimie Physique (ICP) à l'Université Paris Saclay. En effet, nous nous sommes intéressé aux situations dans lesquelles le CE est actif lors des processus induits par collision, capture ou transfert d'électron dans les mêmes tripeptides que lors des expériences réalisées à l'Université d'Århus (voir la partie précédente). Dans les deux montages expérimentaux que nous avons utilisés, les complexes entre un ou plusieurs CE et les tripeptides KWK et KYK protonés sont mis en phase gazeuse par une source électrospray puis sélectionnés selon leur rapport m/z par un quadripôle. Au LCM, le montage permet d'accumuler les ions dans un hexapôle où des anions de fluoranthène ont été injectés pendant 20 et 60 ms afin de transférer un électron aux cations moléculaires chargés trois et deux fois, respectivement. Les cations formés sont ensuite analysés en masse dans la cellule d'un spectromètre de masse à résonance cyclotronique par transformée de Fourier (FT-ICR) où règne un champ magnétique constant de 9,4 T, ce qui constitue le spectre de masse « ETD ». Lorsqu'un gaz d'argon est injecté dans l'hexapôle, les collisions subies par les ions moléculaires provoquent leur dissociation et un spectre de masse « CID » est obtenu. Nous avons également injecté pendant 100 ms un faisceau d'électrons libres de quelques eV d'énergie cinétique dans la cellule FT-ICR, où étaient piégés les ions moléculaires, pour obtenir les spectres de masse « ECD » par capture d'électron. Il est

d'abord instructif de comparer dans la Figure 25 les spectres ECD et ETD des peptides isolés $[\text{KYK}+2\text{H}]^{2+}$ et $[\text{KWK}+2\text{H}]^{2+}$ avec ceux obtenus à l'Université d'Århus par transfert d'un électron du sodium. On peut constater que ces derniers ressemblent beaucoup aux spectres ETD, ce qui est logique car dans les deux cas un électron initialement dans un état lié est transféré au système. Par contre, ils sont très différents des spectres ECD, où un électron libre est capturé. Comme les spectres ECD et ETD ont été obtenus dans la cellule FT-ICR, où le temps laissé au système pour fragmenter est de l'ordre de la seconde, contre quelques microsecondes dans le montage de l'Université d'Århus, l'effet cinétique ne peut expliquer cette différence. C'est donc bien le fait que l'électron soit lié ou libre qui fait varier la quantité d'énergie vibrationnelle du peptide réduit : elle est bien plus faible après transfert d'électron (environ 3 eV pour des petits peptides doublement protonés d'après les mesures de Pepin et Turecek¹¹²) qu'après capture (4-7 eV), ce qui est cohérent avec le taux de fragmentation observé.

Si l'on s'intéresse maintenant à l'effet d'un CE sur le comportement de $[\text{KYK}+2\text{H}]^{2+}$ après ECD, on peut voir sur la Figure 26 que le spectre de masse change par rapport au peptide isolé : les voies de fragmentation de plus basse énergie remplacent celles de plus haute énergie, ce qui est cohérent avec une baisse de l'énergie vibrationnelle du peptide après l'évaporation du CE, due à l'augmentation de la taille du système initial et/ou l'énergie de liaison du CE. Cette dernière hypothèse est cependant invalidée par le fait que le spectre change encore lorsqu'il y a deux CE attachés au peptide (voir la Figure 26), avec principalement l'apparition de fragments c/z issus de la rupture d'une liaison N-C α et auxquels un CE reste lié. En effet, dans le complexe $[\text{KYK}+2\text{H}+2\text{CE}]^{2+}$, les deux CE sont très probablement liés aux deux groupements protonés (voir dans la Figure 27 les structures issues de mes calculs de chimie quantique), et le transfert d'électron à un site R-NH $_3^+$ a pour conséquence de baisser considérablement l'énergie de liaison du CE (de 2,3 à 0,4 eV d'après mes calculs sur le modèle montré à la Figure 23, en accord avec des calculs à un niveau plus élevé¹¹³). Par conséquent, si seule l'énergie de liaison du CE évaporé avait un effet, les spectres de $[\text{KYK}+2\text{H}+\text{CE}]^{2+}$ et $[\text{KYK}+2\text{H}+2\text{CE}]^{2+}$ devraient être les mêmes, ce qui confirme le rôle de la taille du système évoqué à la partie précédente. Nous avons obtenu des résultats similaires pour le peptide KWK (voir notre article¹¹⁴).

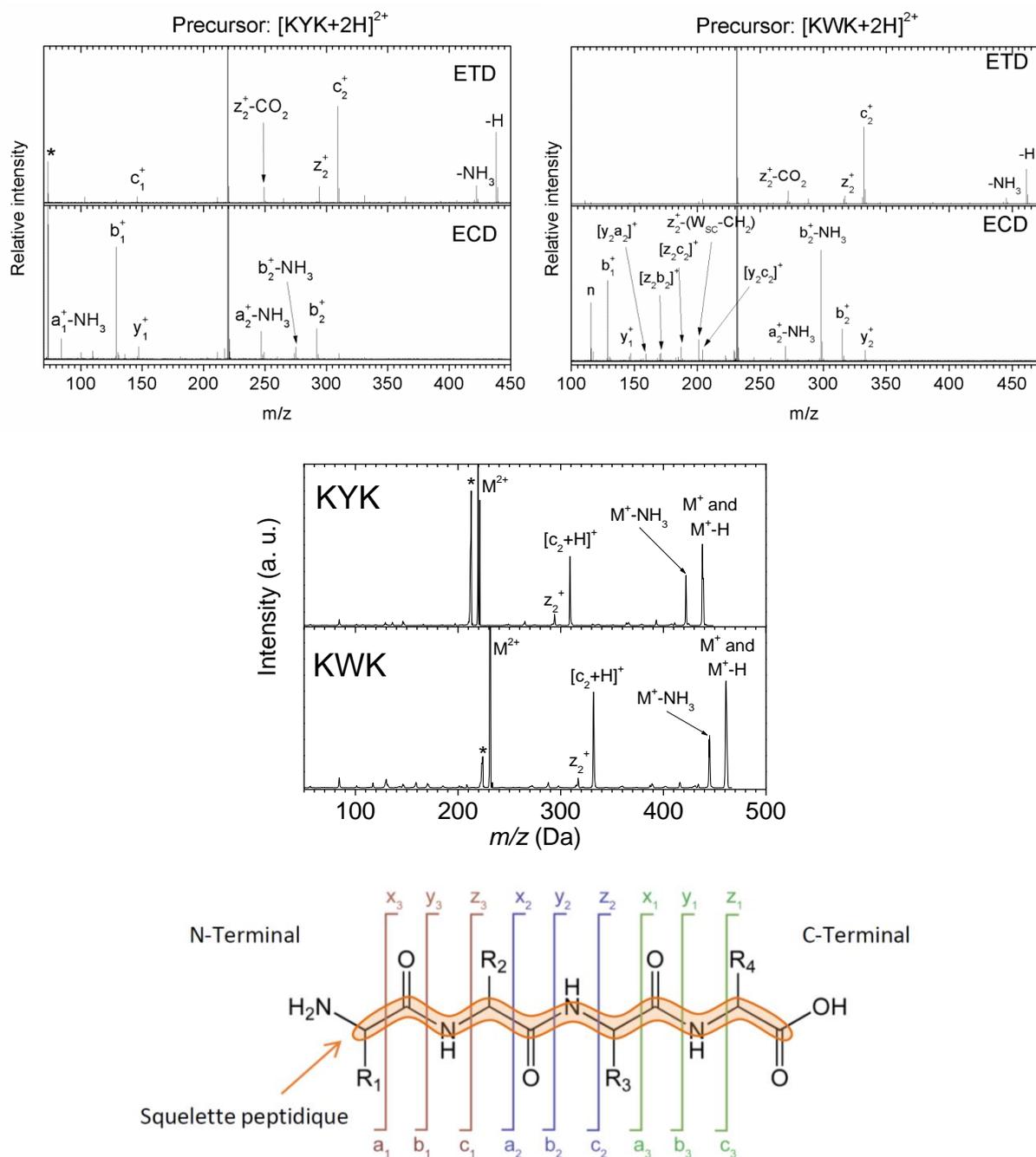


Figure 25 : spectres de masse des tripeptides isolés $[KYK+2H]^{2+}$ ($m/z = 219,640$) et $[KWK+2H]^{2+}$ ($m/z = 231,146$) obtenus au LCM après capture (ECD) et transfert (ETD) d'électron du fluoranthène (en haut), et à l'Université d'Århus après transfert d'électron du sodium (au milieu). La molécule intacte est notée M. Les astérisques indiquent des artefacts expérimentaux, et « n » indique un pic dû à une pollution. En bas, la nomenclature usuelle pour la notation des fragments peptidiques est indiquée. Les fragments a, b et c ont la charge du côté N-terminal, alors que les fragments x, y et z ont la charge du côté C-terminal.

Une conséquence inattendue de la liaison non-covalente avec le CE réside dans la formation et le détachement de groupements chargés non-observés dans le cas de peptides isolés. L'exemple le plus frappant est l'observation, dans les spectres de $[KYK+3H+CE]^{3+}$ après ECD et CID (cf. Figure 26), d'un pic à $m/z = 265,164$ attribué au CE protoné noté $[CE+H]^+$. Son fragment complémentaire après CID ($[KYK+2H]^{2+}$) est même l'ion le plus abondant, celui-ci pouvant également perdre NH_3 . La présence d'un pic à $m/z = 177,112$ correspondant à $[C_8H_{16}O_4+H]^+$ et attribué à un fragment de $[CE+H]^+$, et même de deux autres à $m/z = 133,086$ et $89,060$ ($[C_6H_{12}O_3+H]^+$ et $[C_4H_8O_2+H]^+$) dans le

spectre ECD, indique que le CE protoné contient assez d'énergie interne pour fragmenter et perdre successivement deux, trois et quatre groupements $(\text{CH}_2)_2\text{O}$. Ceci est corroboré par le spectre de CID de $[\text{CE}+\text{H}]^+$ visible sur la Figure 26, où les mêmes fragments sont visibles. Ceci implique que l'énergie vibrationnelle déposée dans le système après capture d'électron ou collision est effectivement redistribuée dans tout le système {peptide + CE}, réduisant ainsi la quantité d'énergie dans le peptide par rapport à la situation sans CE. Nous avons obtenu des résultats très similaires pour KWK. Afin de savoir si le CE est initialement protoné dans $[\text{KYK}+3\text{H}+\text{CE}]^{3+}$, ou s'il est neutre, nous avons mené les calculs suivants :

1. Dynamiques moléculaires par échange de répliques (REMD ; programme écrit par Florent Calvo de l'Université de Grenoble) pour explorer la surface d'énergie potentielle dans l'état électronique fondamental à l'aide du champ de force AMBER99, et ainsi trouver le conformère de plus basse énergie, pour chacun des sites de liaison du CE des systèmes suivants : $[\text{KYK}+3\text{H}]^{3+}(\text{CE})$ et $[\text{KYK}+2\text{H}]^{2+}[\text{CE}+\text{H}]^+$.²
2. Optimisation de géométrie avec la méthode DFT au niveau M06/6-31+G(d,p), puis calcul de l'énergie potentielle au niveau M06/6-311++G(2d,2p).

Nos résultats montrent que les conformères où le CE est protoné se situent au moins 100 kJ/mol en énergie potentielle au-dessus de celui où le CE est neutre et lié au N terminal ou à la chaîne latérale de la lysine de ce côté. Par conséquent, l'observation du CE protoné dans le spectre CID veut dire qu'un transfert de proton se produit du peptide vers le CE avant la séparation de $[\text{KYK}+2\text{H}]^{2+}$ et $[\text{CE}+\text{H}]^+$. Ce proton provient probablement du site de liaison du CE, puisque nous allons voir plus loin dans cette partie que le CE peut se déplacer avec un proton d'un site de liaison à l'autre sur les peptides. Dans le cas de l'ECD de $[\text{KYK}+3\text{H}+\text{CE}]^{3+}$, l'électron libre est probablement capturé sur un site chargé non lié au CE, à cause de l'énergie de recombinaison plus élevée, puis le même transfert de proton peut se produire du peptide vers le CE, formant cette fois $[\text{KYK}+2\text{H}]^+$ et $[\text{CE}+\text{H}]^+$. L'énergie d'excitation vibrationnelle est suffisante pour que ces deux molécules fragmentent par la suite.

² J'ai dû en fait réaliser la REMD sans les protons sur le peptide, sinon le système était instable et les deux molécules se séparaient avant la fin de la dynamique, sous l'effet de l'agitation thermique et de la répulsion coulombienne. Une fois les conformères de plus basse énergie trouvés, j'ai remis les protons sur les chaînes latérales des lysines avant que G. Frison ne fasse les calculs DFT.

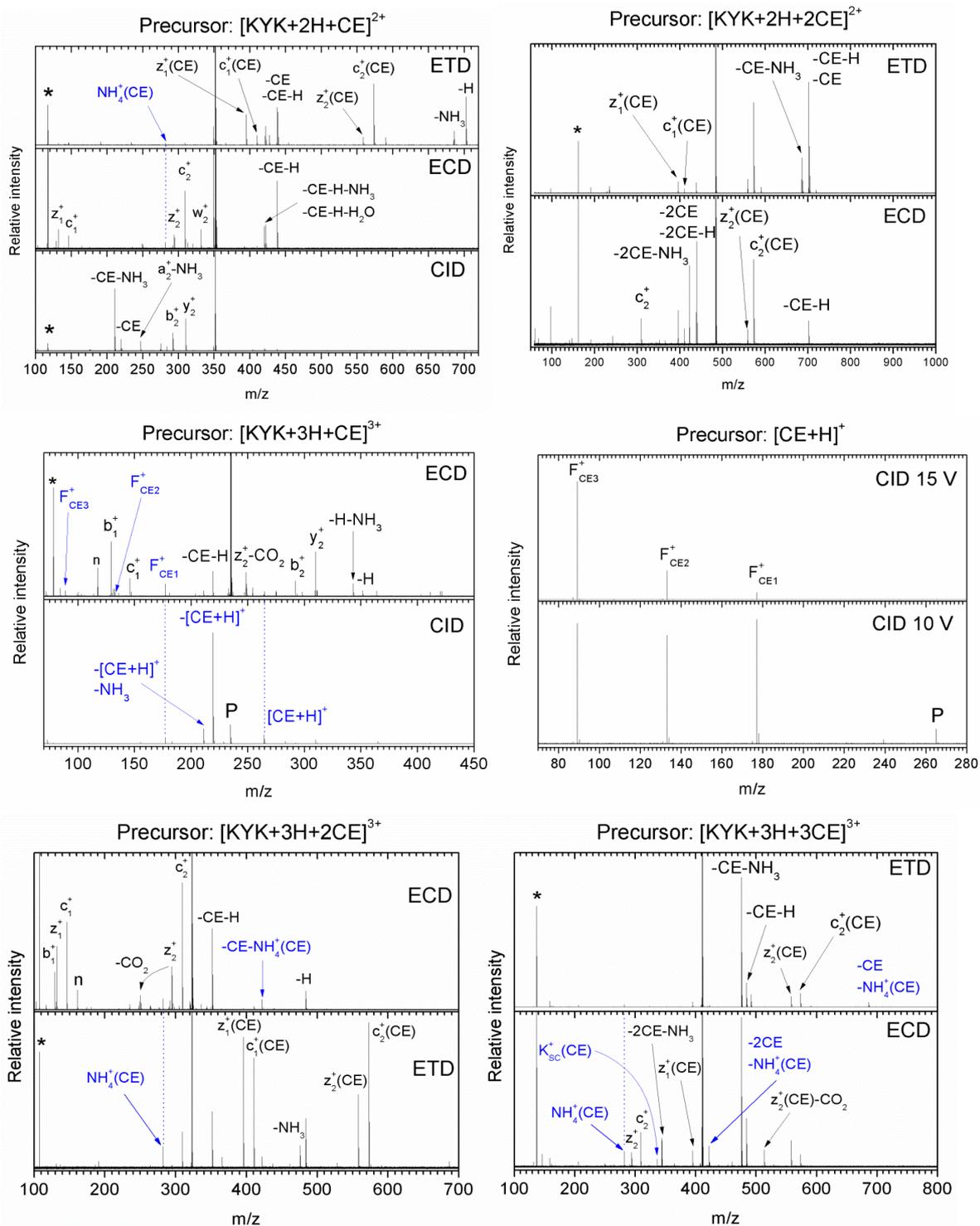


Figure 26 : spectres de masse des ions $[\text{KYK}+2\text{H}+\text{CE}]^{2+}$ ($m/z = 351,716$), $[\text{KYK}+2\text{H}+2\text{CE}]^{2+}$ ($m/z = 483,795$), $[\text{KYK}+3\text{H}+\text{CE}]^{3+}$ ($m/z = 234,814$), $[\text{CE}+\text{H}]^+$ ($m/z = 265,164$), $[\text{KYK}+3\text{H}+2\text{CE}]^{3+}$ ($m/z = 322,866$) et $[\text{KYK}+3\text{H}+3\text{CE}]^{3+}$ ($m/z = 410,918$) obtenus au LCM après capture (ECD) ou transfert (ETD) d'électron, ou après collision avec un gaz d'argon (CID). L'astérisque indique un artefact expérimental, et « n » indique un pic dû à une pollution. Les processus impliquant la formation d'un groupement chargé lié à un CE sont écrits en bleu.

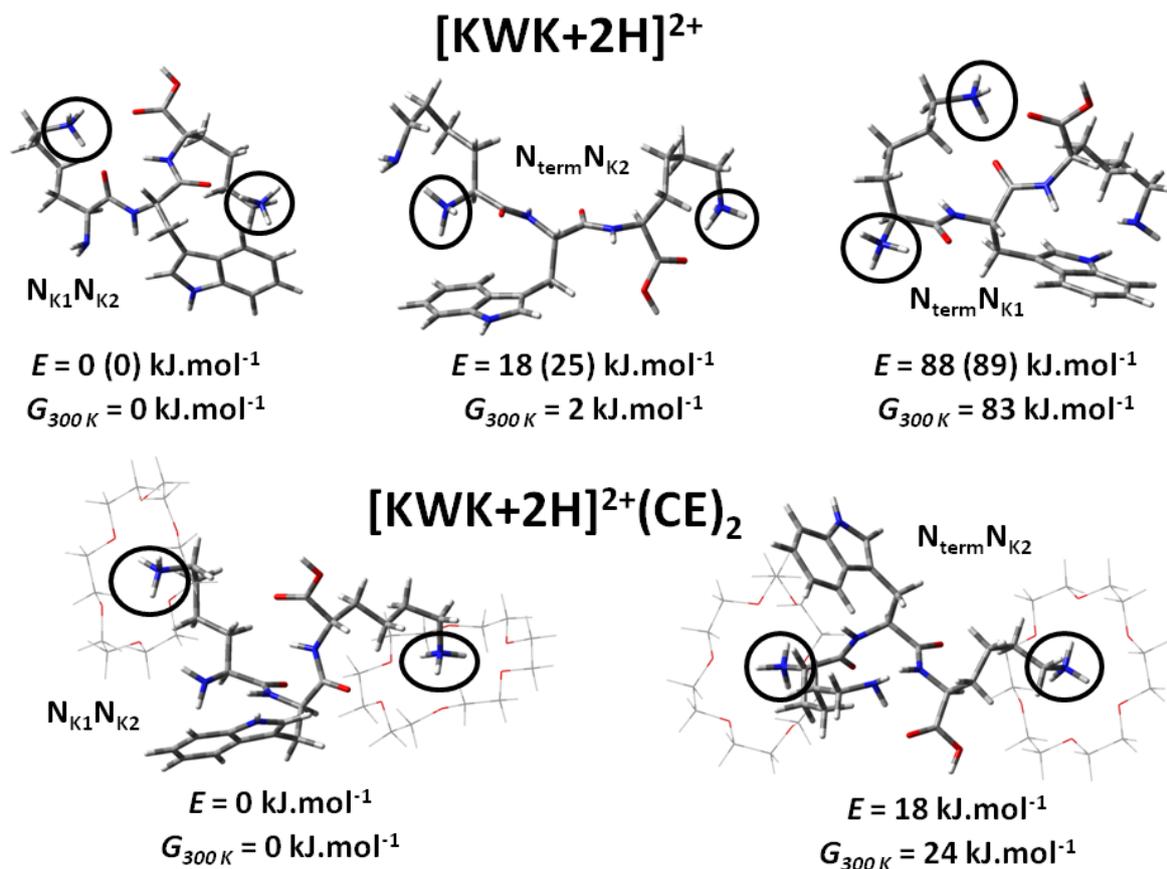


Figure 27 : structure des conformères de plus basse énergie issus d'une dynamique moléculaire de systèmes moléculaires impliquant le peptide KWK et le ligand CE, optimisée au niveau B3LYP/cc-pVDZ. Leurs énergies potentielle E et libre G au même niveau de calcul sont aussi indiquées, ainsi que l'énergie potentielle au niveau MP2/cc-pVDZ entre parenthèses. Les protons sont entourés en noir. Les atomes C, H, N et O sont en gris, blanc, bleu et rouge, respectivement. Le peptide est représenté par des tubes, et les CE par des lignes.

Après avoir montré que le CE peut arracher un proton à un peptide protoné après ECD ou CID, je vais décrire en détails le mécanisme de formation de molécules protonées induite par le CE. Par exemple, après ECD et ETD de $[\text{KYK}+2\text{H}+\text{CE}]^{2+}$, $[\text{KYK}+3\text{H}+2\text{CE}]^{3+}$ et $[\text{KYK}+3\text{H}+3\text{CE}]^{3+}$, on détecte dans le spectre de masse un pic attribué à $\text{NH}_4^+(\text{CE})$, ainsi que les fragments complémentaires dans le cas des deux derniers, ce qui est cohérent avec leur charge initiale 3+, qui devient 2+ après capture ou transfert d'électron. Nous avons proposé le mécanisme suivant pour expliquer la formation de $\text{NH}_4^+(\text{CE})$: l'électron est capturé ou transféré dans l'orbitale σ^* de la liaison C-N d'un groupement $\text{R}-\text{NH}_3^+(\text{CE})$, cette liaison se rompt, formant le complexe $\text{NH}_3(\text{CE})$, sur laquelle un proton est finalement transféré. Des calculs DFT ont prédit que l'état excité le plus bas du radical $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ (formé après capture d'électron par $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}_3^+$) est situé à seulement 1,35 eV au-dessus de l'état fondamental, possède une force d'oscillateur élevée et une barrière d'énergie potentielle très basse (0,6 eV) pour la rupture de la liaison C-N.¹¹⁵ De plus, celle du transfert de proton dans le peptide TIK (T est la thréonine et I l'isoleucine) doublement protoné est de 0,6-0,8 eV,¹¹⁶ ce qui est bien inférieur à l'énergie de recombinaison après ECD ou ETD (voir les paragraphes précédents). Pour préciser ce mécanisme, nous avons voulu connaître la structure géométrique des ions précurseurs et avons donc fait des mesures de section efficace de collision à l'ICP grâce à un spectromètre de mobilité ionique, puis nous les avons comparées à des simulations réalisées avec le logiciel IMOS.^{117,118} Dans ce spectromètre, les ions moléculaires sont accumulés dans un piège à ions où ils peuvent subir un transfert d'électron grâce à l'injection d'anions de dicyanobenzène. Ensuite, ils passent dans une cellule où ils sont

poussés vers la sortie par un champ électrique dû à des ondes progressives créées par des tensions faibles (typiquement 40 V) appliquées sur les électrodes successives de la cellule. Celle-ci est remplie d'azote gazeux à une pression de l'ordre de 1 mbar, les ions subissent donc des collisions qui induisent une force de frottement d'autant plus grande que leur section efficace de collision (CCS) est élevée. Par conséquent, leur vitesse dans la cellule diminue quand leur CCS augmente, et si l'on mesure la durée de dérive dans la cellule, on peut remonter à la CCS des ions, via une calibration réalisée pour chaque état de charge (1+, 2+ et 3+) à partir de mesures sur des polyalanines protonées sur une large gamme de masse. L'incertitude relative sur la CCS est alors généralement estimée à 2%.¹¹⁹ Nous pouvons voir des exemples de spectres de mobilité ionique dans la Figure 28. Afin d'obtenir des informations précises sur la géométrie des ions moléculaires, nous avons également réalisé des calculs. D'abord, j'ai exploré leur surface d'énergie potentielle afin de trouver le conformère de plus basse énergie, pour chacun des sites de protonation et de liaison des CE, grâce au programme REMD. Ensuite, Gilles Frison a calculé leur énergie potentielle au niveau DFT, et enfin, j'ai calculé leur CCS dans l'azote avec le logiciel IMOS. Ce dernier permet de simuler les trajectoires d'un grand nombre de molécules de N₂ lors de leur collision avec un ion moléculaire d'une structure donnée, et de calculer le transfert de quantité de mouvement puis d'en déduire la CCS. J'ai estimé la précision de cette méthode en calculant la CCS d'un ion moléculaire de structure rigide et connue : C₆₀⁺. Cela donne 214.3 Å², contre 213.1 Å² pour la mesure,¹²⁰ ce qui nous permet d'évaluer l'incertitude sur le calcul à 1% de la valeur mesurée. Tous les détails des montages expérimentaux et des simulations sont inclus dans notre article paru récemment.¹¹⁴ Les résultats sont visibles dans la Figure 29 et le Tableau 2. On peut constater que les conformères de [KYK+2H+CE]²⁺ et [KWK+2H+CE]²⁺ ayant les protons sur les N des chaînes latérales des lysines et le CE sur celle de la lysine du côté C terminal sont ceux qui ont l'énergie la plus basse, et leur CCS calculée est compatible avec l'expérience. Nous n'avons pas pris en compte les conformères ayant les deux protons sur le N terminal et la chaîne latérale de la lysine de ce côté, car j'avais calculé que dans le cas de [KWK+2H]²⁺, leur énergie potentielle est plus de 80 kJ/mol plus haute que le conformère de plus basse énergie (voir la Figure 27).¹¹⁰ Par conséquent, pour que NH₄⁺(CE) soit formé dans [KYK+2H+CE]²⁺ ou [KWK+2H+CE]²⁺, l'électron est probablement transféré sur la chaîne latérale de la lysine du côté C terminal, et le proton transféré viendrait alors de la chaîne latérale de l'autre lysine. En effet, bien qu'il puisse en principe venir du groupement CO₂H du peptide, plus proche du CE d'après la Figure 29, cela mènerait à un zwitterion, généralement instable en phase gazeuse en l'absence de pont salin.^{121,122} En ce qui concerne [KYK+3H+2CE]³⁺, nos calculs montrent que les CE se fixent sur les chaînes latérales des lysines, alors que pour [KWK+3H+2CE]³⁺, ils se trouvent principalement sur le N terminal et la chaîne latérale de la lysine du côté C terminal. Dans les deux cas, le proton non-lié se trouve proche du CE situé du côté N terminal, ce qui impliquerait que pour la formation de NH₄⁺(CE), les transferts d'électron et de proton se produisent de ce côté. Pour tester la validité de ces mécanismes, une possibilité serait d'utiliser des peptides modifiés avec un ou deux groupements R-N(CH₃)₃⁺ en laissant un seul R-NH₃⁺ du côté du C terminal, rendant alors le transfert de proton improbable.

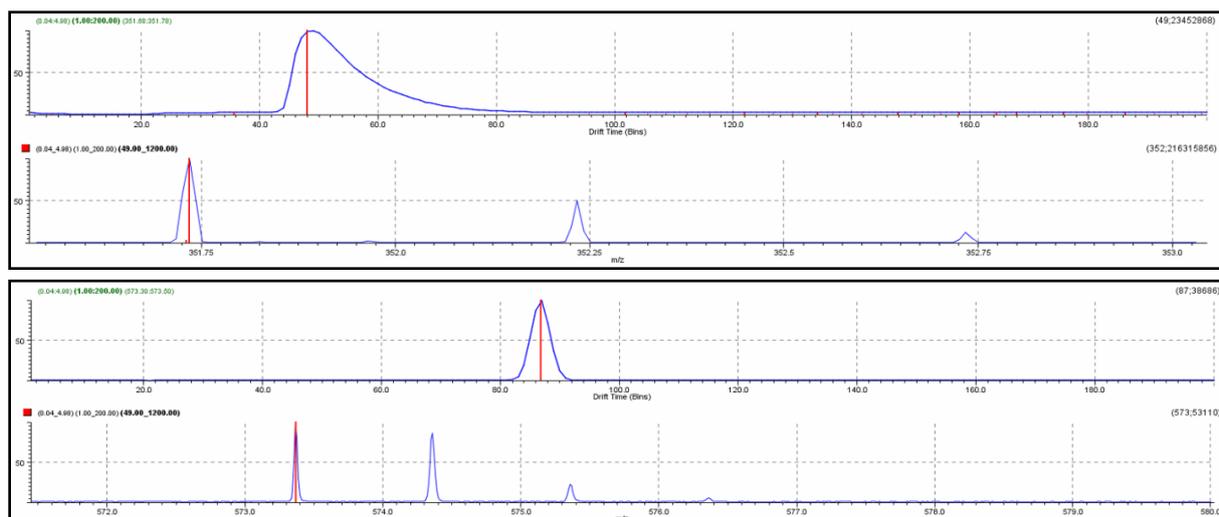


Figure 28 : spectres de mobilité ionique figurant l'intensité du signal en fonction de la durée de dérive dans la cellule de mobilité, pour $[KYK+2H+CE]^{2+}$ (en haut) et son fragments $c_2^+(CE)$ formé après transfert d'électron (en bas). La barre rouge correspond à la durée de dérive prise en compte pour le calcul de la CCS. Dans chaque cas, sous le spectre de mobilité apparaît aussi la partie du spectre de masse incluant le pic sélectionné (barre rouge) et correspondant à l'ion en question.

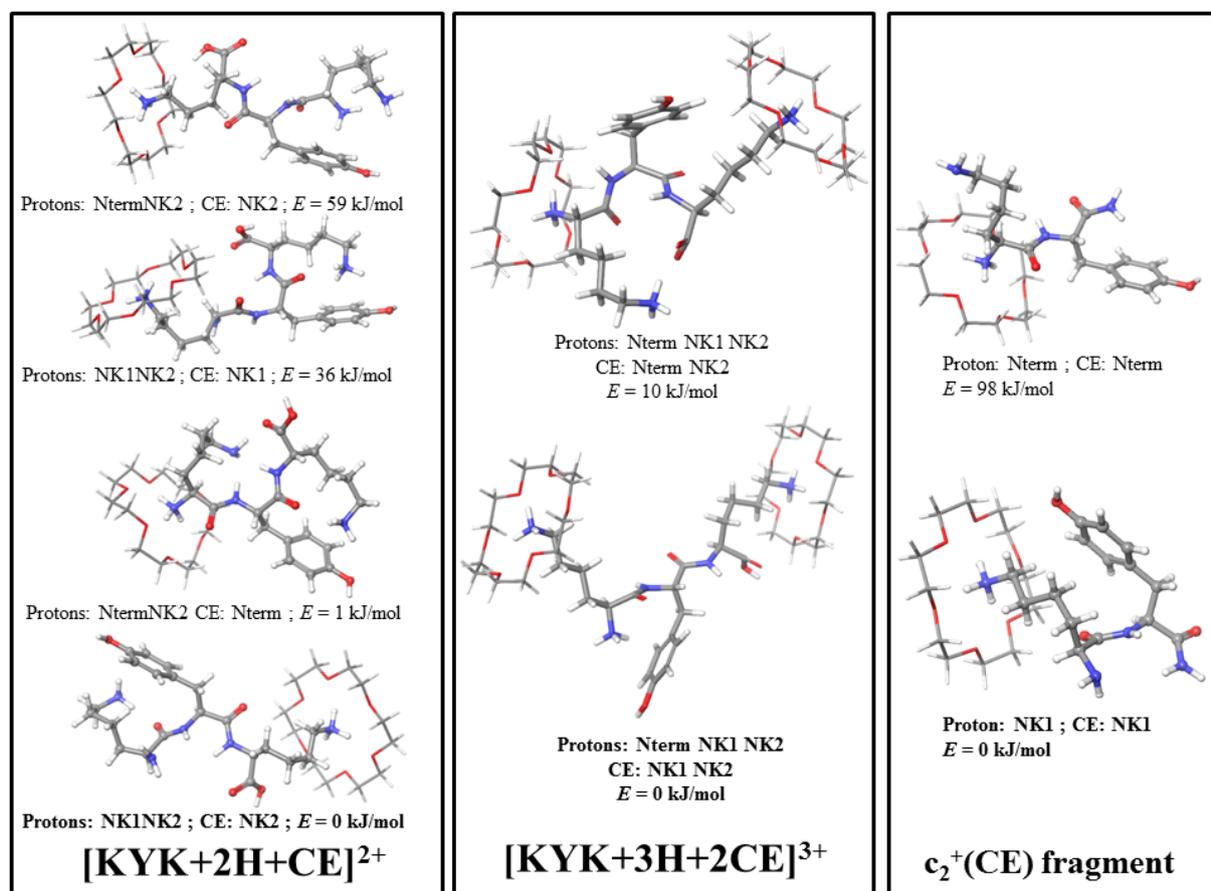


Figure 29 : structure et énergie potentielle (calculée au niveau DFT M06/6-311++G(2d,2p)) des conformères de plus basse énergie (issus de dynamiques moléculaires) de complexes impliquant le peptide KYK et le ligand CE. Nterm, NK1 and NK2 se réfèrent aux sites de protonation et de liaison des CE suivants : N terminal et N des chaînes latérales des lysines situées du côté du N du C terminal, respectivement. Les atomes C, H, N et O sont en gris, blanc, bleu et rouge, respectivement. Le peptide est représenté par des tubes, et les CE par des lignes.

Tableau 2 : Sections efficaces de collision (CCS) expérimentales et théoriques pour différents conformères de [KYK+2H+CE]²⁺, [KWK+2H+CE]²⁺ et leurs fragments c₂⁺(CE) respectifs ; énergie potentielle relative des différents conformères de [KYK+2H+CE]²⁺, [KWK+2H+CE]²⁺, [KYK+3H+2CE]³⁺, [KWK+3H+2CE]³⁺ et des fragments c₂⁺(CE) calculée à 0 K au niveau DFT (fonctionnelle M06, bases indiquées dans le tableau, géométries initiales issues d'une dynamique moléculaire réalisée avec AMBER99). Les conformères de plus basse énergie sont en gras.

Ion moléculaire	Sites de protonation ^[a]	Sites de liaison des CE	Énergie potentielle relative (kJ/mol)		CCS théorique ^[b] (Å ²)	CCS exp. ^[c] (Å ²)
			6-311++ G(2d,2p)	6-31+ G(d,p)		
[KYK+2H+CE] ²⁺	NK1 NK2	NK1 NK2	36	38	291 ± 3	315 ± 6
	Nterm NK2	Nterm NK2	1	2	301 ± 3	
		NK2	59	62	314 ± 3	
[KWK+2H+CE] ²⁺	NK1 NK2	NK1 NK2	23	24	311 ± 3	318 ± 6
	Nterm NK2	Nterm NK2	46	50	313 ± 3	
		NK2	45	47	321 ± 3	
[KYK+3H+2CE] ³⁺	Nterm NK1 NK2	NK1 NK2	0	0		
	Nterm NK1 NK2	Nterm NK2	10	6		
[KWK+3H+2CE] ³⁺	Nterm NK1 NK2	NK1 NK2	13	14		
	Nterm NK1 NK2	Nterm NK2	0	0		
Fragment c ₂ ⁺ (CE) de KYK	NK1	NK1	0	0	240 ± 3	236 ± 5
	Nterm	Nterm	98	104	246 ± 3	
Fragment c ₂ ⁺ (CE) de KWK	NK1	NK1	0	0	242 ± 3	241 ± 5
	Nterm	Nterm	19	22	244 ± 3	

[a] Nterm, NK1 and NK2 se réfèrent aux sites de protonation et de liaison des CE suivants : N terminal et N des chaînes latérales des lysines situées du côté du N du C terminal, respectivement (voir la Figure 29). [b] Calculs faits avec le logiciel IMOS. [c] Valeurs correspondant au maximum du pic observé dans le spectre de mobilité ionique.

Un autre phénomène inattendu et impliquant le CE dans les systèmes [KYK+2H+CE]²⁺ et [KWK+2H+CE]²⁺ après transfert d'électron est le changement du site de liaison du CE. En effet, si l'on observe le spectre de masse de [KYK+2H+CE]²⁺ après ETD (voir la Figure 26), on constate la présence des fragments dus à la rupture de l'une des liaisons N-C_α mais auxquels le CE est toujours attaché : z₁⁺(CE), c₁⁺(CE), z₂⁺(CE) et c₂⁺(CE). La même observation est valable pour [KWK+2H+CE]²⁺. Il peut paraître incohérent que les liaisons non-covalentes restent intactes alors qu'une liaison covalente est cassée, mais en réalité il faut comparer l'énergie de liaison de cette liaison (inférieur à 1 eV^{107,123}) à celle du CE dans le peptide, par exemple dans le modèle de la chaîne latérale de la lysine de la Figure 23 (2,3 eV d'après mes calculs). Il a notamment été montré que la rupture de la liaison N-C_α est provoquée par un transfert de H sur le C=O des groupements amides des peptides protonés.¹²⁴ la formation des ions z est facilement explicable par la rupture d'une liaison N-C_α sans évaporation du CE, puisque celui-ci est initialement lié à la chaîne latérale de la lysine du côté C terminal (voir le paragraphe précédent). Par contre, la présence des ions c₁⁺(CE) et c₂⁺(CE), avec même la prédominance de ce dernier sur z₂⁺(CE), implique un transfert de CE vers le côté N terminal avant fragmentation, ou en tout cas avant séparation des fragments. Ce type de mouvement du CE a été observé auparavant dans des polylysines protonées¹²⁵ et des dendrimères de polyaminopropylène amine,¹²⁶ grâce à des expériences d'échange H/D en phase gazeuse. Il a notamment été montré que le CE se déplace avec un proton d'un groupement R-NH₃⁺ à un groupement R-NH₂ adjacent. Nous

pouvons donc proposer les étapes suivantes pour former les ions $c_1^+(\text{CE})$ et $c_2^+(\text{CE})$ dans $[\text{KYK}+2\text{H}+\text{CE}]^{2+}$ et $[\text{KWK}+2\text{H}+\text{CE}]^{2+}$:

1. L'électron est transféré, directement ou après réarrangement électronique, sur le site chargé ayant la plus grande énergie de recombinaison, c'est-à-dire le groupement R-NH_3^+ de la chaîne latérale de la lysine du côté N terminal, non-lié au CE,
2. Un H du groupement R-NH_3 réduit hypervalent est transféré au C=O d'un des groupements amides (voir la Figure 29), ce qui forme un groupement R-NH_2 ,
3. Le CE et le proton sont transférés du côté C terminal vers le N terminal.

La rupture de la liaison N-C_α intervient avant ou après l'étape 3. On peut noter qu'après l'étape 2, il y a deux groupements R-NH_2 du côté N terminal du peptide : sur la chaîne latérale de la lysine et sur le N terminal (voir la Figure 28). Nous pouvons savoir sur lequel le CE est transféré grâce à nos résultats de mobilité ionique (voir le Tableau 2) : pour le fragment $c_2^+(\text{CE})$, la CCS calculée du conformère NK1 ayant le CE sur la chaîne latérale de la lysine est compatible avec la valeur expérimentale, contrairement au conformère Nterm, dont le CE est sur le N-terminal. De plus, NK1 est le plus bas en énergie et l'énergie de Nterm est très supérieure (1 eV pour $[\text{KYK}+2\text{H}+\text{CE}]^{2+}$). Par conséquent, le CE est sur la chaîne latérale de la lysine du fragment $c_2^+(\text{CE})$, alors qu'avant transfert d'électron le CE est lié à la chaîne latérale de la lysine du côté C terminal, nous pouvons en conclure que le CE est transféré d'une chaîne latérale de lysine à l'autre, et peut donc « sauter » par-dessus la tyrosine ou le tryptophane, ce qui constitue un résultat inédit. Il serait intéressant de réitérer l'expérience avec d'autres peptides dont le nombre d'acides aminés séparant les deux lysines est incrémenté, pour savoir sur quelle distance le transfert de CE peut se produire. On pourrait également tester l'influence de la nature de l'acide aminé sur ce processus. La synthèse de ces petits peptides est facile et ne constitue pas un obstacle à ces études.

Dans ce chapitre, nous venons de voir que l'environnement d'une biomolécule, s'il est constitué de molécules différentes du solvant, induit des processus inédits, notamment le transfert de proton le long d'une liaison H, et de nouvelles voies de fragmentation de la molécule protonée ainsi créée, après redistribution de l'énergie d'excitation dans les degrés de liberté vibrationnels du système entier. De plus, dans le cas d'un ligand se liant spécifiquement à des groupements NH_3^+ , nous avons vu que de nouvelles voies de fragmentation s'ouvrent, menant à l'abstraction de molécules protonées après capture ou transfert d'électron. Enfin, ce ligand peut également changer de site de liaison dans la molécule.

Chapitre 5 : Augmentation de la taille du système et de la pertinence biologique

Dans les chapitres précédents, j'ai exposé des travaux dédiés à la compréhension des phénomènes intrinsèques radio-induits dans des systèmes d'intérêt biologique relativement petits, et à la prise en compte de leur environnement moléculaire comme une tentative de se rapprocher de la situation existant dans les tissus biologiques. Dans ce chapitre, nous allons voir un exemple d'étude concernant des systèmes plus gros et plus pertinents biologiquement : des modèles peptidiques du collagène, la protéine la plus abondante dans les mammifères, dont la structure en triple hélice possède des propriétés remarquables. Nos travaux sur le collagène ainsi que d'autres ont été exposés et mis en perspective dans une revue que j'ai écrite suite à l'invitation d'un éditeur du journal ChemBioChem.¹²⁷

I) Étude structurale de modèles peptidiques du collagène isolés

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de radiobiologie du laboratoire, nous étudions les phénomènes provoqués par l'irradiation de la matrice extracellulaire du cartilage lors d'une radio- ou une hadronthérapie. Cette matrice est constituée d'un réseau dense et hautement organisé de collagène spécifique et d'aggrécans (glycoprotéines, mucopolysaccharides et protéoglycanes) qui représente plus de 95 % du tissu. Cette structure permet d'assurer l'élasticité et la robustesse du cartilage. Le collagène, principal constituant de cette matrice, est une famille de protéines dont la nature fibreuse trouve son origine dans leurs structures tertiaire (la triple hélice) et quaternaire (l'association de triples hélices ou fibrilles), comme le montre la Figure 30. Ces fibres sont même visibles dans certains tissus comme les tendons, ce qui a piqué la curiosité des scientifiques et mené aux premières expériences de diffraction des rayons X dès 1938.¹²⁸ Dans la Figure 31, on voit le résultat d'une expérience plus récente, dont la résolution est suffisante pour bien distinguer les triples hélices dans une fibrille, et ainsi constater que chacune d'elles forme un long brin. On peut même visualiser comment la triple hélice est structurée : chacune des trois protéines est enroulée et serrée autour des deux autres, un peu à la manière d'une tresse. On comprend alors la résistance des fibres de collagène à l'élongation. De nombreuses études ont par ailleurs établi les caractéristiques propres au collagène qui rendent possible cette structure en triple hélice : d'abord, la proportion de l'acide aminé proline est particulièrement élevée (environ 20%), ce qui contraint la structure secondaire de chacune des trois protéines à se rapprocher de la polyproline II, rigidifiant ainsi la triple hélice. Ensuite, la séquence du collagène comporte une glycine tous les trois acides aminés, ce qui permet de diminuer l'encombrement stérique et d'augmenter la flexibilité de la protéine. Les mutations menant au remplacement de cette glycine par un autre acide aminé provoquent des maladies telles que *osteogenesis imperfecta* (maladie des os de verre).¹²⁹ Grâce à ces caractéristiques, un réseau de liaisons H fortes appelé « Rich et Crick II »¹³⁰ existe entre les groupements amides des squelettes des trois protéines, ce qui explique l'énergie de liaison élevée et donc la grande stabilité de la triple hélice. Ces liaisons ne sont pas visibles sur la Figure 31, car la résolution (5-10 Å) n'est pas suffisante, mais pour l'augmenter, il faudrait faire la diffraction des rayons X sur un cristal... Or le collagène est très difficile à cristalliser, une solution consiste alors à étudier des systèmes plus petits que la protéine entière, qui contient de 100 à 1000 acides aminés selon le type de collagène, de tissu, d'organisme... En particulier, de nombreux travaux ont concerné des peptides modèles du collagène : ils ont été cristallisés avec succès, adoptent une structure en triple hélice, et leur séquence peut être choisie grâce à la synthèse en laboratoire. Ceci a permis de nombreuses avancées dans la compréhension de la structure et de la stabilité du collagène, et notamment du rôle des mutations.

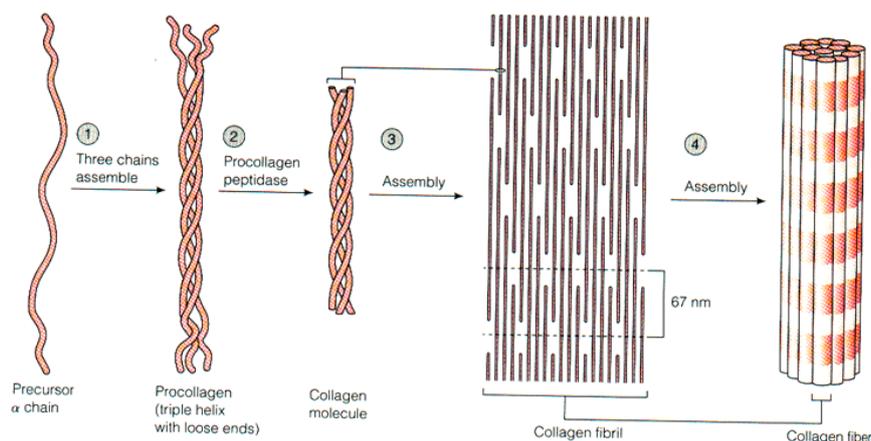


Figure 30 : une fibre de collagène est composée de multiples fibrilles, elles-mêmes formées de l'assemblage de triples hélices (image tirée du site <http://www.mun.ca>).

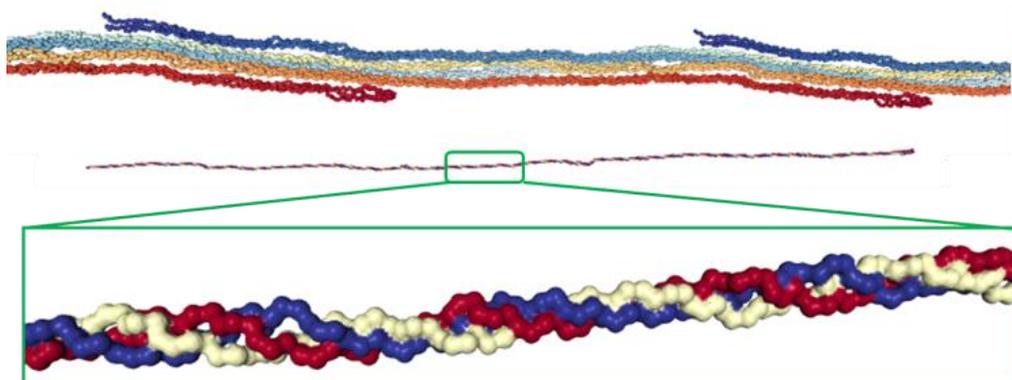


Figure 31 : structure du collagène obtenue par une expérience de diffraction des rayons X sur un tendon de *Rattus Norvegicus*, et issue de la base de données « Protein Data Bank » (PDB 3HQV).¹³¹ En haut, une fibrille composée de plusieurs triples hélices, chacune colorée d'un bout à l'autre comme un arc-en-ciel. Au milieu, une seule triple hélice est montrée, et une partie est agrandie en-dessous, où l'on voit chaque protéine dans une couleur différente.

Le plus simple des peptides modèles du collagène est sans doute $(PPG)_{10}$ (P est la proline et G la glycine) : sa structure en solution et dans un cristal est une triple hélice, et les expériences de diffraction par rayons X ont même révélé que le cristal est composé de dimères de triples hélices (voir la Figure 32). Il n'existe pas de liaisons H entre les deux triples hélices de ce dimère, puisque ni la proline ni la glycine n'ont de groupements donneur ou accepteur sur leur chaîne latérale. La température de fusion de $(PPG)_{10}$ et son enthalpie de dénaturation ont été mesurées à $T_m = 24.5^\circ\text{C}$ et $\Delta H^0 = 150 - 180 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, respectivement, par Persikov et co.¹³² Dans la même étude, les auteurs ont montré que $(POG)_{10}$, un autre peptide communément étudié, est encore plus stable que $(PPG)_{10}$ puisque $T_m = 56.9^\circ\text{C}$ et $\Delta H^0 = 370 - 390 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. O est l'hydroxyproline, un acide aminé résultant d'une modification post-traductionnelle de la proline, une modification abondante dans le collagène, ce qui est cohérent avec la stabilisation observée. Celle-ci n'est pas due à des liaisons H supplémentaires entre groupements hydroxyles des chaînes latérales des hydroxyprolines, puisqu'elles sont absentes des structures cristallographiques. Par contre, un réseau de liaisons H impliquant ces hydroxyles et des molécules d'eau est observé, comme dans les fibrilles de collagène.¹³³ Les résultats d'autres études vont dans le sens d'un effet stéréoelectronique intra-peptide indépendant de l'eau (voir les revues de Bella¹³⁴ et Raines¹³⁵), mais ces études portaient sur des systèmes en phase condensée, dans lesquels l'influence de l'environnement ne peut être totalement exclu. J'ai donc pensé que des études en phase gazeuse, qui n'avaient jamais été réalisées, permettraient de tirer des conclusions

définitives vis-à-vis du rôle du solvant dans la stabilisation de la triple hélice du collagène par l'hydroxyproline.

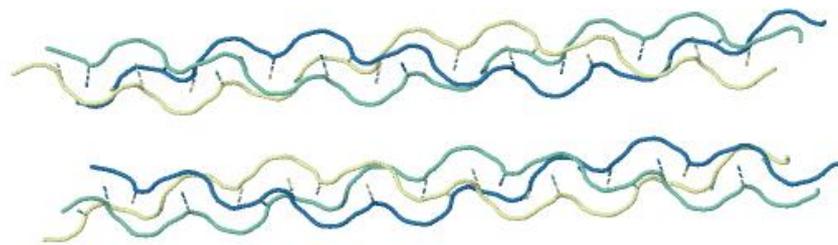


Figure 32 : structure cristallographique du peptide (PPG)₁₀ (PDB 1K6F).¹³⁶ Chacun des squelettes des trois peptides au sein d'une triple hélice est représenté par un brin d'une couleur différente, et les liaisons H entre peptides sont représentées par des pointillés.

Le groupe de P. Dugourd, de l'Institut Lumière Matière de l'Université Lyon 1, travaille depuis de nombreuses années sur la structure et la stabilité de systèmes biomoléculaires en phase gazeuse par spectrométries de masse et de mobilité ionique, et j'avais collaboré avec eux pendant ma thèse, principalement sur les complexes non-covalents vancomycine-récepteur modèles de la reconnaissance moléculaire (dont je reparlerai brièvement à la fin de ce chapitre) ainsi que sur la protéine amyloïde β impliquée dans la maladie d'Alzheimer.^{137,138} Dans le cadre de la thèse de M. Lalande¹³⁹ ainsi que du GDR EMIE du CNRS, nous sommes allés à Lyon faire des expériences avec F. Chirot, M. Bouakil et C. Comby-Zerbino sur les peptides (PPG)₁₀ et (POG)₁₀. Ceux-ci sont disponibles sous forme de poudre et sont déjà structurés en triple hélice. Étant donné que la source est de type électrospray, nous les avons dissous à une concentration était d'environ 50 $\mu\text{mol/L}$ dans une solution classique d'eau et de méthanol (50/50% en volume) avec 1% d'acide acétique pour protoner les molécules, et nous avons utilisé le montage de mobilité ionique en tandem récemment développé par le groupe et visible dans la Figure 33.¹⁴⁰ Une originalité du montage concerne le capillaire qui suit la source ESI : il n'est pas dans l'axe des éléments suivants, ce qui permet à un faisceau laser d'être injecté selon cet axe afin d'irradier les ions et induire par exemple leur fragmentation ou un changement de conformation. Les deux phénomènes peuvent être détectés grâce à un spectromètre de masse commercial (Maxis Impact Q-TOF, Bruker) à temps de vol de type réflectron, et à un spectromètre de mobilité ionique en tandem composé de deux tubes de mobilité. Nous n'avons cependant pas utilisé le laser.

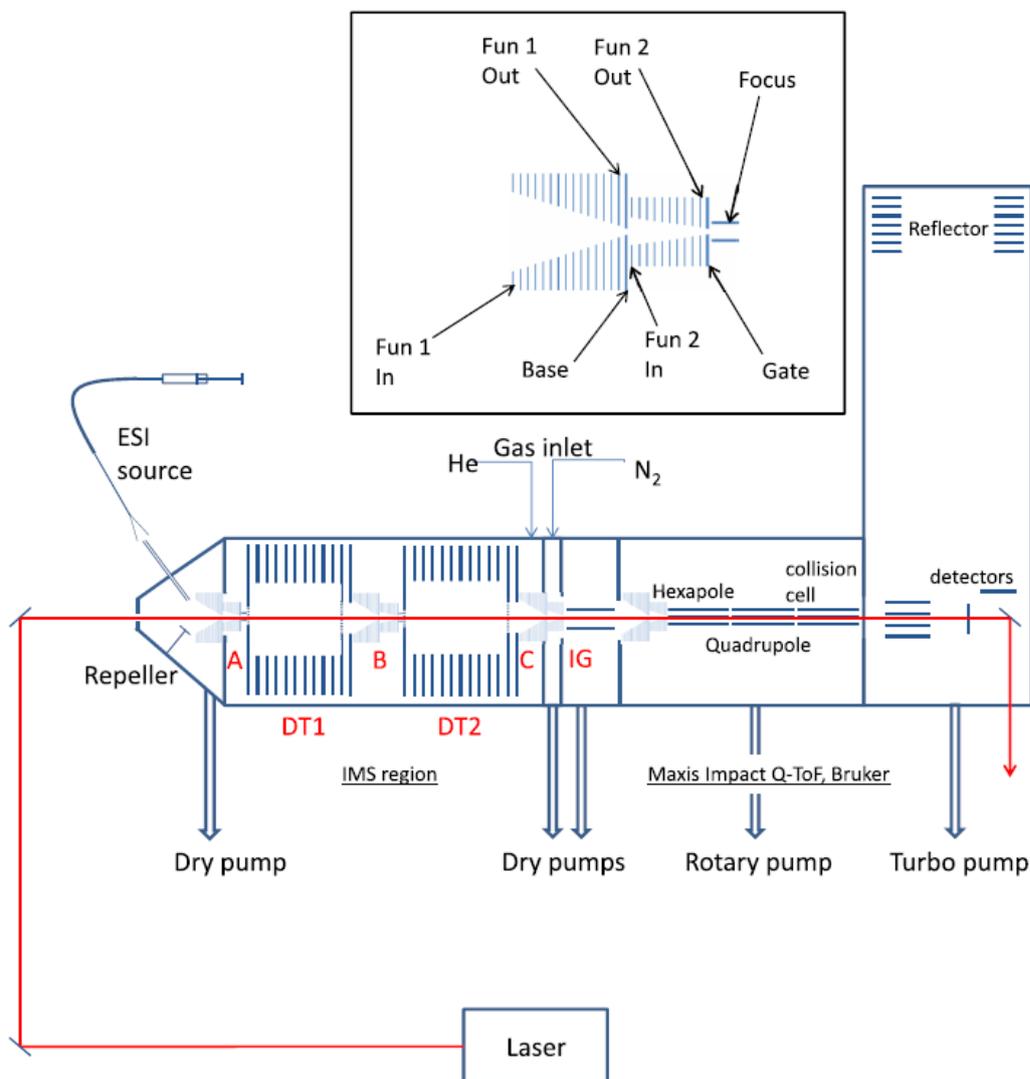


Figure 33 : schéma du montage expérimental du groupe de P. Dugourd à l'ILM de Lyon. La source électrospray est notée ESI, chacun des trois doubles funnels notés A, B et C suit le dessin du cadre du haut, les deux tubes de mobilité sont notés DT1 et DT2, IG est un guide d'ions et Maxis est un spectromètre de masse commercial (Bruker). Le trajet du laser (que nous n'avons pas utilisé) est indiqué par une ligne rouge.

Le mode que nous avons d'abord choisi, afin de savoir quels ions étaient produits par la source, est celui où les tubes de mobilité sont utilisés comme de simples guides d'ions et où le spectromètre de masse TOF enregistre l'intensité des ions en fonction de leur temps de vol, à une fréquence d'extraction de 20 kHz et une résolution en masse de l'ordre de $\frac{m}{\Delta m} = 40000$. Le spectre de masse obtenu pour $(PPG)_{10}$ est visible dans la Figure 34 (celui de $(POG)_{10}$ est très similaire) : on observe majoritairement des pics attribués à différents états de charge des trimères et hexamères du peptide, mais pas d'agrégats de taille intermédiaire, ce qui est cohérent avec une préexistence de ces espèces dans la poudre et en solution,¹⁴¹ et non avec un processus d'agrégation en solution ou en phase gazeuse. La détection de l'hexamère de $(PPG)_{10}$ est surprenante, car elle contredit une étude qui avait conclu à l'impossibilité de leur existence en solution.¹⁴² En revanche, à partir du spectre de masse seul, on ne peut pas être certain de la structure en triple hélice des trimères et en double triple hélice des hexamères, nous avons donc ensuite utilisé le tube de mobilité DT2 pour enregistrer un spectre de mobilité des ions injectés à un instant donné dans le tube après avoir été piégés dans le funnel B (voir la Figure 33), sous la forme d'une distribution de temps d'arrivée sur le détecteur du spectromètre de

masse. Dans ce tube de mobilité, les ions subissent une force due à un champ électrique faible (de l'ordre de 100 V/m) qui les pousse vers la sortie du tube, et une force de frottement due aux collisions avec le gaz résiduel présent dans le tube ($P \approx 10$ mbar). Cette dernière augmente avec la section efficace de collision (CCS, notée Ω) de l'ion avec le gaz, celle-ci étant liée à la structure géométrique et l'état de charge de l'ion. La vitesse de dérive v de l'ion dans le tube est alors :

$$v = KE$$

avec K la mobilité de l'ion et E la norme du champ électrique. Si l'on mesure la durée Δt nécessaire à l'ion pour parcourir le tube de longueur L pour différentes valeurs de E , on peut en déduire sa vitesse $v = \frac{\Delta t}{L}$, puis $K = \frac{v}{E}$. La relation entre la mobilité et la section efficace de collision est donnée par l'équation de Mason-Schamp :

$$K = \frac{3}{16} \frac{q}{N} \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{M} \right)^{0,5} \left(\frac{2\pi}{kT} \right)^{0,5} \frac{1}{\Omega}$$

où q et M sont la charge et la masse de l'ion, m celle du gaz et N sa densité, T la température et k la constante de Boltzmann. On peut donc obtenir la CCS d'un ion dans un gaz donné en mesurant K , et nous avons utilisé de l'hélium. Grâce au système d'acquisition, on peut sélectionner le spectre de mobilité d'une partie du spectre de masse (par exemple un seul pic correspondant au rapport m/z d'un ion), mais aussi le spectre de masse d'une partie du spectre de mobilité. La première option a permis de construire les spectres de mobilité de certains agrégats de $(PPG)_{10}$ et $(POG)_{10}$ qui sont visibles dans la Figure 35. Pour les trimères $[((PPG)_{10})_3+7H]^{7+}$ et $[((POG)_{10})_3+7H]^{7+}$, on observe un seul pic très fin dont la largeur est due uniquement à la diffusion des ions dans le tube de mobilité : c'est la signature d'une seule conformation rigide présente en phase gazeuse. Lorsque l'état de charge des trimères diminue, la largeur du pic augmente, ce qui veut dire que la structure est moins rigide et que plusieurs conformations voisines appartenant à une même famille structurale coexistent. C'est également le cas des pics attribués aux différents états de charge de l'hexamère du peptide $(PPG)_{10}$ (cf. Figure 35), même le plus haut, ce qui est le signe d'une structure moins rigide que celle du trimère. Notons que seul le spectre du pic à $m/z = 2170$, attribué sans ambiguïté à l'hexamère $[((PPG)_{10})_6+7H]^{7+}$, possède un seul pic, les autres spectres contenant aussi des pics à un temps d'arrivée plus grand, correspondant à d'autres agrégats dont le rapport m/z est identique : par exemple le dimère $[((PPG)_{10})_2+3H]^{3+}$ est visible dans le spectre de $[((PPG)_{10})_6+9H]^{9+}$. Le même phénomène donne naissance à un pic attribué au monomère $[((PPG)_{10})+2H]^{2+}$ dans le spectre du trimère $[((PPG)_{10})_3+6H]^{6+}$. Les valeurs expérimentales des CCS de trimères et hexamères des peptides sont rassemblées dans le Tableau 3. On peut constater que la CCS augmente avec l'état de charge, pour tous les agrégats considérés, ce qui, pour les peptides et protéines protonés, s'explique généralement par le dépliement de la structure native à cause de la répulsion coulombienne entre les protons.¹⁴³⁻¹⁴⁶ Ici, nous allons voir que la situation est différente. Les valeurs de CCS des trimères se situent dans la même gamme que celles de l'ubiquitine, une petite protéine contenant 76 acides aminés, et celles des trimères 6+ et 7+ sont proches des conformères dépliés de l'ubiquitine, ce qui permet a priori d'exclure une structure compacte. Afin d'avoir des informations plus précises sur la structure de ces trimères et hexamères, j'ai calculé, à l'aide du logiciel Impact,¹⁴⁷ la CCS théorique correspondant aux structures cristallines présentes dans la base de données PDB (Protein Data Bank), c'est-à-dire des triples hélices pour les trimères et deux triples hélices disposées comme dans la Figure 32 pour l'hexamère de $(PPG)_{10}$ (le signal n'était pas suffisant pour mesurer la CCS des hexamères de $(POG)_{10}$). Il est important de préciser que les calculs sont réalisés sur la molécule neutre, uniquement à partir des coordonnées des atomes, aucune charge ne leur étant attribuée. Ici, j'ai fait l'hypothèse que les valeurs de CCS sont

majoritairement déterminées par la structure et non par l'interaction charge-dipôle induit entre la molécule et l'hélium, ce qui est raisonnable au vu de la faible polarisabilité de cet atome. Cette hypothèse est confortée par les mesures du groupe de M. Bush sur des protéines : par exemple, la structure native de l'ubiquitine dans les états de charge 4+, 5+ et 6+ possède une section efficace de collision avec l'hélium de 972, 983 et 1000 Å².¹⁴⁸ En ce qui concerne les peptides de collagène, nos valeurs de CCS calculées (cf. Tableau 3) sont identiques à celles de l'expérience ou très proches pour les ions $[(PPG)_{10}]_3+7H)^{7+}$, $[(POG)_{10}]_3+7H)^{7+}$ et $[(PPG)_{10}]_6+9H)^{9+}$, ce qui suggère fortement que ces ions conservent leur structure après la mise en phase gazeuse. Il s'agit des agrégats les plus chargés, et le fait que les états de charge plus bas possèdent une CCS plus petite peut s'expliquer par une structure plus compacte causée par la baisse de la répulsion coulombienne entre protons. La situation est donc différente de celle qui existe généralement pour les peptides et protéines, qui perdent leur structure native en phase gazeuse lorsque l'état de charge est trop élevé : ici, c'est l'inverse, au moins sept protons dans le trimère et neuf protons dans l'hexamère sont nécessaires pour que les triples hélices survivent en phase gazeuse et ne se replient pas sur elles-mêmes. En solution, à pH = 7, ces sept protons ne sont pas présents, la structure native en triple hélice de ces peptides existe donc grâce à l'eau.

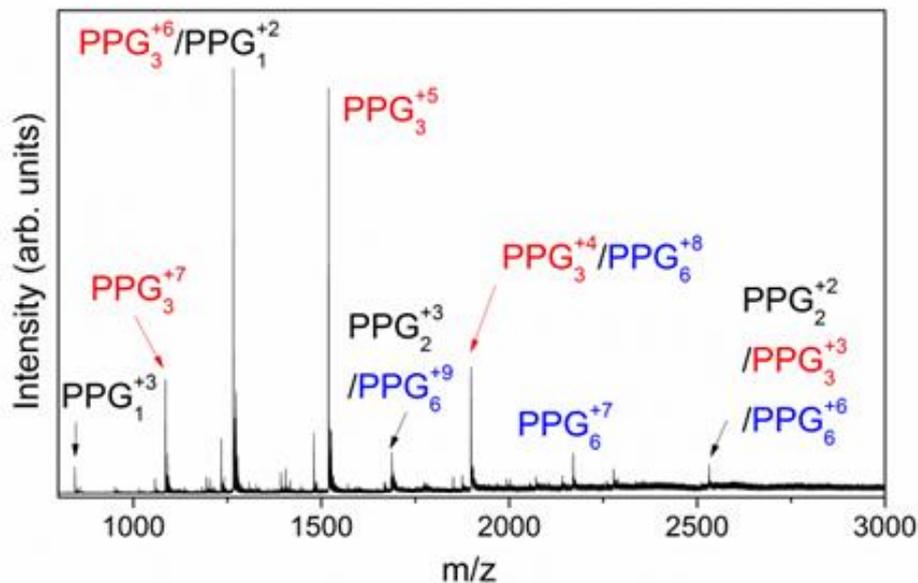


Figure 34 : spectre de masse des agrégats ioniques produits par une source électrospray à partir d'une solution du peptide (PPG)₁₀ (abrégé en PPG ci-dessus pour plus de clarté). Le nombre de peptides dans l'agrégat est indiqué en indice, la charge en exposant.

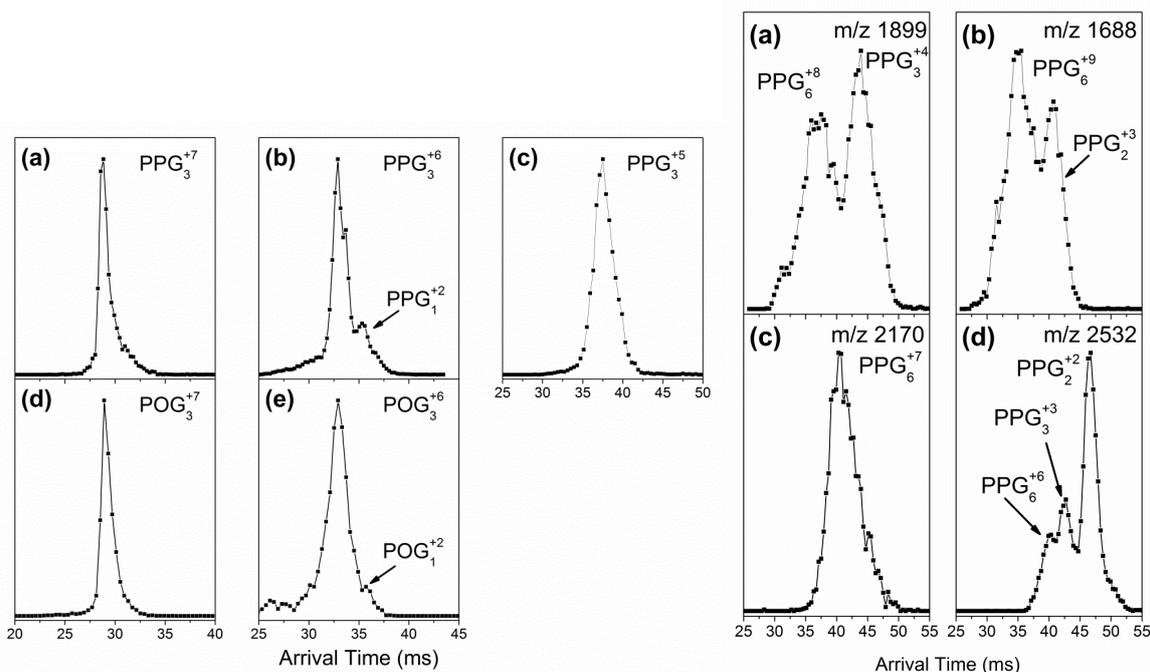


Figure 35 : spectres de mobilité ionique des agrégats des peptides $(PPG)_{10}$ et $(POG)_{10}$ pour différents états de charge du trimère (à gauche) de $(PPG)_{10}$ (a à c) et de $(POG)_{10}$ (d et e), ainsi que de l'hexamère de $(PPG)_{10}$ (à droite). Les peptides sont abrégés en PPG et POG ci-dessus pour plus de clarté. Le nombre de peptides dans l'agrégat est indiqué en indice, la charge en exposant.

Tableau 3 : valeurs expérimentales et théoriques de la section efficace de collision (CCS) entre les trimères et hexamères des peptides $(PPG)_{10}$ et $(POG)_{10}$ et l'hélium.

	Trimères		Hexamères	
	État de charge	CCS (\AA^2)	État de charge	CCS (\AA^2)
$(PPG)_{10}$ (mesurées)	+3	892±30	+6	1570±50
	+4	971±30	+7	1866±56
	+5	1190±36	+8	1965±60
	+6	1270±38	+9	2300±70
	+7	1295±39		
$(PPG)_{10}$ (PDB 1K6F; calculées avec Impact ¹⁴⁷)	0	1330±13	0	2236±22
$(POG)_{10}$ (mesurées)	+6	1250±38		
	+7	1303±40		
$(POG)_{10}$ (PDB 1CGD; calculées avec Impact ¹⁴⁷)	0	1383±14		

Afin de tester la stabilité des trimères et hexamères des peptides $(PPG)_{10}$ et $(POG)_{10}$, nous avons mené des expériences d'activation au moyen de collisions à basse énergie avec de l'azote dans une cellule située après le quadripôle (cf. Figure 33), ce dernier permettant de sélectionner les ions selon leur rapport m/z dans la gamme 20 – 3000. Un spectre de masse obtenu pour l'hexamère $[(PPG)_{10}]_6+9H)^{9+}$ est visible dans la Figure 36. À cette énergie de collision (15 V/z), on observe très majoritairement des pics dus aux trimères 4+ et 5+, que l'on s'attend à trouver dans l'hexamère 9+. En effet, sa structure est celle d'un dimère de triples hélices, comme dans la Figure 32, et comme les triples hélices sont

identiques, à l'équilibre thermodynamique on s'attend à une distribution de protons symétrique. Comme il n'y a pas de liaison H entre les deux triples hélices, il est logique que celles-ci se séparent après collision, ce résultat confirme donc la structure de la Figure 32. Par conséquent, il semble que l'agrégation de triples hélices soit possible sans hydroxyproline, contrairement à ce qui avait été avancé précédemment.¹⁴⁹ Mais alors, comment les deux triples hélices sont-elles liées ? Pour le comprendre, il faut se rappeler que les hélices formées par des peptides ou des protéines possèdent un fort moment dipolaire permanent : par exemple, celui de l'hélice α est de l'ordre de 3,45 D par liaison peptidique, ce qui donnerait de l'ordre de 100 D pour 30 acides aminés (comme dans $(PPG)_{10}$), puisque les dipôles sont orientés dans les mêmes direction et sens. J'ai calculé avec le logiciel Gaussian09¹⁵⁰ et la méthode semi-empirique AM1 le moment dipolaire de la triple hélice de $((PPG)_{10})_3$, et ai trouvé une valeur d'environ 65 D, ce qui est du même ordre de grandeur que l'estimation pour l'hélice α . Si l'on extrapole à une triple hélice de 1000 acides aminés de longueur (typique du collagène), cela donne $6,5 \cdot 10^3$ D, ce qui est seulement un facteur deux en-dessous de la valeur mesurée par biréfringence de fibres de collagène en solution.¹⁵¹ Dans le dimère de triples hélices $[((PPG)_{10})_6+9H]^{9+}$ (voir la Figure 32), les dipôles sont quasiment antiparallèles et côte à côte, ce qui permet d'appliquer la relation suivante pour leur énergie de liaison :

$$E = \frac{2k_C\mu^2}{r^3}$$

avec k_C la constante de Coulomb, μ le moment dipolaire en C.m et r la distance entre les deux dipôles. Pour le dimère de triples hélices $[((PPG)_{10})_6+9H]^{9+}$, cela donne environ 2 eV, ce qui n'est pas du tout négligeable et permet d'expliquer la survie de ce système en phase gazeuse.

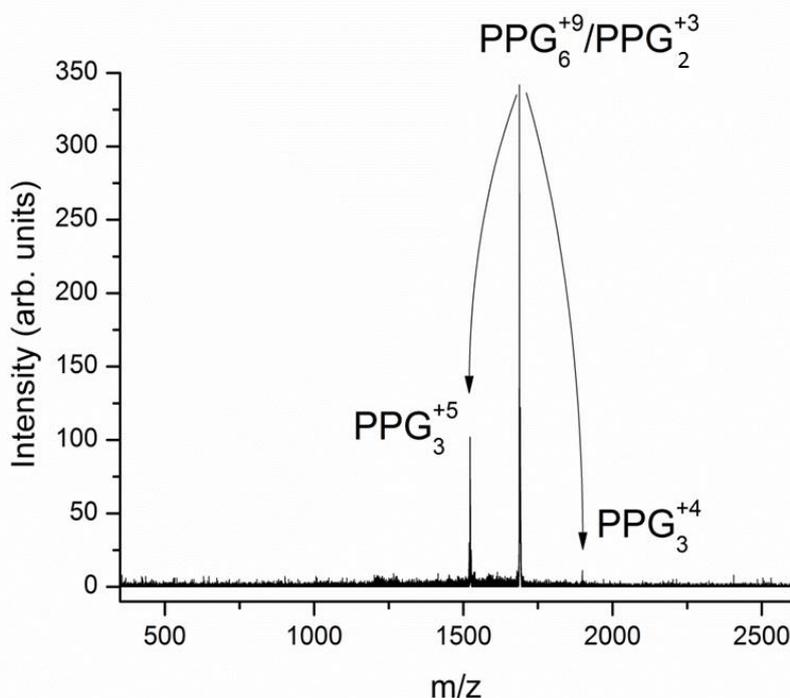


Figure 36 : spectre de masse des ions de $m/z = 1686$ correspondant à l'hexamère $[((PPG)_{10})_6+9H]^{9+}$ et au dimère $[((PPG)_{10})_2+3H]^{3+}$ après collisions avec de l'azote à une tension de 15 V/z. Les fragments sont attribués aux trimères $[((PPG)_{10})_3+5H]^{5+}$ et $[((PPG)_{10})_3+4H]^{4+}$.

Pour les trimères $[(\text{PPG})_{10}]_3+7\text{H}]^{7+}$ et $[(\text{POG})_{10}]_3+7\text{H}]^{7+}$, les résultats de l'activation par collision sont visibles dans la Figure 37 : la fragmentation mène uniquement aux monomères avec deux et trois protons. Statistiquement, on s'attend à la présence de deux monomères $2+$ et un $3+$ dans le trimère, ce qui est cohérent. Par contre, l'absence de dimère est surprenante vis-à-vis des études antérieures sur les agrégats moléculaires : cela va dans le sens de la structure en triple hélice dans laquelle chacun des peptides est lié aux deux autres, la perte d'un peptide entraînant mécaniquement celle des autres. On pourrait objecter que l'énergie de collision est trop élevée pour que le dimère survive, mais ce n'est pas le cas, et nous allons le voir en détails avec l'exemple du trimère $[(\text{PPG})_{10}]_3+6\text{H}]^{6+}$, pour lequel on peut suivre sur la Figure 38 l'évolution du spectre de masse autour du rapport $m/z = 1266$, où se situe aussi le monomère $2+$. Quand la tension d'activation reste en-dessous d'environ 100 V, le massif isotopique observé est celui du trimère, et il laisse la place à celui du monomère, qui domine ensuite jusqu'à une tension supérieure à 180 V, sans que le massif du dimère n'apparaisse. Une autre observation intéressante dans la Figure 37 est la plus faible abondance des fragments de $[(\text{POG})_{10}]_3+7\text{H}]^{7+}$ par rapport à ceux de $[(\text{PPG})_{10}]_3+7\text{H}]^{7+}$, et ce à la même énergie de collision : cela suggère que l'hydroxyproline stabilise la triple hélice.

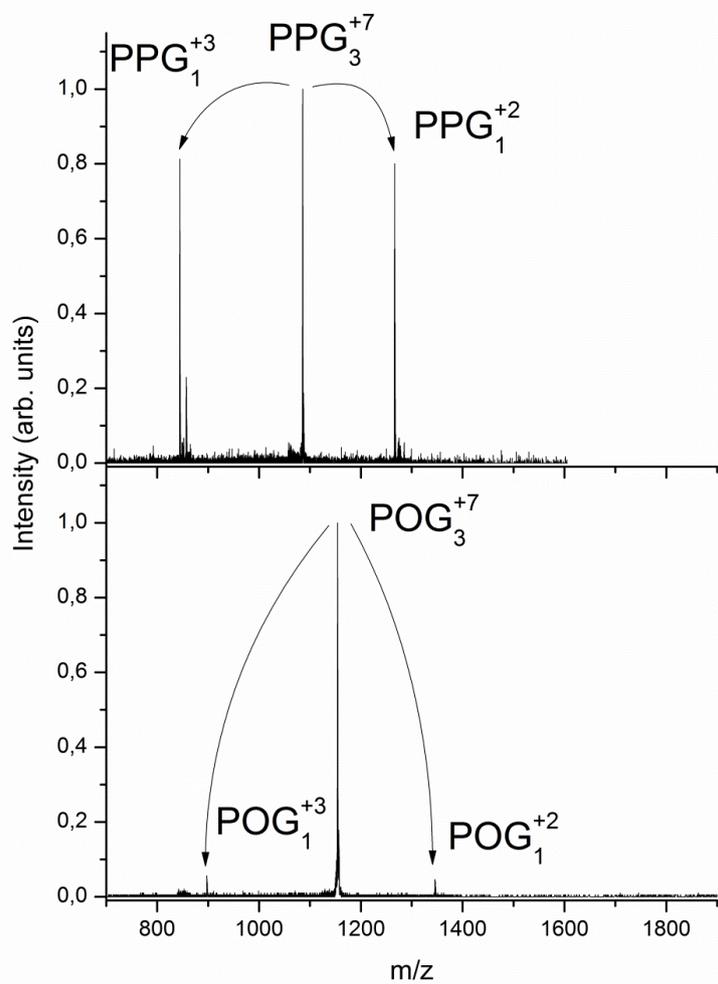


Figure 37 : spectres de masse des trimères $[(\text{PPG})_{10}]_3+7\text{H}]^{7+}$ et $[(\text{POG})_{10}]_3+7\text{H}]^{7+}$ après collisions avec de l'azote à une tension de 12,5 V/z. Les fragments sont attribués aux monomères avec deux et trois protons.

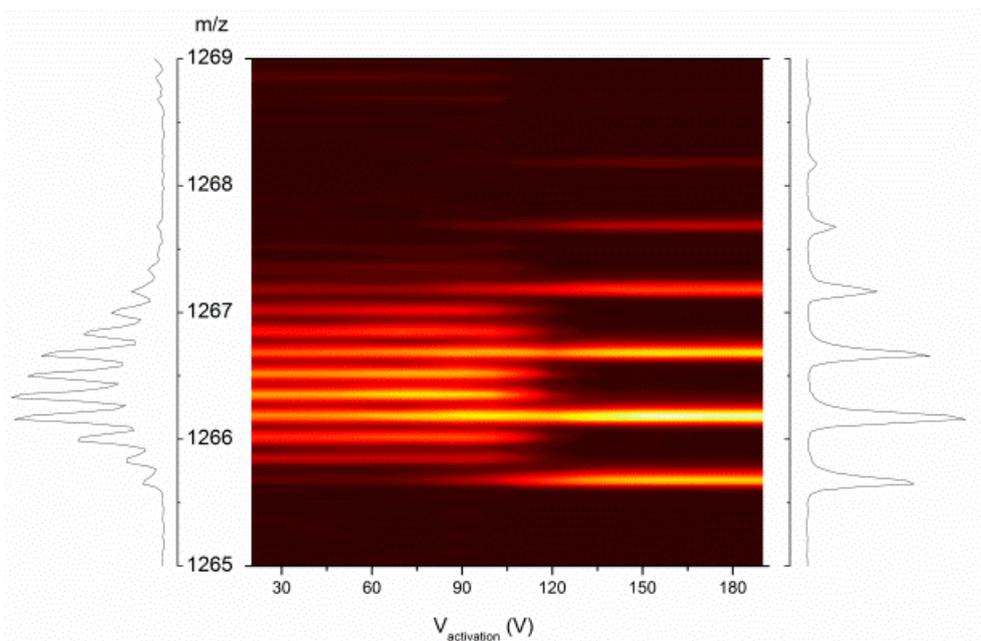


Figure 38 : évolution du spectre de masse autour du rapport $m/z = 1266$ où se situent le trimère $[((PPG)_{10})_3+6H]^{6+}$ et le monomère $[(PPG)_{10}+2H]^{2+}$, en fonction de la tension d'activation dans la cellule de collision. L'intensité est croissante du noir au jaune. Les spectres aux tensions minimum et maximum sont représentés à gauche et à droite, respectivement.

Pour sonder l'influence de l'hydroxyproline sur la structure et la stabilité de la triple hélice, nous avons mené des expériences d'activation des trimères $[((PPG)_{10})_3+7H]^{7+}$ et $[((POG)_{10})_3+7H]^{7+}$ par collision sur le gaz résiduel dans le funnel B (voir la Figure 33). Une impulsion de tension sur l'électrode d'entrée du funnel B pendant typiquement 500 μs permet de sélectionner uniquement ces ions selon leur temps d'arrivée à la fin du premier tube de mobilité. Une tension notée $V_{activation}$ appliquée entre deux électrodes de ce funnel permet d'apporter une certaine quantité d'énergie interne vibrationnelle aux ions via des collisions. Ensuite, les ions sont injectés dans le second tube de mobilité DT2 et leur temps d'arrivée à la fin du tube est mesuré, afin de suivre leurs éventuels changements structuraux. Les résultats sont visibles dans la Figure 39 : On peut voir que le temps d'arrivée de $[((POG)_{10})_3+7H]^{7+}$ reste inchangé tant que la tension d'activation par charge ($V_{activation}/z$) est inférieure à environ 13 V. Au-delà, le signal disparaît progressivement à cause de la fragmentation de la triple hélice en monomères, comme on l'a vu dans la Figure 37. Cette observation est remarquable au vu du comportement des peptides et protéines protonées déjà étudiées : en effet, avant de fragmenter, ceux-ci changent de structure après activation par collision, généralement en se dépliant.^{152,153} La signature du dépliement d'une protéine par spectrométrie de mobilité ionique est même à présent utilisée à des fins de chimie analytique : j'y reviendrai dans le Chapitre 7.¹⁵⁴ L'absence d'effet de l'activation sur le spectre de mobilité de $[((POG)_{10})_3+7H]^{7+}$ est un argument de plus en faveur d'une structure en triple hélice, dans laquelle les peptides sont déjà quasiment dépliés. Les résultats sont presque les mêmes pour $[((PPG)_{10})_3+7H]^{7+}$, mis à part le signal faible qui apparaît à un temps d'arrivée légèrement plus élevé à partir de $V_{activation}/z \approx 7$ V, signe que la triple hélice se dépile un peu avant de fragmenter autour de $V_{activation}/z \approx 11$ V. Cette dernière valeur est inférieure à celle du peptide hydroxylé, et l'on voit bien sur la Figure 39(c) que la décroissance de l'intensité du pic attribué à la triple hélice hydroxylée est décalée d'environ 2 V par charge, ce qui correspond à une augmentation de la tension d'activation de plus de 10% pour le même taux de fragmentation. Il faut donc transférer plus d'énergie vibrationnelle à la triple hélice hydroxylée pour la fragmenter, et comme les deux systèmes ont environ le même nombre de degrés de liberté, on peut en conclure que

l'hydroxyproline stabilise la structure en triple hélice de ces systèmes en phase gazeuse. Nous avons donc montré que cette stabilisation, déjà observée en solution¹⁵⁵ et en phase solide,¹⁴¹ n'est pas due à l'environnement moléculaire, et notamment au réseau de liaisons H des molécules d'eau, en tout cas pas entièrement. Examinons maintenant la situation des trimères $[((\text{PPG})_{10})_3+6\text{H}]^{6+}$ et $[((\text{POG})_{10})_3+6\text{H}]^{6+}$, dont la CCS est inférieure à celle des trimères 7+ (cf. Tableau 2) et donc pour lesquels la triple hélice est légèrement repliée : la Figure 40 ne montre plus de différence notable quant à l'évolution de l'abondance des ions lorsque la tension d'activation augmente, donc la fragmentation n'est plus influencée par l'hydroxyproline. Cela confirme l'importance de l'effet stéréoélectronique dans la stabilisation par l'hydroxyproline, qui requiert une structure en triple hélice très régulière, comme dans un cristal (voir la Figure 32).

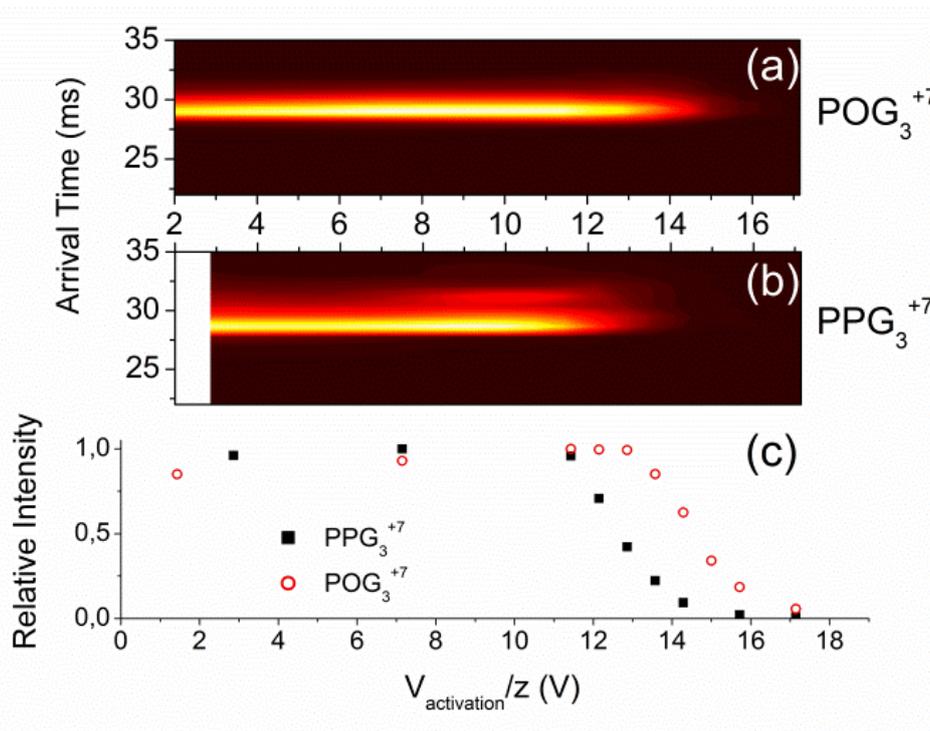


Figure 39 : spectres de mobilité ionique des trimères $[((\text{POG})_{10})_3+7\text{H}]^{7+}$ (a) et $[((\text{PPG})_{10})_3+7\text{H}]^{7+}$ (b), et intensité relative de leurs pics (c) en fonction de la tension d'activation dans le funnel B (voir la Figure 33) normalisée à la charge de l'ion.

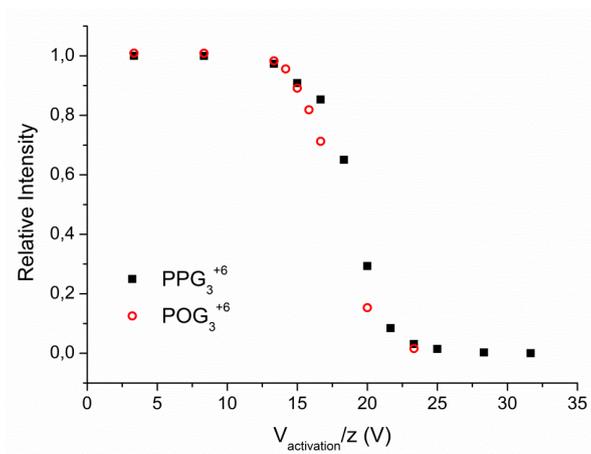


Figure 40 : intensité relative des pics des trimères $[((\text{POG})_{10})_3+6\text{H}]^{6+}$ et $[((\text{PPG})_{10})_3+6\text{H}]^{6+}$ issus des spectres de mobilité ionique en fonction de la tension d'activation dans le funnel B (voir la Figure 33) normalisée à la charge de l'ion.

Dans cette partie, nous avons montré que la structure en triple hélice typique du collagène n'a pas besoin d'eau pour exister dans les trimères et hexamères de peptides (PPG)₁₀ et (POG)₁₀, à condition qu'ils contiennent un nombre de protons suffisant pour empêcher leur repliement. Deux triples hélices peuvent même être liées par une interaction dipôle-dipôle et survivre sans solvant ni liaison hydrogène entre elles. De plus, l'hydroxylation des prolines induit une stabilisation de la triple hélice sans la présence d'un environnement moléculaire, via un effet stéréoelectronique intra-peptidique. Ces travaux¹⁵⁶ illustrent la puissance de la spectrométrie de mobilité ionique couplée à la spectrométrie de masse pour obtenir des informations sur la structure et la stabilité de modèles peptidiques du collagène isolés, et ouvrent la voie à l'étude de l'agrégation des triples hélices en phase gazeuse, une approche potentiellement fructueuse pour comprendre comment se forment les fibres de collagène, ou encore pour aider à créer de nouveaux biomatériaux inspirés du collagène. En effet, tout un domaine de recherche est dédié à ces nouveaux matériaux, grâce à l'étude des relations entre structure et propriétés de stabilité du collagène, via notamment des peptides modèles tels que (PPG)₁₀ et (POG)₁₀.^{157,158} Parmi les moyens de modifier ces propriétés, les rayonnements ionisants sont utilisés par exemple pour créer des liaisons covalentes entre molécules (« cross-linking »)¹⁵⁹ ou changer la conformation des protéines.^{160,161} Nous allons voir dans la partie suivante que les rayonnements ionisants ont de multiples conséquences sur les peptides modèles du collagène, au niveau moléculaire.

II) Irradiation de modèles peptidiques du collagène

Dans la partie précédente, nous avons vu que les agrégats des peptides (PPG)₁₀ et (POG)₁₀ modèles du collagène conservaient leur structure en triple hélice en phase gazeuse, sous certaines conditions. Maintenant, je vais détailler nos études concernant l'effet des rayonnements ionisants (ions carbonés et photons) sur ces systèmes en phase gazeuse. En effet, jusqu'ici, seul le collagène en phase condensée avait été étudié, par exemple par Hu et co.,¹⁶² qui ont montré que le rayonnement cosmique induit la création de nombreuses liaisons covalentes inter-protéines ainsi qu'une baisse de la stabilité thermique du collagène, ce qui peut paraître surprenant. Cependant, cela est parfaitement cohérent avec les travaux réalisés sur des films de polymères sous irradiation, notamment au laboratoire : par exemple, il a été montré que les photons ou les particules ionisantes (ions et électrons) peuvent induire une chimie riche, notamment faire du « cross-linking », mener à l'émission de H₂, mais aussi rompre des liaisons covalentes.¹⁶³ Nous allons voir que ce dernier phénomène se produit aussi en phase gazeuse. En collaboration avec le groupe de T. Schlathölter, de l'Université de Groningue (Pays-Bas), et dans le cadre des thèses de L. Schwob¹⁶⁴ et M. Lalande,¹³⁹ nous avons irradié des modèles de la triple hélice du collagène avec des photons VUV et X, ainsi qu'avec des ions carbonés à l'énergie du pic de Bragg. Comme je l'ai indiqué dans l'introduction de ce manuscrit, ce pic représente le maximum de dépôt d'énergie par des ions dans la matière, à une profondeur qui correspond à la localisation de la tumeur en hadronthérapie par exemple. Les ions carbonés ont alors une énergie cinétique de l'ordre de 1 MeV/u. C'est la gamme qui correspond aux faisceaux fournis par la ligne IRRSUD du GANIL, et l'intensité de l'ordre du microampère est adaptée aux interactions avec les atomes et molécules dont les valeurs de section efficace sont de l'ordre de 10⁻¹⁵ cm². L'énergie des photons VUV et X nous se situe quant à elle dans la gamme 10 – 100 eV et 100 – 1000 eV, respectivement. Les lignes U125-2 NIM et U49-2 PGM-1 du synchrotron BESSY2 (Berlin, Allemagne) fournissent des photons VUV et X, respectivement, avec un flux élevé (de l'ordre de 10¹² s⁻¹) nécessaire aux études de molécules en phase gazeuse dont la densité est très faible. De plus, la résolution en énergie est suffisante pour permettre de faire de la spectroscopie ($\frac{\Delta E}{E} \approx 0,1\%$ au maximum) étant donné que la largeur des bandes moléculaires est de l'ordre d'1 eV au minimum, à température ambiante.¹⁶⁵ Nous avons donc couplé le montage expérimental développé à l'Université de Groningue aux lignes de faisceau de ces grands instruments lors de nombreuses campagnes expérimentales. Un schéma de ce montage est

présenté dans la Figure 41. La source électrospray est suivie d'un funnel qui focalise les ions biomoléculaires avant qu'ils soient guidés par un octopôle RF, dans lequel ils sont accumulés grâce à une tension sur l'électrode de sortie, dont la valeur absolue est baissée lorsqu'on veut injecter les ions dans le piège. Après l'octopôle, les ions sont sélectionnés selon leur rapport m/z par un quadripôle RF, avant d'être injectés dans un piège de Paul RF pendant 50 à 100 ms, en même temps que de l'hélium, qui sert à thermaliser à 300 K les énergies cinétique et vibrationnelle initiales des ions. Après un délai de 100 ms qui permet de pomper l'hélium, le faisceau de rayonnement ionisant passe à travers deux trous percés dans l'électrode annulaire du piège, et son intensité est mesurée par une photodiode ou une cage de Faraday. Les ions moléculaires sont ainsi irradiés pendant typiquement 0,1 à 1 s, de façon à se placer dans les conditions d'interaction unique, et les produits cationiques ou anioniques de l'irradiation sont extraits par un champ électrique créé dans le piège par une tension appliquée entre ses électrodes hyperboliques, puis détectés. L'intensité des ions en fonction de leur temps d'arrivée sur le détecteur constitue le spectre de temps de vol, qui sera par la suite converti en spectre de masse par une calibration. Nous enregistrons les spectres alternativement avec et sans rayonnement ionisant, et nous calculons la différence : le pic de l'ion précurseur est alors négatif et son aire est proportionnelle au nombre de molécules ayant interagi avec le rayonnement et changé de rapport m/z suite à une ionisation et/ou une fragmentation. Le détecteur est composé soit de deux galettes à microcanaux montées en chevron (la tension de post-accélération est alors de 5 kV), soit d'une galette à microcanaux, d'un scintillateur et d'un photomultiplicateur, ce qui a l'avantage de pouvoir monter la tension de post-accélération à 10 kV au maximum, et donc d'augmenter l'efficacité de détection pour les ions de grand rapport m/z . Pour tracer l'évolution des abondances relatives des différents ions observés en fonction de l'énergie du photon, nous les avons corrigées par cette efficacité de détection ainsi que par l'aire sous le pic de l'ion précurseur.¹⁶⁶ Un avantage du piège de Paul est de pouvoir piéger les ions négatifs et positifs en même temps, ce qui permet de détecter les ions positifs créés par irradiation d'ions négatifs, comme nous l'avons fait récemment pour l'irradiation d'oligonucléotides d'ADN.¹⁶⁷ Pour l'étude des peptides modèles du collagène, nous avons utilisé le mode positif de la source électrospray et la détection d'ions positifs.

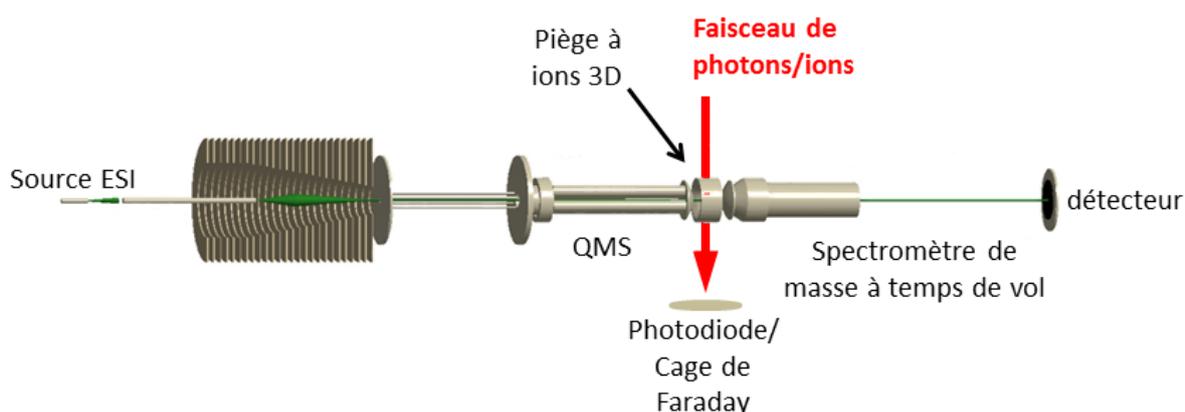


Figure 41 : schéma du montage expérimental du groupe de T. Schlathöler utilisé pour l'irradiation d'ions moléculaires piégés par un faisceau de photons ou d'ions atomiques. La photodiode et la cage de Faraday sont utilisées pour mesurer l'intensité des faisceaux de photons et d'ions, respectivement.

1. Processus induits par l'absorption d'un photon VUV ou X

a) Peptides isolés

D'abord, nous allons détailler l'effet de l'absorption d'un photon d'énergie de 14 à 531,5 eV sur les peptides protonés isolés. Dans la Figure 42, on peut voir les spectres de masse du peptide (POG)₁₀ dans deux états de charge : 2+ et 3+ (les résultats sont très similaires pour le peptide (PPG)₁₀) : les spectres sont dominés par les pics attribués à l'ionisation non-dissociative et aux fragments notés b_i^+ issus de la rupture d'une ou plusieurs liaisons covalentes du squelette peptidique (voir la nomenclature des fragments dans la Figure 42). On s'attendait à observer de l'ionisation au vu de l'énergie d'ionisation mesurée autour de 12 – 13 eV pour des peptides dans ces états de charge.¹⁶⁸ De même, la fragmentation n'est pas surprenante car des études précédentes ont déjà démontré l'existence de ce phénomène.^{26,169} Cependant, une observation intéressante est la prédominance des fragments notés b_{3n}^+ et y_{3n}^+ (avec n un entier positif), formés par la rupture d'une des liaisons peptidiques glycine-proline (voir le schéma de la séquence peptidique dans la Figure 42). En effet, ces sites de rupture préférentielle ont également été observés en solution après irradiation UV,¹⁷⁰ ce qui fait penser à une propriété intrinsèque des peptides modèles du collagène sous irradiation. Nous en reparlerons par la suite. L'état de charge a un effet sur le spectre de masse : en effet, un photon d'énergie 14 eV induit beaucoup plus de fragmentation pour le peptide [(POG)₁₀+3H]³⁺ que pour le peptide [(POG)₁₀+2H]²⁺. Ceci peut paraître surprenant de voir un tel effet provoqué par un seul proton, mais il faut garder en tête l'importance des protons mobiles dans la fragmentation des peptides protonés dans leur état électronique fondamental, comme c'est le cas lors de collisions à basse énergie sur du gaz rare (CID) ou après absorption IR multi-photonique (IRMPD).¹⁷¹ Dans (POG)₁₀, un seul proton peut être séquestré car seul le N terminal est très basique, donc les protons supplémentaires sont susceptibles d'être mobiles, ce qui donne un proton mobile pour [(POG)₁₀+2H]²⁺ et deux pour [(POG)₁₀+3H]³⁺. Cette mobilité est induite par l'augmentation de l'énergie vibrationnelle du système, ce qui implique, dans le cas présent, la conversion d'une partie de l'énergie du photon en énergie vibrationnelle du peptide. L'énergie du photon a aussi un effet important sur les spectres de masse (cf. Figure 43) : lorsqu'elle augmente de 14 à 22 eV, la probabilité d'ionisation non-dissociative augmente progressivement, pendant que la fragmentation *diminue*. Ceci est contre-intuitif car lorsque la quantité d'énergie apportée au système est plus grande, on s'attend à plus de fragmentation... Pour comprendre ce comportement, il faut se rappeler que lorsque l'énergie du photon est légèrement inférieure à l'énergie d'ionisation, son absorption provoque l'excitation du système dans un état électronique de haute énergie. Pour un système possédant un grand nombre de degrés de liberté, dans la majorité des cas il se produit alors une conversion interne, suivie d'une redistribution de l'énergie du photon dans les degrés de liberté vibrationnels, et éventuellement d'une fragmentation. La présente gamme d'énergie du photon (14 – 22 eV) se situe juste *au-dessus* de l'énergie d'ionisation, il existe donc une compétition entre excitation et ionisation. Lors de cette dernière, un électron est éjecté du peptide avec une certaine énergie cinétique, la quantité d'énergie vibrationnelle résiduelle est alors bien plus petite que dans le cas de l'excitation, donc le peptide ne fragmente pas, d'où la présence du pic dû à l'ionisation non-dissociative. On pourrait objecter qu'il peut également se produire un phénomène d'auto-ionisation lorsque l'énergie du photon est supérieure au seuil d'ionisation, mais il faut se rappeler que l'auto-ionisation requiert un changement de géométrie minimale entre les états de charge initial et final du système.³¹ Or les peptides sont des systèmes très flexibles, dont la géométrie est en général sensible à l'état de charge : par exemple, nous avons montré qu'un peptide de 26 acides aminés (et donc de longueur similaire à celle de (PPG)₁₀ et (POG)₁₀) se déplie sous l'influence d'un proton de plus.¹⁷² Par conséquent, nous pouvons nous attendre à ce que la contribution de l'auto-ionisation soit négligeable, sans pour autant pouvoir l'exclure.

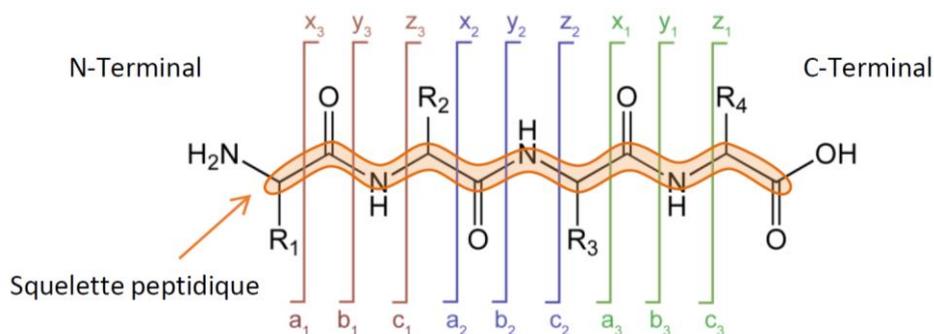
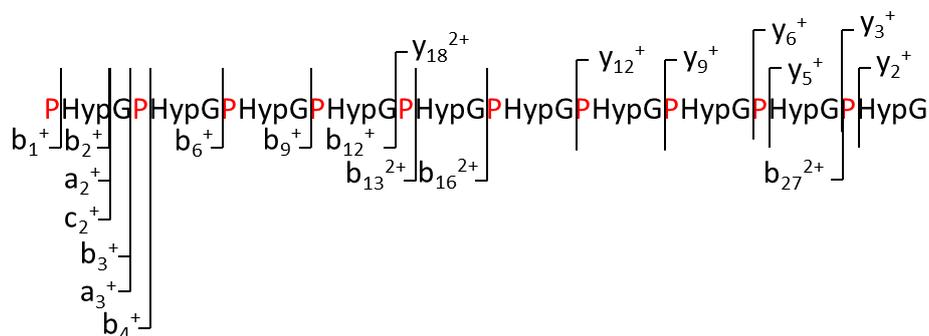
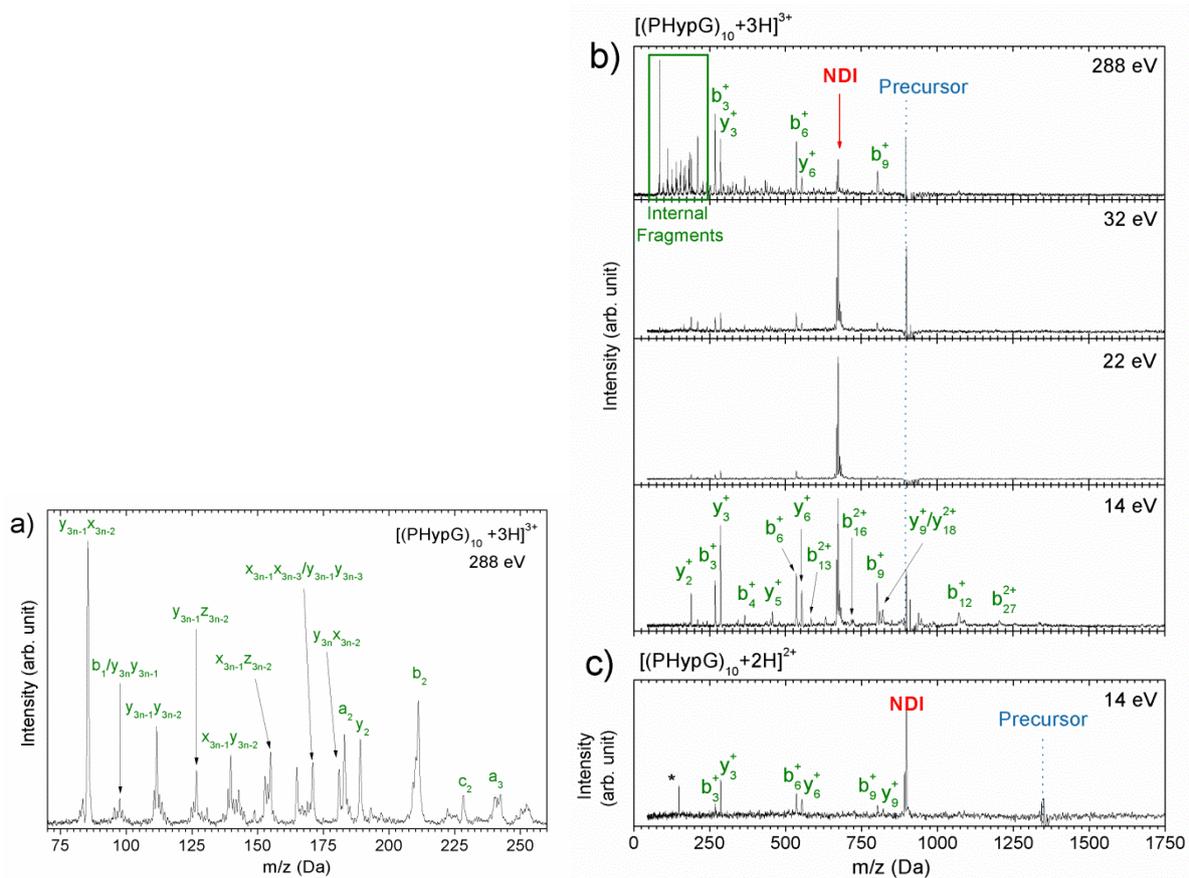


Figure 42 : spectres de masse du peptide $[(\text{POG})_{10}+3\text{H}]^{3+}$ (a et b) et $[(\text{POG})_{10}+2\text{H}]^{2+}$ (c) après absorption d'un photon d'énergie 14 à 288 eV (Hyp est utilisé à la place de O pour l'hydroxyproline). Le rapport m/z de l'ion précurseur est indiqué par des pointillés car le pic est négatif (voir le texte), et le pic attribué à l'ionisation non-dissociative par NDI.

Un agrandissement du spectre de masse à 288 eV $[(\text{POG})_{10}+3\text{H}]^{3+}$ est visible en a), et les fragments internes sont attribués. Au milieu, les fragments formés par rupture d'une seule liaison sont indiqués sur la séquence peptidique. En bas, la nomenclature usuelle pour la notation des fragments peptidiques est indiquée. Les fragments a, b et c ont la charge du côté N-terminal, alors que les fragments x, y et z ont la charge du côté C-terminal.

Lorsque l'énergie du photon augmente de 14 à 22 eV, la probabilité d'ionisation augmente, alors que celle de l'excitation diminue, nous avons donc attribué la présence des fragments à l'excitation, et non à l'ionisation. Cette interprétation va dans le sens d'une fragmentation dans l'état électronique fondamental du peptide après conversion interne, et donc du mécanisme du proton mobile évoqué plus haut. Lorsque l'énergie du photon augmente de 22 à 531,5 eV, l'ionisation non-dissociative diminue alors que la fragmentation augmente, ce qui s'explique par une augmentation de l'énergie vibrationnelle déposée par le photon dans le peptide après ionisation. Ce phénomène a été détaillé dans les travaux de thèse de D. Egorov du groupe de T. Schlathölter.¹⁷³ Notons que cette augmentation de la fragmentation est surtout due à la présence d'autres fragments que b_{3n}^+ et y_{3n}^+ , notamment des fragments internes formés par la rupture de plusieurs liaisons covalentes, et qui dominent les spectres à haute énergie (domaine des rayons X mous, voir la Figure 42 et la Figure 43), ce qui peut s'expliquer par une grande quantité d'énergie vibrationnelle déposée dans le peptide. Ces nouveaux fragments viennent sans doute également du fait que l'ionisation donne naissance à un radical cation, une espèce chimiquement plus réactive à cause de barrières énergétiques plus basses, et dont certaines voies de dissociation sont différentes des espèces protonées.¹⁷⁴ A partir de 288 eV (le seuil d'énergie correspondant à l'absorption du photon par les électrons 1s des atomes de carbone du peptide), les abondances relatives ne changent presque plus. Nous reparlerons de ce curieux phénomène un peu plus loin.

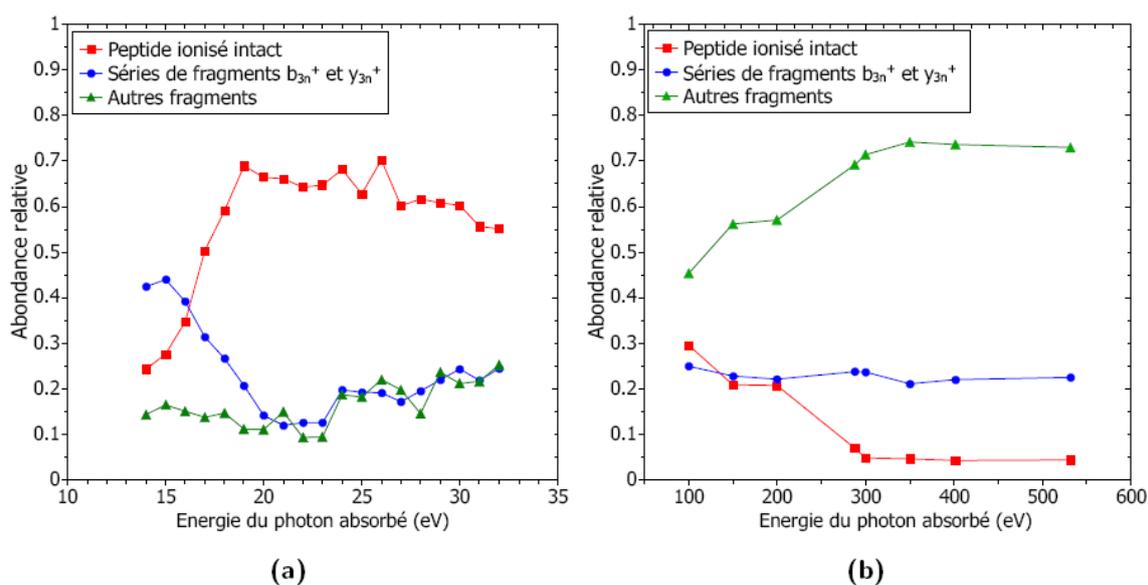


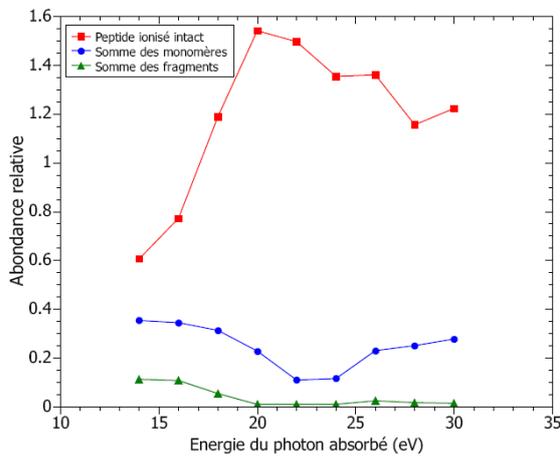
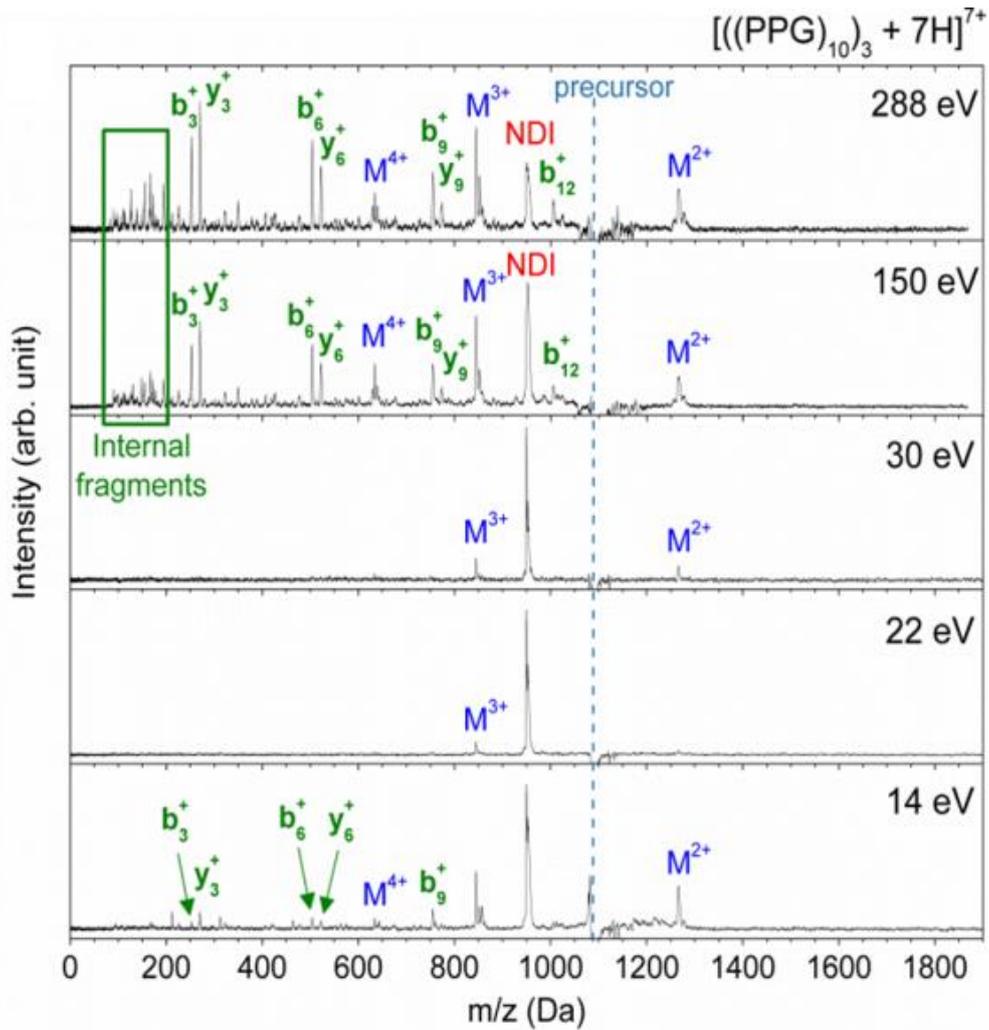
Figure 43 : évolution des principales voies de relaxation des peptides $[(\text{POG})_{10}+3\text{H}]^{3+}$ (a) et $[(\text{PPG})_{10}+3\text{H}]^{3+}$ (b) en fonction de l'énergie du photon. Les résultats sont similaires pour $(\text{PPG})_{10}$ et $(\text{POG})_{10}$ donc ces graphes contiennent ceux pour lesquels la statistique était la meilleure.

b) Triples hélices

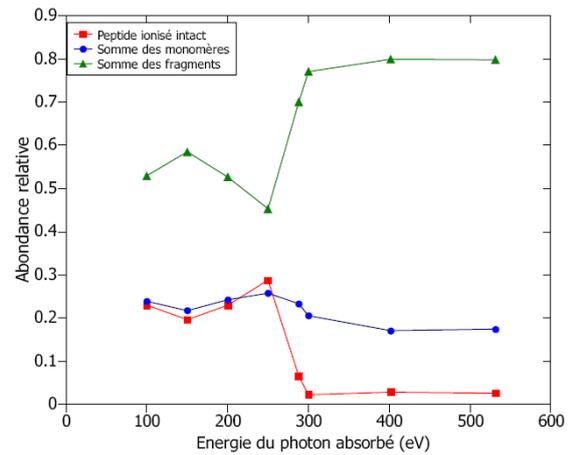
Après avoir étudié les peptides $(\text{PPG})_{10}$ et $(\text{POG})_{10}$ isolés, nous allons sonder le comportement de leurs agrégats dont la structure est en triple hélice. Les spectres de masse après l'absorption d'un photon d'énergie 14 – 288 eV par le trimère $[(\text{PPG})_{10}]_3+7\text{H}^{7+}$ sont visibles sur la Figure 44. On observe les mêmes processus que pour les peptides isolés, à savoir l'ionisation non-dissociative et les mêmes fragments peptidiques, mais de nouveaux pics apparaissent aux rapports m/z du monomère dans les états de charge 2+, 3+ et 4+. Ils sont le signe d'une dissociation du trimère en monomères, ce qui a déjà été observé dans nos expériences de CID (voir la partie I) de ce chapitre) et confirme donc le transfert d'énergie vibrationnelle dans le système. Notons que l'état de charge 4+ n'avait pas été

observé en CID, mais c'est logique car l'ionisation ne se produisait pas, contrairement au cas présent : en effet, l'énergie d'ionisation de $[(\text{PPG})_{10}]_3+7\text{H}]^{7+}$ est sans doute plus basse que 14 eV, au vu de celle des protéines cytochrome C et ubiquitine chargées 7+).¹⁷⁵ Lorsque l'énergie du photon augmente de 14 à 22 eV, la fragmentation diminue progressivement jusqu'à quasiment disparaître, pendant que l'ionisation non-dissociative augmente, comme pour le peptide isolé, ce qui confirme la transition entre excitation et ionisation après photoabsorption. Quand l'énergie du photon augmente encore, la dissociation de la triple hélice en monomères se produit *avant* la fragmentation des peptides, ce qui s'explique par le fait que l'énergie interne déposée dans le système augmente progressivement : à basse énergie, la triple hélice se dissocie en trois monomères après rupture des liaisons non-covalentes, et à haute énergie, ces monomères ont suffisamment d'énergie vibrationnelle résiduelle pour casser leurs liaisons covalentes. La rupture des liaisons non-covalentes n'est pas détectable par spectrométrie de masse pour des peptides isolés, ce qui montre que les complexes non-covalents constituent une sonde plus fine du dépôt d'énergie vibrationnel dans des systèmes moléculaires. Cette augmentation de la fragmentation montre également que l'excès d'énergie par rapport au seuil d'ionisation n'est pas emporté par l'énergie cinétique de l'électron émis, ce qui indique que des orbitales de valence plus profondes sont sondées par le photon lorsque son énergie augmente.

Maintenant, nous allons voir dans la Figure 45 que contrairement aux peptides isolés, l'hydroxyproline a une forte influence sur les processus photo-induits : en effet, pour $[(\text{POG})_{10}]_3+7\text{H}]^{7+}$, nous observons le dimère 5+ après photoabsorption à basse énergie, et la fragmentation des peptides est totalement absente entre 14 et 28 eV. À 14 eV, le dimère 5+ est presque aussi abondant que le monomère 2+, ce qui est cohérent avec une dissociation du trimère 7+ après photo-excitation sans ionisation. Lorsque l'énergie de photon augmente, l'abondance du dimère 5+ baisse pendant que celle des monomères 3+ et 4+ et de l'ionisation non-dissociative monte, nous avons donc là encore une transition entre excitation et ionisation, cette dernière se traduisant par une très faible dissociation en monomères intacts. Par conséquent, l'hydroxylation des prolines stabilise la triple hélice en phase gazeuse après photo-excitation ou photo-ionisation, comme après collision avec un gaz rare à basse énergie. Nous allons voir par la suite que cette stabilisation s'étend aussi aux dimères de triples hélices. Avant cela, intéressons-nous à l'évolution des voies de relaxation de la triple hélice $[(\text{PPG})_{10}]_3+7\text{H}]^{7+}$ après absorption d'un photon d'énergie 100 – 531,5 eV : dans la Figure 44, on voit que la probabilité d'ionisation non-dissociative chute brutalement entre 250 et 300 eV, au profit de la fragmentation intramoléculaire, tandis que la fragmentation intermoléculaire stagne. Par conséquent, lorsqu'un électron 1s du carbone est excité ou éjecté, la quantité d'énergie vibrationnelle transférée est grande. De plus, on constate que la fragmentation n'augmente plus pour les énergies de photon supérieures à 300 eV : tout ceci est parfaitement cohérent avec le cas des peptides isolés. Cette dernière observation peut paraître curieuse, mais il faut garder en tête que l'énergie cinétique de l'électron Auger émis après absorption du photon par un électron 1s augmente avec l'énergie de liaison de cet électron : cette énergie cinétique est de 266,8 eV pour le carbone dans le graphite, 376,6 eV pour l'azote dans NH_3 , et 507,7 eV pour l'oxygène dans H_2O .¹⁷⁶ Ces énergies varient faiblement (quelques eV) en fonction de la composition de la molécule, nous pouvons donc faire l'hypothèse qu'elles sont valables pour les peptides. Cela donnerait donc des énergies internes résiduelles de 21,2, 24,9 et 23,8 eV après photoabsorption à 288, 401,5 et 531,5 eV, respectivement, ce qui est très similaire quel que soit l'électron 1s qui absorbe le photon.



(a)



(b)

Figure 44 : en haut : spectres de masse du trimère $[(PPG)_{10}_3 + 7H]^{7+}$ après absorption d'un photon (M correspond au monomère, NDI à l'ionisation non-dissociative) ; en bas : évolution des principales voies de relaxation en fonction de l'énergie du photon (« peptide ionisé intact » veut dire NDI).

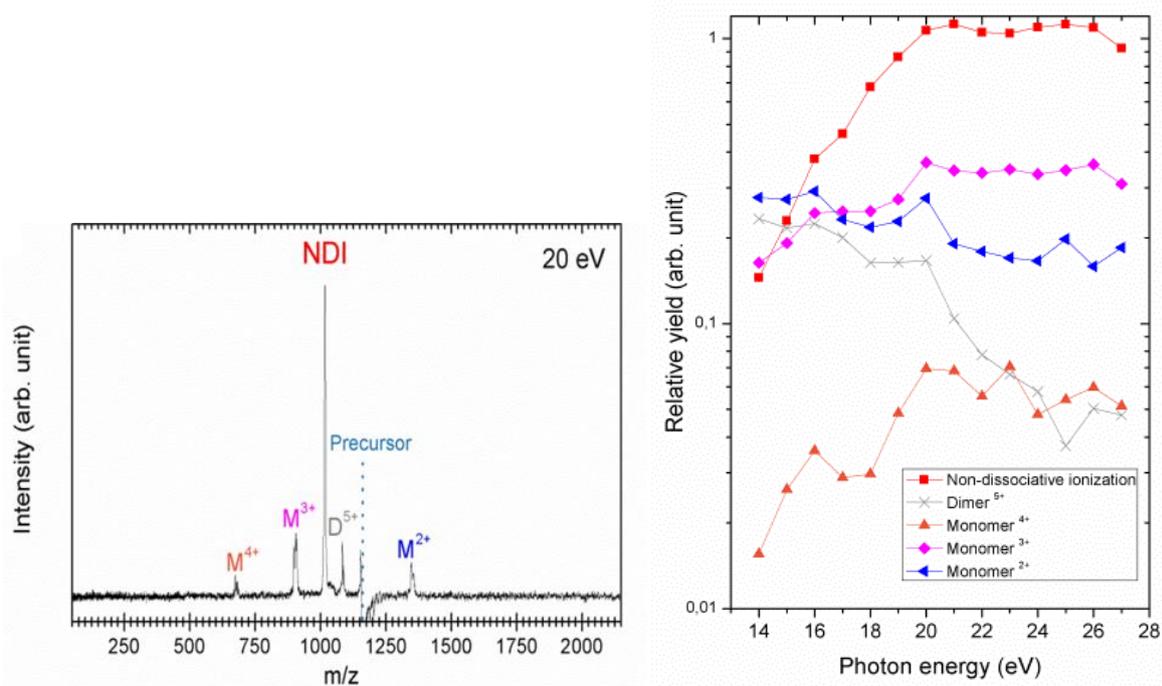


Figure 45 : à gauche : spectre de masse du trimère $[(\text{POG})_{10}]_3+7\text{H}]^{7+}$ après absorption d'un photon (M correspond au monomère, D au dimère et NDI à l'ionisation non-dissociative) ; à droite : évolution des différentes espèces formées en fonction de l'énergie du photon.

Dans la partie I) de ce chapitre, nous avons vu qu'un dimère de triples hélices pouvait survivre en phase gazeuse, à condition qu'il contienne au moins neuf protons. Rappelons que l'hexamère 9+ est composé d'un trimère 5+ et d'un trimère 4+. Voyons maintenant comment réagit ce système à l'absorption d'un photon ionisant : dans la Figure 46, les spectres de masse de l'hexamère $[(\text{PPG})_{10}]_6+9\text{H}]^{9+}$ montrent que le pic majoritaire à $m/z = 1266$ correspond au trimère 6+ mais aussi au monomère 2+, le monomère 3+ étant également détecté. Un autre pic ambigu est celui situé à $m/z = 1520$: il peut être attribué au trimère 5+ mais aussi à l'hexamère 10+ issu de l'ionisation non-dissociative. Dans cette gamme d'énergie de photon (100 – 288 eV), l'ionisation se produit toujours, elle mène donc à l'hexamère 10+, et sa dissociation peut produire soit deux trimères 5+, soit un trimère 4+ et un 6+ (si le trimère 5+ est ionisé et que les charges ne s'équilibrent pas avant dissociation). Dans ce dernier cas, on devrait observer un pic à $m/z = 1900$ (trimère 4+), ce qui n'est pas le cas. Par conséquent, les trimères sont sans doute minoritaires. Les mêmes fragments du squelette peptidique qu'après l'ionisation des trimères et monomères sont aussi observés, mais avec une intensité inférieure au cas du trimère à une énergie donnée : le système étant deux fois plus gros, il y a deux fois plus de degrés de liberté vibrationnels dans lesquels répartir l'énergie déposée ; de plus, il faut tenir compte de l'énergie de liaison de l'hexamère : ces phénomènes diminuent la fragmentation des monomères. Celle-ci augmente avec l'énergie du photon, ce qui s'explique par une augmentation progressive de l'énergie vibrationnelle déposée dans le système, comme pour les trimères et les monomères (voir ce qui précède). L'effet de l'hydroxylation des prolines peut être observé dans la Figure 47 pour l'hexamère $[(\text{POG})_{10}]_6+9\text{H}]^{9+}$: cette fois, l'ionisation non-dissociative est incontestablement présente, car le pic associé est bien plus intense et il y a même un autre pic au rapport $m/z = 1468$ non-ambigu et attribué à l'hexamère 11+, formé par la double ionisation non-dissociative. Des confirmations de cette attribution sont, d'une part, la disparition de ce pic à $m/z = 1468$ à l'énergie 288 eV, où un électron 1s du carbone est excité dans une orbitale moléculaire, puis un électron Auger est émis, ce qui mène à l'ionisation simple. D'autre part, on observe la réapparition de ce pic à 300 eV, au-dessus de l'énergie d'ionisation des électrons 1s du carbone (autour de 294 eV

dans les protéines^{36,37}). Ce phénomène a été observé pour des protéines^{36,166} mais jamais pour un complexe non-covalent. De plus, les fragments du peptide sont encore plus faibles que pour $[(PPG)_{10}_6+9H]^{9+}$, à une énergie donnée. Toutes ces observations montrent que l'hydroxyproline stabilise aussi le dimère de triples hélices. L'effet stéréoelectronique explique la moindre fragmentation des triples hélices après dissociation de l'hexamère, mais comment expliquer la présence de l'ionisation non-dissociative ? Pour tenter de comprendre, on peut regarder la structure de l'hexamère $((GPO)_9)_6$ dans un cristal¹⁷⁷ (voir la Figure 48) : c'est celle qui se rapproche le plus de $(POG)_{10}$ et dont l'hexamère est visualisable sur le site de la PDB. On peut alors voir que les groupements OH des chaînes latérales des hydroxyprolines pointent vers l'extérieur des triples hélices sans faire de liaison H directement entre elles. Cependant, si l'on regarde plus précisément, dans une région où deux de ces groupements OH sont proches, on s'aperçoit qu'une molécule d'eau établit un pont hydrogène entre les deux groupements. Dans l'hexamère $((GPO)_9)_6$, il existe trois ponts comme celui-là, et si c'est également le cas pour $[(POG)_{10}_6+9H]^{9+}$ et que les trois H₂O restent attachées après mise en phase gazeuse, l'augmentation du rapport m/z est de 6 par rapport à l'hexamère sans aucune molécule d'eau, dont le rapport est de $m/z = 1795$. Or la résolution en masse du spectromètre TOF ne permet pas de les séparer, donc il se peut que ces molécules d'eau et ces liaisons H soient présentes en phase gazeuse, expliquant la stabilisation des hexamères par l'hydroxyproline. Un moyen de s'en assurer serait de refaire ces expériences avec le spectromètre actuel, dont la résolution a été augmentée grâce à l'ajout d'un miroir électrostatique permettant d'utiliser le spectromètre en mode réflectron. En effet, nous avons récemment acquis des spectres de masse avec une résolution de l'ordre de $\frac{m}{\Delta m} = 2000$,¹⁷⁸ ce qui est même suffisant pour distinguer $[(POG)_{10}_6+9H]^{9+}$ de $[(POG)_{10}_6+9H]^{9+}(H_2O)$.

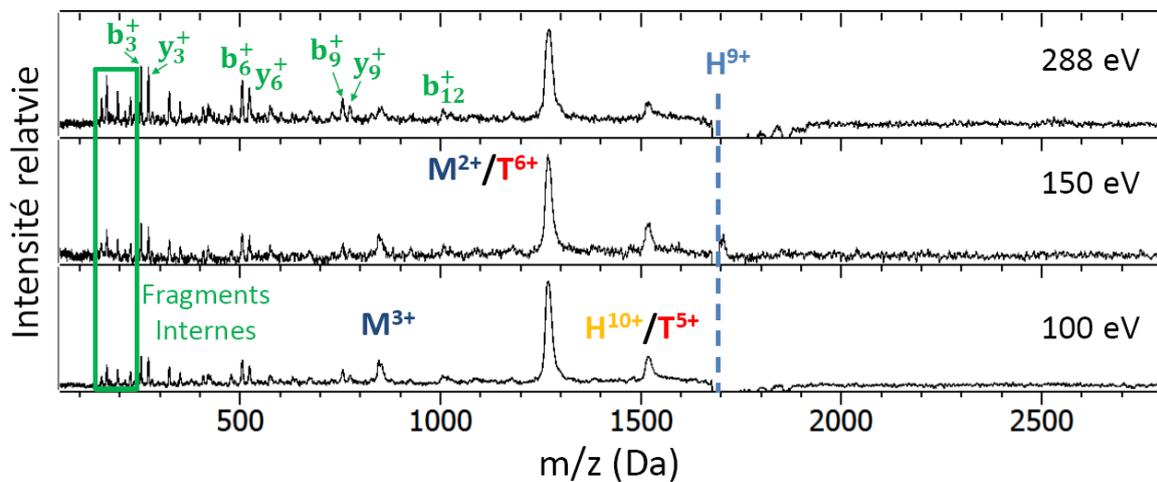


Figure 46 : spectre de masse de l'hexamère $[(PPG)_{10}_6+9H]^{9+}$ après absorption d'un photon (M correspond au monomère, T au trimère et H à l'hexamère). Le pic du précurseur est négatif à cause de l'analyse des données réalisée (voir le texte).

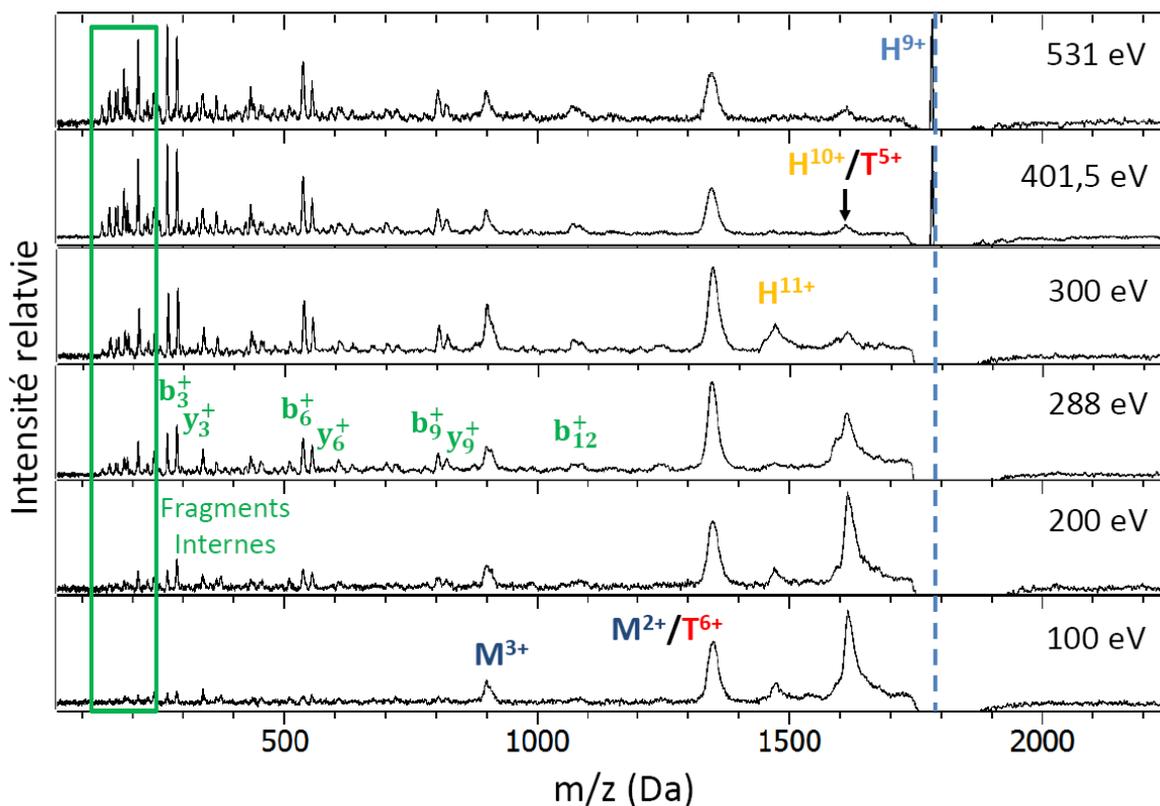


Figure 47 : spectre de masse de l'hexamère $[(\text{POG})_{10}]_6+9\text{H}^{9+}$ après absorption d'un photon (M correspond au monomère, T au trimère et H à l'hexamère).

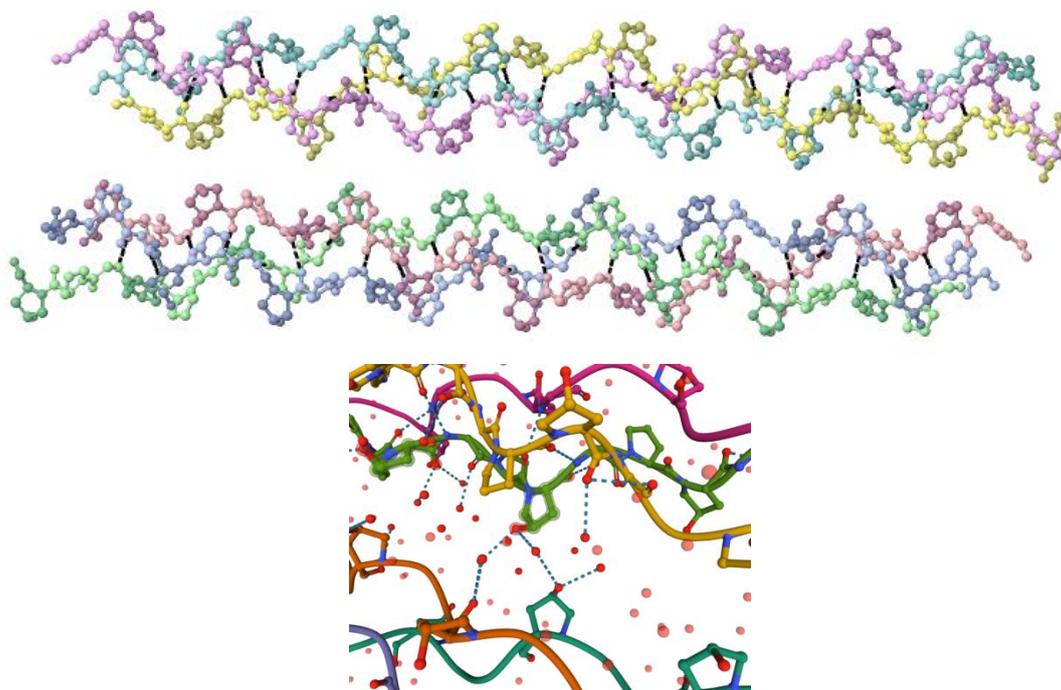


Figure 48 : structure cristallographique du peptide $(\text{GPO})_9$ (PDB 3B0S). Les liaisons H sont représentées par des tirets. Chaque peptide possède une couleur différente. Les atomes d'hydrogène ont été omis pour plus de clarté. En haut, la structure est visible en entier mais sans les molécules d'eau. En bas, les molécules d'eau sont incluses, et on voit un détail de la structure où les deux hydroxyprolines en vert sont reliées par des liaisons H via une molécule d'eau.

2. Processus induits par la collision avec un ion carbone à l'énergie du pic de Bragg

Dans la partie précédente, nous avons vu en détail comment se comportent des agrégats de peptides modèles de la triple hélice du collagène après irradiation par des photons ionisants, grâce aux résultats d'expériences menées à un synchrotron. Maintenant, nous allons sonder les processus induits par la collision avec des ions carbones. Nous avons utilisé une autre grande installation, le GANIL à Caen, sur la ligne de faisceau IRRSUD. Traditionnellement, celle-ci sert plutôt à l'étude de matériaux, un autre axe de recherche du laboratoire, mais les faisceaux d'ions proposés sont pertinents du point de vue de l'hadronthérapie, puisque leur énergie cinétique correspond à celle des ions lorsqu'ils traversent la tumeur (environ 1 MeV/u). De plus, l'intensité de l'ordre de 10 μA (avant collimation) est similaire à celle des faisceaux ayant déjà donné un signal d'ionisation lors d'expériences précédentes.²⁵ Nous avons donc mené sur cette ligne les premières expériences d'irradiation de systèmes moléculaires d'intérêt biologique formés par une source électrospray, grâce à une collaboration avec le groupe de T. Schlathöler, et à l'aide du même montage expérimental que celui utilisé pour les irradiations par photons (voir la Figure 41).¹⁷⁹ Pour contrôler la durée d'irradiation, nous avons envoyé le signal temporel d'un générateur d'impulsions de basse tension à un boîtier électronique qui contrôle la haute tension entre deux plaques permettant de dévier le faisceau d'ions. Nous nous sommes donc placés, comme pour les photons, dans les conditions d'une majorité d'interactions uniques, et d'une minorité d'interactions multiples (entre plusieurs ions et une molécule donnée). Un diaphragme de 2 mm de diamètre a été placé devant le trou de l'électrode annulaire du piège de Paul afin d'éviter que le faisceau d'ions ne la touche. Une cage de Faraday placée en bout de ligne mesurait le courant d'ions passant à travers le piège : typiquement quelques dizaines de nanoampères, du même ordre de grandeur que les expériences précédentes avec des faisceaux à une énergie cinétique de 10 à 100 keV.^{180,181} Dans la Figure 49, le spectre de masse du peptide isolé $[(\text{POG})_{10}+3\text{H}]^{3+}$ après collision avec un ion $^{12}\text{C}^{4+}$ à 0,98 MeV/u est visible (celui du peptide $[(\text{PPG})_{10}+3\text{H}]^{3+}$ est quasiment identique). Il est très similaire à celui qu'on avait obtenu après absorption d'un photon de 150 eV, ce qui veut dire que les mêmes processus se produisent : ionisation, dépôt d'énergie interne redistribuée selon les degrés de libertés vibrationnels du système, et fragmentation. Ce n'est pas très étonnant, étant donné qu'à cette énergie cinétique, le processus majeur est l'ionisation après collision ion-électron, le phénomène de capture d'électron par le projectile étant négligeable. Cependant, un pic est observé uniquement avec les ions : il est attribué au peptide doublement chargé, et correspond donc à la perte d'une charge positive de l'ion précurseur. Ce phénomène a été observé pour la première fois après des collisions entre des ions Xe^{8+} à 96 keV et la protéine cytochrome C protonée, et a été attribué à un détachement de proton.¹⁸⁰ Des études plus récentes de collision entre un faisceau d'ions He^+ et le peptide protoné substance P ont conclu, grâce à une résolution en masse suffisante, que la masse du peptide restait en fait inchangée.¹⁸² Les auteurs ont alors expliqué la charge réduite par un transfert d'électron depuis des anions moléculaires piégés en même temps que les ions positifs précurseurs : ceci se produit donc sans doute aussi dans notre cas. L'origine de ces anions reste cependant à vérifier : il s'agit peut-être d'espèces désorbées par le faisceau d'ions sur une surface, mais nous ne savons pas laquelle, et il est curieux que ce phénomène soit observé dans plusieurs montages expérimentaux différents...

Si l'on s'intéresse maintenant à la triple hélice $[(\text{PPG})_{10}+3\text{H}]^{7+}$, on peut voir que là encore, le spectre de masse après collision avec un ion $^{12}\text{C}^{4+}$ à 0,98 MeV/u est similaire à ceux obtenus avec un photon X (cf. Figure 49), ce qui confirme l'existence des mêmes processus. Cependant, le spectre le plus proche est maintenant celui qui correspond à un photon de 288 eV, contre 150 eV pour le peptide isolé. Or nous avons montré que l'énergie vibrationnelle déposée par photoabsorption dans un même

système augmente entre 150 et 288 eV, cette énergie étant d'environ 20 eV en moyenne pour 288 eV.¹⁸³ Cette augmentation montre que le peptide isolé possède moins d'énergie vibrationnelle que la triple hélice après collision avec un ion carbone, ce qui est inattendu et différent du cas des photons. Un phénomène qui distingue la photoionisation de l'ionisation par collision avec un ion est l'état de spin de la molécule ionisée : comme le spin total est conservé, et que la molécule est un singulet, c'est forcément un doublet après photoabsorption, mais pas forcément pour l'ion, car celui-ci peut changer de spin après la collision (le $^{12}\text{C}^{4+}$ possède deux électrons). Cela implique qu'une variété plus importante d'états électroniques excités peut exister dans le cas de l'ion, mais cela ne devrait pas dépendre du nombre de peptides dans le système... Pour expliquer l'augmentation de l'énergie vibrationnelle avec la taille du système, nous avons fait l'hypothèse qu'un ion carbone peut interagir avec deux électrons du même ion moléculaire précurseur : la probabilité de ce phénomène devrait augmenter avec le nombre d'électrons dans l'ion précurseur, et donc être plus grande pour la triple hélice que pour le peptide isolé. Très récemment, en juin 2021, nous avons obtenu le spectre de l'hexamère $[(\text{PPG})_{10}6+9\text{H}]^{9+}$ après collision avec des ions carbonés ($^{13}\text{C}^{3+}$ à 0,8 MeV/u), et on peut constater qu'il ressemble au spectre de photoabsorption à 288 eV dans la Figure 50. Il est important de noter que le détecteur d'ions et donc la tension de post-accélération étaient différents : 5 kV pour les carbonés et 9 kV pour les photons, ce qui peut expliquer la petite baisse d'intensité relative du pic attribué au monomère 2+ dans le spectre des carbonés. Cependant, on remarque l'absence du pic attribué à l'ionisation non-dissociative et/ou au trimère 5+, et la plus grande abondance de certains fragments de faible masse, ce qui laisse penser que l'énergie vibrationnelle déposée par l'ion carbone est encore plus élevée que dans le cas de la triple hélice. En effet, il est peu probable que les différences de charge et d'énergie cinétique de l'ion carbone jouent un rôle ici, au vu des résultats précédents obtenus par le groupe de L. Tribedi sur l'irradiation de nucléobases de l'ADN par des ions carbonés dans les états de charge 4+, 5+ et 6+ dans la même gamme d'énergie cinétique.¹⁸⁴ Cela va dans le sens de notre hypothèse, mais pour aller plus loin, il serait intéressant de mesurer le nombre d'électrons émis par collision en fonction du système moléculaire. En effet, à cette énergie cinétique, un électron est émis chaque fois que l'ion interagit avec un électron du système, donc ce nombre devrait augmenter avec la taille du système. Cependant, ce sont des expériences délicates à mettre en place, car pour l'instant, détecter les électrons émis de molécules irradiées n'a été possible qu'avec des faisceaux croisés, jamais pour des ions moléculaires dans des pièges RF. La raison principale est la trajectoire erratique des électrons due au champ électrique du piège, compliquant énormément leur détection.

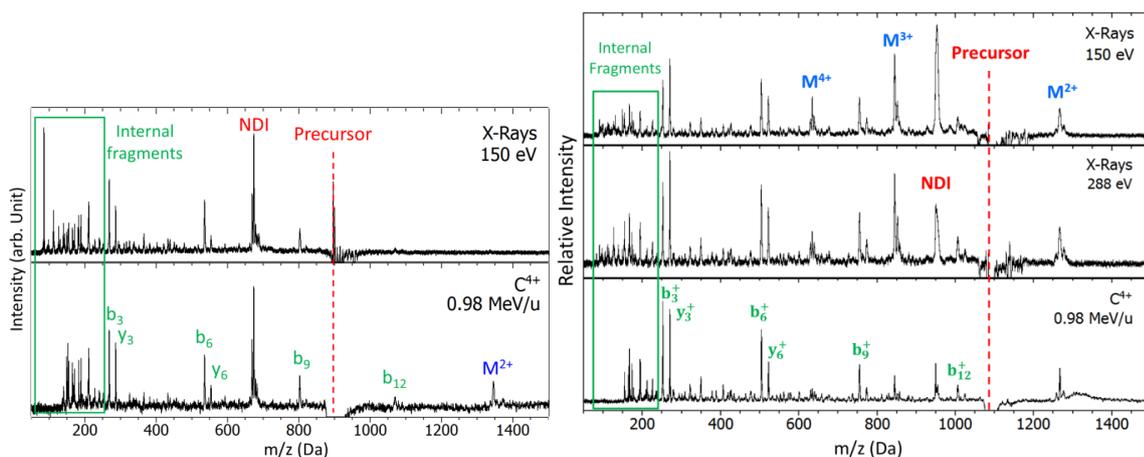


Figure 49 : spectres de masse après absorption d'un photon X et irradiation par un faisceau d'ions carbone du peptide isolé $[(\text{POG})_{10}+3\text{H}]^{3+}$ (à gauche) et de la triple hélice $[(\text{PPG})_{10}3+7\text{H}]^{7+}$ (à droite).

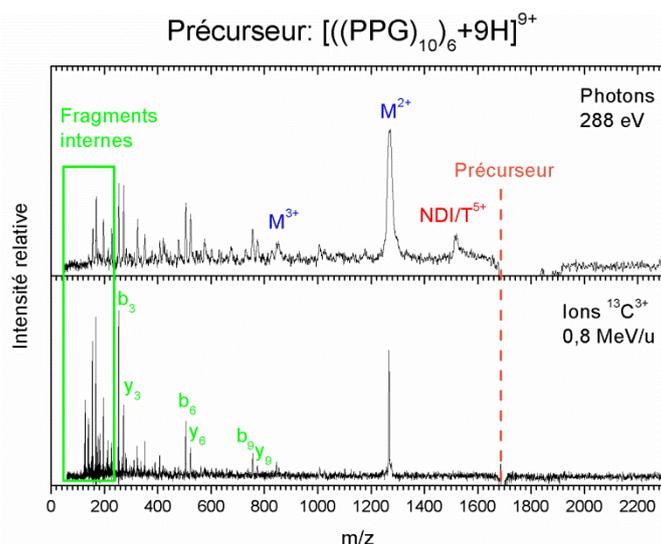


Figure 50 : spectres de masse de l'hexamère $[(PPG)_{10}_6 + 9H]^{9+}$ après collision avec un ion carbone ou absorption d'un photon X. M et T désignent le monomère et trimère du peptide $(PPG)_{10}$, respectivement, et NDI l'ionisation non-dissociative.

Nous avons donc vu que l'irradiation des agrégats des peptides $(PPG)_{10}$ et $(POG)_{10}$ mène systématiquement aux fragments b_{3n}^+ et y_{3n}^+ , issus de la rupture des liaisons peptidiques Glycine-Proline, quelle que soit la taille de l'agrégat ou la nature du rayonnement ionisant (photon ou ion carbone), pourvu que la fragmentation soit présente. Ce site préférentiel de rupture se retrouve aussi en solution, il est donc possible que ce soit une propriété intrinsèque du collagène sous irradiation, et que les peptides PPG soient formés lors d'une radiothérapie ou hadronthérapie. Dans un projet en cours, nos collègues radiobiologistes du laboratoire vont mesurer la toxicité cellulaire de ces peptides : en effet, il se peut qu'ils constituent pour les cellules des facteurs de stress indirect radio-induits, ce qui serait une explication de certains effets secondaires de la radiothérapie, comme l'arthrose.

III) Perspectives

Ces dernières années, notamment dans le cadre de la thèse de M. Abdelmouleh,¹¹¹ nous avons continué nos études sur les complexes non-covalents sous irradiation, notamment ceux impliquant la vancomycine, un antibiotique de dernier recours contre des infections dues aux bactéries Gram-positives. En plus d'être d'intérêt pharmaceutique, le complexe de la vancomycine avec son récepteur est un modèle de la reconnaissance moléculaire spécifique, un phénomène crucial en biologie. Nous avons ainsi montré que la fragmentation du complexe déprotoné après détachement d'électron était radicalement différente de celle du complexe protoné après ionisation.¹⁸⁵ En particulier, le complexe déprotoné, qui conserve sa structure native en phase gazeuse, peut garder ses liaisons non-covalentes après détachement d'électron. Ces travaux ont aussi abouti à une découverte inattendue : le spectre de masse de la vancomycine après photoabsorption X comporte une série de pics attribués à des fragments provenant de groupements issus des modifications post-traductionnelles (MPT) subies par la vancomycine lors de sa synthèse. Ces modifications sont essentielles au fonctionnement des protéines ; elles consistent à ajouter ou enlever des groupements chimiques ou des liaisons covalentes. Un exemple dont j'ai déjà parlé dans ce chapitre est l'hydroxylation de la proline dans le collagène. Les MPT de la vancomycine sont particulièrement complexes, et ce type de MPT est délicat à détecter et quantifier dans les protéines. Cette série de pics dans le spectre de la vancomycine constitue une signature spectrale des MPT complexes, car elle est présente et quasiment inchangée quels que soient l'énergie du photon X dans la gamme 100 – 531.5 eV ou l'environnement moléculaire de la

vancomycine. Par conséquent, la photoabsorption X pourrait devenir un outil de caractérisation des MPT complexes des protéines.¹⁸⁶ Nous nous intéressons aussi à un autre antibiotique, la rifamycine, et avons récemment mis en évidence un phénomène inédit de transfert de sodium intramoléculaire photo-induit.¹⁷⁸ Ce processus pourrait constituer un nouveau type d'endommagement radio-induit, notamment en ce qui concerne les enzymes Na^+/K^+ - ATPase, qui servent de canal ionique transmembranaires, et dont le fonctionnement serait sans doute perturbé par un transfert de sodium.¹⁸⁷

Plus récemment, nous avons commencé à nous intéresser à l'irradiation de l'ADN par des rayonnements ionisants, car c'est un point crucial en radiothérapie. En effet, pour expliquer l'efficacité de cette technique, on invoque généralement un mécanisme qui implique la fragmentation d'un ou deux brins d'ADN composant les chromosomes des cellules cancéreuses, ces cassures simple ou double brins provoquant la mort cellulaire. La probabilité de cette dernière augmente lorsque des ions comme des protons ou des carbones sont utilisés à la même dose que les rayons X, la raison avancée étant l'augmentation de la densité d'ionisation et donc des cassures double brins, ce qui rend plus difficile le travail de réparation de l'ADN par la cellule.^{188,189} Un grand nombre d'études ont été menées en phase condensée, notamment par le groupe d'E. Sage,¹⁹⁰ mais les effets directs et indirects ne peuvent être totalement découplés, c'est pourquoi nous nous concentrons sur l'irradiation d'ADN en phase gazeuse. Dans une publication récente,¹⁹¹ en collaboration avec le groupe de T. Schlathölter, nous avons étudié la photoionisation d'oligonucléotides et de quadruplexes de guanine (une structure géométrique particulière typique des télomères) après absorption d'un photon VUV, et montré que la charge positive créée migre vers les sites riches en guanine avant que l'ion ne fragmente, donc probablement à l'échelle de la picoseconde. Pour le confirmer, nous travaillons à la réalisation de mesures pompe-sonde au moyen de lasers à électrons libres (voir le chapitre suivant). Nous sommes également en train d'explorer, dans le cadre de la thèse de Min Liu, les effets des rayonnements ionisants sur la double hélice de l'ADN : nous avons très récemment mené une série d'expériences sur la ligne IRRSUD du GANIL, où nous avons obtenu des données sur l'irradiation par des ions carbones.

Une autre perspective de ces recherches est le développement d'un montage expérimental au laboratoire, dans lequel des ions biomoléculaires sont produits par une source électrospray, accumulés dans un piège de Paul, extraits et guidés jusqu'à une zone d'interaction, où ils croisent à 90° un faisceau d'ions monochargés à quelques keV d'énergie cinétique issu d'une source ECR.⁴⁷ Ce type de configuration est très intéressant car il permet de mesurer la position des fragments moléculaires issus de l'interaction grâce à des détecteurs à lignes à retard, et donc en principe d'avoir des informations sur leur vecteur vitesse et leur état électronique avant séparation (voir le Chapitre 1). Par contre, le taux de comptage est très bas (de l'ordre de 4 Hz), et le signal est pollué par les ions fragments positifs formés après CID des ions moléculaires ou ionisation du gaz résiduel. Une approche que nous explorons actuellement consiste à étudier des ions moléculaires négatifs : la section efficace de capture d'électron est plus grande et les pollutions devraient être bien moins intenses. Par contre, le courant d'ions fourni par la source électrospray est bien plus faible, mais cela devrait pouvoir être compensé par une durée d'injection dans le piège plus grande.

Chapitre 6 : Conclusion

Tout au long de ce manuscrit, nous avons vu que l'on peut obtenir des informations sur les processus intrinsèques radio-induits dans des systèmes moléculaires d'intérêt biologique, grâce à l'analyse du rapport m/z des espèces moléculaires ioniques formées par l'interaction avec des rayonnements ionisants tels que des photons, des électrons ou des ions. De plus, les techniques de spectrométrie de masse permettent de sélectionner un seul ion précurseur avant de l'irradier, et ainsi contrôler l'état de charge de l'ion moléculaire cible, mais aussi, le cas échéant, le nombre de molécules neutres environnant celui-ci. Si ces techniques ont permis un développement considérable du domaine, elles ont des limitations : par exemple, les espèces neutres issues de la collision sont très rarement détectées, car cela nécessite de les accélérer suffisamment pour qu'elles produisent un signal sur des galettes à micro-canaux par exemple, et de les séparer des ions, comme dans le montage Arc-en-ciel développé au laboratoire des collisions atomiques et moléculaires d'Orsay (aujourd'hui faisant partie de l'ISMO), qui a été utilisé notamment pour l'analyse de la photofragmentation UV d'acides aminés et de peptides protonés.¹⁹²⁻¹⁹⁴ Toutefois, lorsque l'ion précurseur est multichargé, l'irradiation crée souvent des fragments complémentaires chargés qui peuvent être détectés.

Une autre limite de la seule détection du rapport m/z des ions formés par la collision est l'impossibilité de savoir si une liaison covalente a été brisée dans le cas où les fragments restent liés de manière non-covalente... Ce phénomène a notamment été observé pour des protéines après capture d'électron, et a été attribué aux barrières d'énergie très basses pour la fragmentation de radicaux.¹⁹⁵ Comme l'éjection d'électrons peut aussi créer des radicaux, il serait intéressant d'explorer cette possibilité, par exemple en sélectionnant un produit ionique donné après irradiation d'un ion moléculaire (par exemple en l'isolant dans un piège à ions RF), puis en le soumettant à des collisions de basse énergie avec un gaz inerte, comme je l'ai fait pour les tripeptides protonés (voir le Chapitre 4). L'augmentation de l'énergie vibrationnelle devrait alors rompre les liaisons non-covalentes et séparer les fragments préalablement créés par le rayonnement ionisant. Cette méthode pourrait également servir dans le cas de systèmes hautement nanosolvatés, pour lesquels la fragmentation n'est pas toujours visible étant donné le grand nombre de degrés de liberté du système dans lesquels l'énergie vibrationnelle en excès peut être redistribuée. De même, avec le rapport m/z seul, il est impossible de savoir si des liaisons covalentes ont été *créées* dans le système (« cross-linking »), notamment après ionisation non-dissociative. Une solution pourrait être de partir d'un complexe non-covalent tel que la triple hélice du collagène (voir le Chapitre 5), de sélectionner le complexe ionisé intact, et de le soumettre à des collisions de basse énergie avec un gaz inerte. Si des liaisons covalentes intermoléculaires sont présentes, le spectre de masse devrait être radicalement différent du cas où seules des liaisons non-covalentes relient les molécules (voir la Figure 37). Aucune étude n'a pour l'instant mis en évidence ce phénomène de cross-linking en phase gazeuse, ce qui serait un moyen d'évaluer l'influence du solvant sur ce phénomène.

Une autre limite de la spectrométrie de masse comme méthode unique d'analyse des processus radio-induits est l'absence d'information sur la structure géométrique du système. Or cette structure est intimement liée à la fonction biologique de la plupart des biomolécules. Nous avons vu au Chapitre 5 que la spectrométrie de mobilité ionique permet de sonder cette structure, c'est pourquoi un de mes projets actuels est de l'utiliser pour analyser les changements de conformation radio-induits : j'en parlerai plus en détail dans le chapitre suivant. J'exposerai également une autre direction de recherche : la mesure de durées typiques des processus radio-induits dans des biomolécules sélectionnées en m/z dans un piège à ions.

Chapitre 7 : De nouvelles observables grâce à de nouveaux outils expérimentaux

Dans les chapitres précédents, j'ai présenté certains de mes travaux visant plus de pertinence biologique dans l'étude des processus radio-induits dans des systèmes moléculaires en phase gazeuse. J'ai notamment parlé des efforts faits pour étudier des systèmes comme les protéines et l'ADN, grâce aux sources électrospray, aux pièges à ions et aux techniques de spectrométrie de masse et de mobilité ionique. À présent, je vais présenter deux projets qui ont pour but d'aller vers l'observation de nouvelles grandeurs physiques sur ces mêmes systèmes, grâce à ces techniques.

I) Mesure résolue en temps de processus radio-induits : expériences pompe-sonde couplant XFEL et piège à ions

Dans ce manuscrit, je n'ai présenté que très peu de mesures qui comportent des informations sur les durées typiques des processus radio-induits dans les systèmes moléculaires d'intérêt biologique isolés. Comme les rayonnements ionisants induisent généralement une émission d'électron et donc la création d'une charge positive dans le système, il est naturel de s'intéresser à la vitesse à laquelle cette charge bouge après l'ionisation. De plus, la spectrométrie de masse permet d'associer une durée de transfert de charge avec une voie de fragmentation, ce qui est impossible en phase condensée. De telles expériences ont été réalisées relativement récemment grâce au couplage entre lasers femtosecondes et spectrométrie de masse, et via la méthode pompe/sonde. Le principe général de cette méthode est le suivant : une première impulsion laser excite le système à un instant t_0 , et une seconde impulsion envoyée à l'instant $t_0 + \Delta t$ sonde sa désexcitation. En faisant varier Δt et en mesurant une grandeur sensible à l'excitation (par exemple l'intensité d'un fragment donné), on peut mesurer le temps caractéristique du processus de désexcitation. Le groupe de J. Greenwood, avec qui j'ai collaboré sur l'irradiation de nucléosides par un faisceau de protons (voir la partie II) du Chapitre 2), ont utilisé cette méthode pour faire des mesures résolues en temps sur des briques élémentaires des molécules d'intérêt biologique, notamment sur des nucléobases de l'ADN/ARN et des nucléosides neutres, mises en phase gazeuse par une source à désorption laser.^{69,70} Dans ce cas, l'impulsion pompe a une durée de 2 fs et s'étale en énergie sur la gamme 17 – 40 eV, et provient d'un laser Ti-Sa focalisé dans un jet d'argon. Cette impulsion provoque l'ionisation de la molécule, qui peut ensuite fragmenter, et les ions créés sont analysés par un spectromètre de masse à temps de vol. Après un certain délai, une impulsion sonde est envoyée : elle provient du laser Ti-Sa (longueur d'onde moyenne : 750 nm, durée : 4 fs). La Figure 51 montre que le spectre de masse dépend alors du délai entre les impulsions pompe et sonde, ce qui a été interprété comme l'existence de processus de désexcitation ultra-rapide (de l'ordre de 100 fs au maximum) des états excités de l'ion moléculaire créés par l'impulsion pompe. Des processus encore plus brefs (délocalisation électronique) ont été mis en évidence dans des acides aminés grâce à des impulsions laser attosecondes.¹⁹⁶⁻¹⁹⁸ Celles-ci ont d'ailleurs, ces dernières années, donné naissance à un nouveau domaine de recherche appelé « Science attoseconde », au vu des avancées considérables dans la compréhension des processus physiques et chimiques élémentaires se produisant immédiatement après excitation de la matière.¹⁹⁹ Ces résultats montrent que cette méthode permet d'accéder à des informations temporelles relatives à l'ionisation d'un système moléculaire. Cependant, les méthodes thermiques de mise en phase gazeuse ne permettent pas d'étudier des systèmes tels que les peptides, protéines ou brins d'ADN (voir le Chapitre 1), il faut donc utiliser une source « douce » telle que l'électrospray, dont j'ai largement parlé dans les chapitres précédents. Par contre, la densité de molécules est bien plus basse, une solution est alors par exemple d'utiliser un piège à ions pour obtenir un signal lié à l'interaction avec le rayonnement ionisant, comme je l'ai montré dans le

Chapitre 5. Grâce à ces techniques, le groupe de T. Schalthölder a publié en 2014 l'étude d'un peptide protoné par la méthode pompe-sonde avec un laser femtoseconde.²⁰⁰ Ils ont détecté une variation de l'abondance de tous les ions en fonction du délai pompe-sonde, ce qui constitue une preuve de la faisabilité de l'expérience. La prochaine étape est alors d'utiliser la haute énergie de photon, la structure temporelle particulière et la puissance des lasers à électrons libres pour sonder temporellement les processus radio-induits dans les systèmes moléculaires d'intérêt biologique : plusieurs difficultés techniques doivent être surmontées, notamment l'alignement des deux faisceaux laser de 50 μm de diamètre au centre du piège, et la détermination de l'instant $t = 0$ où les deux impulsions sont superposées temporellement. Pour cette dernière, une méthode est de détecter le maximum du signal de photoionisation de l'hélium injecté dans le piège : d'abord, une impulsion pompe VUV à 24 eV excite l'atome He dans un état de Rydberg, puis il est ionisé par une impulsion sonde IR à 1,5 eV. En collaboration avec le groupe de T. Schalthölder, et dans le cadre du GDR XFEL du CNRS, nous avons mené une première expérience au XFEL FLASH (centre DESY, Hambourg) en 2020 sur un complexe non-covalent composé d'oligonucléotides d'ADN et détecté une variation d'un fragment du spectre de masse en fonction du délai entre la pompe (une impulsion VUV de 24 eV et 100 fs) et la sonde (une impulsion IR de 800 nm et 100 fs). Le temps caractéristique est de l'ordre de 0,5 ns, ce qui peut correspondre à une fragmentation rapide, mais probablement dans l'état fondamental électronique du système. Ce résultat préliminaire est encourageant, et nous allons poursuivre nos efforts dans ce sens.

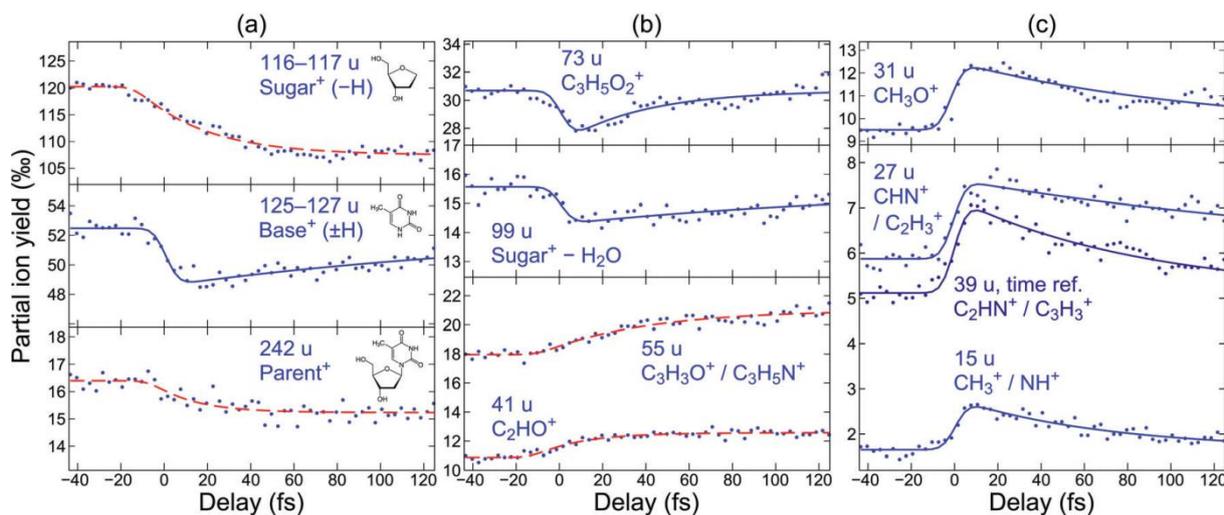


Figure 51 : abondance relative de fragments ioniques créés par l'irradiation de la thymidine par deux impulsions laser femtosecondes, en fonction du délai entre ces deux impulsions. La masse et la composition des ions sont indiquées. Figure extraite de la référence⁶⁹.

II) Dénaturation radio-induite de brins d'ADN et protéines : expériences couplant la spectrométrie de mobilité ionique et les rayonnements ionisants

La structure géométrique des systèmes moléculaires biologiques est intimement liée à leur fonction dans l'organisme. Par exemple, la triple hélice du collagène (dont j'ai largement parlé au Chapitre 5) est à la base des propriétés mécaniques essentielles de tissus tels que la peau, les os, les ongles ou encore le cartilage. De plus, les structures complémentaires d'un antibiotique et son récepteur sont responsables de leur reconnaissance moléculaire spécifique et donc de l'efficacité et du ciblage de ces médicaments. Enfin, l'information génétique est conservée et transmise grâce à la structure en double hélice de l'ADN, mais ses mutations peuvent engendrer des maladies graves. Par conséquent, il est

crucial d'étudier la stabilité de ces structures sous l'influence de facteurs de perturbation extérieurs tels que les changements de température ou d'environnement chimique, ou encore les rayonnements ionisants. La dénaturation de certaines protéines ou de la double hélice de l'ADN après chauffage, c'est-à-dire la perte de leur activité due à un changement structural, en est un exemple connu. Par contre, les effets moléculaires structuraux de l'irradiation par des rayonnements ionisants ont été beaucoup moins étudiés, malgré leur importance fondamentale et leur implication potentielle dans les mécanismes sous-jacents en radio- et hadronthérapie. La plupart des travaux visant à obtenir les propriétés intrinsèques de ces systèmes biologiques se sont en effet concentrés sur l'étude de l'ionisation et la fragmentation, notamment grâce à l'utilisation de techniques expérimentales de spectrométrie de masse (voir le Chapitre 5). Cependant, la spectrométrie de masse seule ne permet pas de détecter les changements de structure géométrique pour des systèmes moléculaires en phase gazeuse. Un moyen de remédier à cela serait d'utiliser la spectrométrie de mobilité ionique, une technique dont j'ai parlé au 0 et au Chapitre 5. Il serait alors possible de poursuivre ces travaux en étudiant la structure des protéines, en commençant par le collagène, que nous connaissons bien, puis en s'intéressant à d'autres protéines dont la structure est connue en phase gazeuse comme le cytochrome C ou l'ubiquitine mais dont les effets structuraux des radiations ionisantes sont encore à explorer.^{144,201} Le montage expérimental dédié à ces études pourrait s'inspirer de celui développé par le groupe de P. Dugourd, schématisé dans la Figure 33, et que nous avons utilisé pour sonder la structure et la stabilité de peptides modèles du collagène (voir la partie I) du Chapitre 5). Par contre, il faudrait insérer un piège de Paul entre les tubes de mobilité pour permettre l'irradiation des ions moléculaires, et prévoir des multi-pôles pour guider les ions dans les deux chambres à vide nécessaires au pompage différentiel entre tubes de mobilité et piège de Paul. Il est important que ce montage soit suffisamment compact pour être transporté dans différentes grandes installations telles que les accélérateurs d'ions (GANIL à Caen), les synchrotrons (BESSY2 à Berlin, SOLEIL à St Aubin, PETRA3 à Hambourg...) ou les lasers à électrons libres (FLASH ou EuXFEL à Hambourg), et ainsi comparer les effets de la nature et de l'énergie du rayonnement ionisant. Un autre intérêt des nouvelles expériences réside dans la potentielle existence d'une signature de dépliement des biomolécules, telle que celle produite par l'activation après collision avec du gaz inerte.²⁰² En chimie analytique, cette signature permet d'identifier des structures particulières de protéines ou d'ADN. Les rayonnements ionisants pourraient étendre les possibilités de cette technique, puisque l'on a vu par exemple pour la triple hélice du collagène que ceux-ci permettent de déposer plus d'énergie interne dans le système par rapport aux collisions de basse énergie, et d'ouvrir de nouvelles voies de fragmentation. Après l'identification et la quantification des modifications post-traductionnelles des protéines par photoabsorption X (voir le Chapitre 5), cela confirme le potentiel de nos recherches en chimie analytique pour la biologie.

Références

- (1) Sprengel, H. III. Researches on the Vacuum. *Journal of the chemical society* **1865**, *18*, 9–21.
- (2) Smith, L. Ionization and Dissociation of Polyatomic Molecules by Electron Impact I Methane. *PHYSICAL REVIEW* **1937**, *51* (4), 263–275. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.51.263>.
- (3) Bohrer, B. C.; Clemmer, D. E. Shift Reagents for Multidimensional Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry Analysis of Complex Peptide Mixtures: Evaluation of 18-Crown-6 Ether Complexes. *Analytical Chemistry* **2011**, *83* (13), 5377–5385. <https://doi.org/10.1021/ac200892r>.
- (4) Pouilly, J.-C. Spectroscopie IR et spectrométrie de mobilité ionique appliquées aux structures de systèmes chargés isolés d'intérêt pharmaceutique, Université Paris 13, 2009.
- (5) Golan, A.; Bravaya, K. B.; Kudirka, R.; Kostko, O.; Leone, S. R.; Krylov, A. I.; Ahmed, M. Ionization of Dimethyluracil Dimers Leads to Facile Proton Transfer in the Absence of Hydrogen Bonds. *Nature Chemistry* **2012**, *4*, 323–329.
- (6) Tsujii, H.; Kamada, T.; Shirai, T.; Noda, K.; Tsuji, H.; Karasawa, K. *Carbon-Ion Radiotherapy: Principles, Practices, and Treatment Planning*; Springer Japan, 2014.
- (7) Serrano, B.; Hachem, A.; Franchisseur, E.; Héroult, J.; Marcié, S.; Costa, A.; Bensadoun, R. J.; Barthe, J.; Gérard, J. P. Monte Carlo Simulation of a Medical Linear Accelerator for Radiotherapy Use. *Radiation Protection Dosimetry* **2006**, *119* (1–4), 506–509. <https://doi.org/10.1093/rpd/nci620>.
- (8) Kraan, A. C. Range Verification Methods in Particle Therapy: Underlying Physics and Monte Carlo Modeling. *Frontiers in Oncology* **2015**, *5*, 150. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00150>.
- (9) Stolterfoht, N.; Dubois, R.; Rivarola, R. D. *Electron Emission in Heavy Ion-Atom Collisions*; Springer Series on Atomic, Optical, and Plasma Physics; Springer, 1997; Vol. 20.
- (10) Chen, L.; Martin, S.; Bernard, J.; Bredy, R. Direct Measurement of Internal Energy of Fragmented C-60. *PHYSICAL REVIEW LETTERS* **2007**, *98* (19). <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.98.193401>.
- (11) Kim, H. K.; Gassert, H.; Schoeffler, M. S.; Titze, J. N.; Waitz, M.; Voigtsberger, J.; Trinter, F.; Becht, J.; Kalinin, A.; Neumann, N.; Zhou, C.; Schmidt, L. P. H.; Jagutzki, O.; Czasch, A.; Merabet, H.; Schmidt-Boecking, H.; Jahnke, T.; Cassimi, A.; Doerner, R. Ion-Impact-Induced Interatomic Coulombic Decay in Neon and Argon Dimers. *Physical Review A* **2013**, *88*.
- (12) Hergenbahn, U. Interatomic and Intermolecular Coulombic Decay: The Early Years. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **2011**, *184* (3), 78–90. <https://doi.org/10.1016/j.elspec.2010.12.020>.
- (13) Larsson, M. O.; Hvelplund, P.; Larsen, M. C.; Shen, H.; Cederquist, H.; Schmidt, H. T. Electron Capture and Energy Loss in 100 KeV Collisions of Atomic and Molecular Ions on C60. *International Journal of Mass Spectrometry* **1998**, *177*, 51.
- (14) Kamalou, O.; Manil, B.; Lebius, H.; Rangama, J.; Huber, B. A.; Hvelplund, P.; Tomita, S.; Jensen, J.; Schmidt, H. T.; Zettergren, H.; Cederquist, H. Fullerene Collisions and Clusters of Fullerenes. *International Journal of Mass Spectrometry* **2006**, *252*, 117.
- (15) Hathiramani, D.; Aichele, K.; Arnold, W.; Huber, K.; Salzborn, E.; Scheier, P. Electron-Impact Induced Fragmentation of Fullerene Ions. *Physical Review Letters* **2000**, *85*, 3604–3607.
- (16) Gatchell, M.; Rousseau, P.; Domaracka, A.; Stockett, M. H.; Chen, T.; Schmidt, H. T.; Chesnel, J. Y.; Mery, A.; Maclot, S.; Adoui, L.; Huber, B. A.; Zettergren, H.; Cederquist, H. Ions Colliding with Mixed Clusters of C-60 and Coronene: Fragmentation and Bond Formation. *Physical Review A* **2014**, *90*.
- (17) Capron, M.; Diaz-Tendero, S.; Maclot, S.; Domaracka, A.; Lattouf, E.; Lawicki, A.; Maisonnay, R.; Chesnel, J.-Y.; Mery, A.; Pouilly, J.-C.; Rangama, J.; Adoui, L.; Martin, F.; Alcami, M.; Rousseau, P.; Huber, B. A. A Multicoincidence Study of Fragmentation Dynamics in Collision of Gamma-Aminobutyric Acid with Low-Energy Ions. *Chemistry-a European Journal* **2012**, *18* (30), 9321–9332. <https://doi.org/10.1002/chem.201103922>.
- (18) Bari, S.; Sobocinski, P.; Postma, J.; Alvarado, F.; Hoekstra, R.; Bernigaud, V.; Manil, B.; Rangama, J.; Huber, B.; Schlathoelter, T. Fragmentation of Alpha- and Beta-Alanine Molecules by Ions at

- Bragg-Peak Energies. *Journal of Chemical Physics* **2008**, *128* (7), 074306.
<https://doi.org/10.1063/1.2830032>.
- (19) Schlatholter, T.; Alvarado, F.; Bari, S.; Lecointre, A.; Hoekstra, R.; Bernigaud, V.; Manil, B.; Rangama, J.; Huber, B. Ion-Induced Biomolecular Radiation Damage: From Isolated Nucleobases to Nucleobase Clusters. *Chemphyschem* **2006**, *7* (11), 2339–2345.
<https://doi.org/10.1002/cphc.200600361>.
- (20) Maclot, S.; Grzegorz Piekarski, D.; Domaracka, A.; Mery, A.; Vizcaino, V.; Adoui, L.; Martin, F.; Alcami, M.; Huber, B. A.; Rousseau, P.; Diaz-Tendero, S. Dynamics of Glycine Dications in the Gas Phase: Ultrafast Intramolecular Hydrogen Migration versus Coulomb Repulsion. *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 3903–3909.
- (21) A Le Padellec and P Moretto-Capelle and M Richard-Viard and J P Champeaux and P Cafarelli. Ionization and Fragmentation of DNA, RNA Bases Induced by Proton Impact. *Journal of Physics: Conference Series* **2008**, *101* (1), 012007.
- (22) Maclot, S.; Delaunay, R.; Piekarski, D. G.; Domaracka, A.; Huber, B. A.; Adoui, L.; Martin, F.; Alcami, M.; Avaldi, L.; Bolognesi, P.; Diaz-Tendero, S.; Rousseau, P. Determination of Energy-Transfer Distributions in Ionizing Ion-Molecule Collisions. *Physical Review Letters* **2016**, *117* (7), 073201. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.117.073201>.
- (23) Bredy, R.; Bernard, J.; Chen, L.; Wei, B.; Salmoun, A.; Bouchama, T.; Buchet-Poulizac, M.; Martin, S. Fragmentation of Adenine Induced by Collision with Slow F₂⁺ Ions. *NUCLEAR INSTRUMENTS & METHODS IN PHYSICS RESEARCH SECTION B-BEAM INTERACTIONS WITH MATERIALS AND ATOMS* **2005**, *235*, 392–396. <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2005.03.212>.
- (24) Brédy, R.; Bernard, J.; Chen, L.; Montagne, G.; Li, B.; Martin, S. Fragmentation of Adenine under Energy Control. *J. Chem. Phys.* **2009**, *130* (11), 114305. <https://doi.org/10.1063/1.3080162>.
- (25) Bari, S.; Hoekstra, R.; Schlatholter, T. Peptide Fragmentation by KeV Ion-Induced Dissociation. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, *12* (14), 3376–3383.
<https://doi.org/10.1039/b924145k>.
- (26) Bari, S.; Gonzalez-Magana, O.; Reitsma, G.; Werner, J.; Schippers, S.; Hoekstra, R.; Schlatholter, T. Photodissociation of Protonated Leucine-Enkephalin in the VUV Range of 8-40 eV. *Journal of Chemical Physics* **2011**, *134* (2), 024314. <https://doi.org/10.1063/1.3515301>.
- (27) ABAKUMOV, G.; POLYAKOV, B.; SIMONOV, A.; TCHUIKO, L.; YAROSLAVTZEVA, V. STEPWISE PHOTO-IONIZATION OF COMPLEX ORGANIC-MOLECULES IN THE GAS-PHASE INDUCED BY UV LASER-RADIATION. *APPLIED PHYSICS B-PHOTOPHYSICS AND LASER CHEMISTRY* **1982**, *27* (1), 57–61. <https://doi.org/10.1007/BF00697297>.
- (28) Grotemeyer, J.; Bosel, U.; Walter, K.; Schlag, E. W. Biomolecules In The Gas-Phase .1. Multiphoton-Ionization Mass-Spectrometry Of Native Chlorophylls. *Journal of the American Chemical Society* **1986**, *108*, 4233–4234.
- (29) Jochims, H. W.; Schwell, M.; Chotin, J. L.; Clemino, M.; Dulieu, F.; Baumgärtel, H.; Leach, S. Photoion Mass Spectrometry of Five Amino Acids in the 6-22 eV Photon Energy Range. *Chemical Physics* **2004**, *298*, 279–297.
- (30) Jochims, H. W.; Schwell, M.; Baumgärtel, H.; Leach, S. Photoion Mass Spectrometry of Adenine, Thymine and Uracil in the 6-22 eV Photon Energy Range. *Chemical Physics* **2005**, *314*, 263–282.
- (31) Pouilly, J. C.; Schermann, J. P.; Nieuwjaer, N.; Lecomte, F.; Gregoire, G.; Desfrancois, C.; Garcia, G. A.; Nahon, L.; Nandi, D.; Poisson, L.; Hochlaf, M. Photoionization of 2-Pyridone and 2-Hydroxypyridine. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, *12* (14), 3566–3572.
<https://doi.org/10.1039/b923630a>.
- (32) Itälä, E.; Huels, M. A.; Rachlew, E.; Kooser, K.; Hagerth, T.; Kukk, E. A Comparative Study of Dissociation of Thymidine Molecules Following Valence or Core Photoionization. *J. Phys. B-At. Mol. Opt. Phys.* **2013**, *46*.
- (33) Arachchilage, A. P. W.; Wang, F.; Feyer, V.; Plekan, O.; Prince, K. C. Correlation of Electronic Structures of Three Cyclic Dipeptides with Their Photoemission Spectra. *The Journal of Chemical Physics* **2010**, *133* (17), 174319.

- (34) Budnik, B. A.; Zubarev, R. A. MH₂⁺center Dot Ion Production from Protonated Polypeptides by Electron Impact: Observation and Determination of Ionization Energies and a Cross-Section. *Chemical Physics Letters* **2000**, *316*, 19–23.
- (35) Milosavljevic, A. R.; Nicolas, C.; Lemaire, J.; Dehon, C.; Thissen, R.; Bizau, J.-M.; Refregiers, M.; Nahon, L.; Giuliani, A. Photoionization of a Protein Isolated in Vacuo. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2011**, *13* (34), 15432–15436. <https://doi.org/10.1039/c1cp21211g>.
- (36) Milosavljevic, A. R.; Nicolas, C.; Rankovic, M. L. J.; Canon, F.; Miron, C.; Giuliani, A. K-Shell Excitation and Ionization of a Gas-Phase Protein: Interplay between Electronic Structure and Protein Folding. *Journal of Physical Chemistry Letters* **2015**, *6* (16), 3132–3138. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.5b01288>.
- (37) Milosavljevic, A. R.; Canon, F.; Nicolas, C.; Miron, C.; Nahon, L.; Giuliani, A. Gas-Phase Protein Inner-Shell Spectroscopy by Coupling an Ion Trap with a Soft X-Ray Beamline. *Journal of Physical Chemistry Letters* **2012**, *3* (9), 1191–1196. <https://doi.org/10.1021/jz300324z>.
- (38) Bockova, J.; Rebelo, A.; Ryszka, M.; Pandey, R.; da Fonseca Cunha, T.; Limao-Viena, P.; Mason, N. J.; Pouilly, J. C.; Eden, S. Mapping the Complex Metastable Fragmentation Pathways of Excited 3-Aminophenol(+). *International Journal of Mass Spectrometry* **2019**, *442*, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2019.05.006>.
- (39) Solano, E. A.; Mayer, P. M. A Complete Map of the Ion Chemistry of the Naphthalene Radical Cation? DFT and RRKM Modeling of a Complex Potential Energy Surface. *J. Chem. Phys.* **2015**, *143* (10), 104305. <https://doi.org/10.1063/1.4930000>.
- (40) Bauer, C. A.; Grimme, S. How to Compute Electron Ionization Mass Spectra from First Principles. *J. Phys. Chem. A* **2016**, *120* (21), 3755–3766. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.6b02907>.
- (41) Lopez-Tarifa, P.; du Penhoat, M. A. H.; Vuilleumier, R.; Gaigeot, M. P.; Tavernelli, I.; Le Padellec, A.; Champeaux, J. P.; Alcamí, M.; Moretto-Capelle, P.; Martin, F.; Politis, M. F. Ultrafast Nonadiabatic Fragmentation Dynamics of Doubly Charged Uracil in a Gas Phase. *Physical Review Letters* **2011**, *107*.
- (42) Simon, A.; Champeaux, J.; Rapacioli, M.; Capelle, P.; Gadea, F.; Sence, M. Dissociation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at High Energy: MD/DFTB Simulations versus Collision Experiments. *THEORETICAL CHEMISTRY ACCOUNTS* **2018**, *137* (7). <https://doi.org/10.1007/s00214-018-2287-z>.
- (43) Stuart, S. J.; Tutein, A. B.; Harrison, J. A. A Reactive Potential for Hydrocarbons with Intermolecular Interactions. *J. Chem. Phys.* **2000**, *112* (14), 6472–6486. <https://doi.org/10.1063/1.481208>.
- (44) Qian, C.; Wang, Z.; Xu, X.; Wang, Y.; Zhang, F. Collision Dynamics of Cytosine under Proton Irradiation. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MODERN PHYSICS B* **2021**, *35* (23). <https://doi.org/10.1142/S0217979221502428>.
- (45) Pouilly, J.-C.; Miles, J.; De Camillis, S.; Cassimi, A.; Greenwood, J. B. Proton Irradiation of DNA Nucleosides in the Gas Phase. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2015**, *17* (11), 7172–7180. <https://doi.org/10.1039/c4cp05303f>.
- (46) Erdmann, E.; Aguirre, N.; Indrajith, S.; Chiarinelli, J.; Domaracka, A.; Rousseau, P.; Huber, B.; Bolognesi, P.; Richter, R.; Avaldi, L.; Diaz-Tendero, S.; Alcamí, M.; Labuda, M. A General Approach to Study Molecular Fragmentation and Energy Redistribution after an Ionizing Event. *PHYSICAL CHEMISTRY CHEMICAL PHYSICS* **2021**, *23* (3), 1859–1867. <https://doi.org/10.1039/d0cp04890a>.
- (47) Schwob, L.; Lalande, M.; Chesnel, J.-Y.; Domaracka, A.; Huber, B. A.; Maclot, S.; Pouilly, J.-C.; Rangama, J.; Rousseau, P.; Vizcaino, V.; Adoui, L.; Mery, A. A Tandem Mass Spectrometer for Crossed-Beam Irradiation of Mass-Selected Molecular Systems by KeV Atomic Ions. *Review of Scientific Instruments* **2018**, *89* (4), 043104. <https://doi.org/10.1063/1.5023182>.
- (48) Levola, H.; Kooser, K.; Rachlew, E.; Nommiste, E.; Kukk, E. Fragmentation of Thymidine Induced by Ultraviolet Photoionization and Thermal Degradation. *International Journal of Mass Spectrometry* **2013**, *353*, 7–11.

- (49) Lopez, J. C.; Pena, M. I.; Sanz, M. E.; Alonso, J. L. Probing Thymine with Laser Ablation Molecular Beam Fourier Transform Microwave Spectroscopy. *Journal of Chemical Physics* **2007**, *126* (19), 191103. <https://doi.org/10.1063/1.2735569>.
- (50) Gahlmann, A.; Park, S. T.; Zewail, A. H. Structure of Isolated Biomolecules by Electron Diffraction-Laser Desorption: Uracil and Guanine. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *131*, 2806–2808.
- (51) Bocková, J.; Rebelo, A.; Ryszka, M.; Pandey, R.; Mészáros, D.; Limão-Vieira, P.; Papp, P.; Mason, N. J.; Townsend, D.; Nixon, K. L.; Vizcaino, V.; Pouilly, J.-C.; Eden, S. Thermal Desorption Effects on Fragment Ion Production from Multi-Photon Ionized Uridine and Selected Analogues. *RSC Adv.* **2021**, *11* (34), 20612–20621. <https://doi.org/10.1039/D1RA01873F>.
- (52) Hush, N. S.; Cheung, A. S. Ionization Potentials and Donor Properties of Nucleic Acid Bases and Related Compounds. *Chemical Physics Letters* **1975**, *34* (1), 11–13. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(75\)80190-4](https://doi.org/10.1016/0009-2614(75)80190-4).
- (53) SUKHODUB, L. F.; YANSON, I. K. Mass Spectrometric Studies of Binding Energies for Nitrogen Bases of Nucleic Acids in Vacuo. *Nature* **1976**, *264*, 245–247.
- (54) Weinkauff, R.; Schermann, J. P.; de Vries, M. S.; Kleinerhanns, K. Molecular Physics of Building Blocks of Life under Isolated or Defined Conditions. *European Physical Journal D* **2002**, *20*, 309–316.
- (55) van der Burgt, P. J. M.; Brown, M. A.; Bockova, J.; Rebelo, A.; Ryszka, M.; Pouilly, J.-C.; Eden, S. Fragmentation Processes of Ionized 5-Fluorouracil in the Gas Phase and within Clusters. *European Physical Journal D* **2019**, *73* (8), 184. <https://doi.org/10.1140/epjd/e2019-100107-7>.
- (56) *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69*, National Institute of Standards and Technology.; P.J. Linstrom and W.G. Mallard.
- (57) Ullrich, S.; Schultz, T.; Zgierski, M. Z.; Stolow, A. Electronic Relaxation Dynamics in DNA and RNA Bases Studied by Time-Resolved Photoelectron Spectroscopy. *Phys.Chem.Chem.Phys.* **2004**, *6*, 2796–2801.
- (58) Yamazaki, S.; Taketsugu, T. Nonradiative Deactivation Mechanisms of Uracil, Thymine, and 5-Fluorouracil: A Comparative Ab Initio Study. *Journal of Physical Chemistry A* **2012**, *116* (1), 491–503. <https://doi.org/10.1021/jp206546g>.
- (59) Ligare, M.; Siouri, F.; Bludsky, O.; Nachtigallova, D.; de Vries, M. S. Characterizing the Dark State in Thymine and Uracil by Double Resonant Spectroscopy and Quantum Computation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17* (37), 24336–24341. <https://doi.org/10.1039/C5CP03516C>.
- (60) Barc, B.; Ryszka, M.; Spurrell, J.; Dampc, M.; Limao-Vieira, P.; Parajuli, R.; Mason, N. J.; Eden, S. Multi-Photon Ionization and Fragmentation of Uracil: Neutral Excited-State Ring Opening and Hydration Effects. *The Journal of Chemical Physics* **2013**, *139*, 244311. <https://doi.org/doi:http://dx.doi.org/10.1063/1.4851476>.
- (61) Continetti, R. E. Photoelectron-Photofragment Coincidence Studies of Dissociation Dynamics. *International Reviews in Physical Chemistry* **1998**, *17* (2), 227–260. <https://doi.org/10.1080/014423598230144>.
- (62) Pandey, R.; Ryszka, M.; da Fonseca Cunha, T.; Lalande, M.; Dampc, M.; Limao-Vieira, P.; Mason, N. J.; Pouilly, J. C.; Eden, S. Threshold Behavior in Metastable Dissociation of Multi-Photon Ionized Thymine and Uracil. *Chemical Physics Letters* **2017**, *684*, 233–238. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2017.06.051>.
- (63) Etinski, M.; Marian, C. M. Ab Initio Investigation of the Methylation and Hydration Effects on the Electronic Spectra of Uracil and Thymine. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, *12*, 4915–4923.
- (64) Tsuchiya, Y.; Tamura, T.; Fujii, M.; Ito, M. Keto-Enol Tautomer of Uracil and Thymine. *The Journal of Physical Chemistry* **1988**, *92*, 1760–1765.
- (65) Tabet, J.; Eden, S.; Feil, S.; Abdoul-Carime, H.; Farizon, B.; Farizon, M.; Ouaskit, S.; Märk, T. D. 20-150-KeV Proton-Impact-Induced Ionization of Uracil: Fragmentation Ratios and Branching Ratios for Electron Capture and Direct Ionization. *Physical Review A* **2010**, *81*, 012711.

- (66) Tabet, J.; Eden, S.; Feil, S.; Abdoul-Carime, H.; Farizon, B.; Farizon, M.; Ouaskit, S.; Maerk, T. D. Mass Spectrometry (Fragmentation Ratios) of DNA Base Molecules Following 80 KeV Proton Impact with Separation of Direct Ionization and Electron Capture Processes. *International Journal of Mass Spectrometry* **2010**, *292*, 53–63.
- (67) Ghosh, D.; Golan, A.; Takahashi, L. K.; Krylov, A. I.; Ahmed, M. A VUV Photoionization and Ab Initio Determination of the Ionization Energy of a Gas-Phase Sugar (Deoxyribose). *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 97–101.
- (68) NIST. *NIST Chemistry WebBook*. NIST Standard Reference Database.
- (69) Mansson, E. P.; De Camillis, S.; Castrovilli, M. C.; Galli, M.; Nisoli, M.; Calegari, F.; Greenwood, J. B. Ultrafast Dynamics in the DNA Building Blocks Thymidine and Thymine Initiated by Ionizing Radiation. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2017**, *19* (30), 19815–19821. <https://doi.org/10.1039/c7cp02803b>.
- (70) De Camillis, S.; Miles, J.; Alexander, G.; Ghafur, O.; Williams, I. D.; Townsend, D.; Greenwood, J. B. Ultrafast Non-Radiative Decay of Gas-Phase Nucleosides. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2015**, *17* (36), 23643–23650. <https://doi.org/10.1039/c5cp03806e>.
- (71) Rebelo, A. Investigating Conformation-Dependence in Radiation-Induced Reactions in Isolated Biomolecules and Clusters, Universidade nova de Lisboa, 2021.
- (72) Barc, B.; Ryszka, M.; Pouilly, J.-C.; Al Maalouf, E. J.; el Otell, Z.; Tabet, J.; Parajuli, R.; van der Burgt, P. J. M.; Limao-Vieira, P.; Cahillane, P.; Dampc, M.; Mason, N. J.; Eden, S. Multi-Photon and Electron Impact Ionisation Studies of Reactivity in Adenine-Water Clusters. *International Journal of Mass Spectrometry* **2014**, *365*, 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2014.01.007>.
- (73) Kim, S. K.; Lee, W.; Herschbach, D. R. Cluster Beam Chemistry: Hydration of Nucleic Acid Base; Ionization Potentials of Hydrated Adenine and Thymine. *Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100*, 7933–7937.
- (74) Barth, S.; Oncak, M.; Ulrich, V.; Mucke, M.; Lischke, T.; Slavicek, P.; Hergenbahn, U. Valence Ionization of Water Clusters: From Isolated Molecules to Bulk. *JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY A* **2009**, *113* (48), 13519–13527. <https://doi.org/10.1021/jp906113e>.
- (75) Hwang, C. T.; Stumpf, C. L.; Yu, Y.-Q.; Kenttämaa, H. I. Intrinsic Acidity and Redox Properties of the Adenine Radical Cation. *International Journal of Mass Spectrometry* **1999**, *182–183*, 253–259. [https://doi.org/10.1016/S1387-3806\(98\)14229-X](https://doi.org/10.1016/S1387-3806(98)14229-X).
- (76) Nelson, C. C.; McCloskey, J. A. Collision-Induced Dissociation of Adenine. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 3661.
- (77) Cheong, N. R.; Nam, S. H.; Park, H. S.; Ryu, S.; Song, J. K.; Park, S. M.; Perot, M.; Lucas, B.; Barat, M.; Fayetteon, J. A.; Jouviet, C. Photofragmentation in Selected Tautomers of Protonated Adenine. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2011**, *13*, 291–295.
- (78) Golan, A.; Ahmed, M. Molecular Beam Mass Spectrometry with Tunable Vacuum Ultraviolet (VUV) Synchrotron Radiation. *Journal of visualized experiments : JoVE* **2012**.
- (79) Adoui, L.; Cassimi, A.; Gervais, B.; Grandin, J. P.; Guillaume, L.; Maissonny, R.; Legendre, S.; Tarisien, M.; Lopez-Tarifa, P.; Politis, M. F.; du Penhoat, M. A. H.; Vuilleumier, R.; Gageot, M. P.; Tavernelli, I.; Alcamí, M.; Martin, F. Ionization and Fragmentation of Water Clusters by Fast Highly Charged Ions. *J. Phys. B-At. Mol. Opt. Phys.* **2009**, *42*.
- (80) Maissonny, R.; Capron, M.; Maclot, S.; Pouilly, J. C.; Domaracka, A.; Mery, A.; Adoui, L.; Rousseau, P.; Huber, B. A. Ion Interactions with Pure and Mixed Water Clusters. In *International Conference on Dynamics of Systems on the Nanoscale (dyson 2012)*; 2013; Vol. 438, p UNSP 012007.
- (81) Nam, S. H.; Park, H. S.; Ryu, S.; Song, J. K.; Park, S. M. Photodissociation Dynamics of Adenine Dimer Radical Ions and Hydrated Adenine Dimer Ions, A(2)(+)(H₂O)(n) (N=0-6). *Chemical Physics Letters* **2008**, *450*, 236–242.
- (82) Zhang, A.; Yang, B.; Li, Z. Theoretical Study on the Hydrolytic Deamination Reaction Mechanism of Adenine(H₂O)_n (n = 1 - 4). *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2007**, *819*, 95.

- (83) Wassermann, T. N.; Boyarkin, O. V.; Paizs, B.; Rizzo, T. R. Conformation-Specific Spectroscopy of Peptide Fragment Ions in a Low-Temperature Ion Trap. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23* (6), 1029–1045. <https://doi.org/10.1007/s13361-012-0368-0>.
- (84) Pandey, R.; Lalande, M.; Ryszka, M.; Limao-Vieira, P.; Mason, N. J.; Pouilly, J.-C.; Eden, S. Stabilities of Nanohydrated Thymine Radical Cations: Insights from Multiphoton Ionization Experiments and Ab Initio Calculations. *European Physical Journal D* **2017**, *71* (7), 190. <https://doi.org/10.1140/epjd/e2017-70827-1>.
- (85) Schalley, C. A.; Weis, P. Unusually Stable Magic Number Clusters of Serine with a Surprising Preference for Homochirality. *International Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *221*, 9–19.
- (86) Kim, N. J.; Kim, Y. S.; Jeong, G.; Ahn, T. K.; Kim, S. K. Hydration of DNA Base Cations in the Gas Phase. *International Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *219*, 11–21.
- (87) Cooks, R. G.; Beynon, J. H.; Caprioli, R. M.; Lester, G. R. *Metastable Ions*; Amsterdam, 1973.
- (88) Iskandar, W.; Flechard, X.; Matsumoto, J.; Leredde, A.; Guillous, S.; Hennecart, D.; Rangama, J.; Mery, A.; Gervais, B.; Shiromaru, H.; Cassimi, A. Coulomb Over-the-Barrier Monte Carlo Simulation to Probe Ion-Dimer Collision Dynamics. *Physical Review A* **2018**, *98* (1), 012701. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.98.012701>.
- (89) Hu, Y.; Bernstein, E. R. Vibrational and Photoionization Spectroscopy of Neutral Valine Clusters. *The Journal of Physical Chemistry A* **2009**, *113*, 8454.
- (90) Denifl, S.; Maehr, I.; da Silva, F. F.; Zappa, F.; Märk, T. D.; Scheier, P. Electron Impact Ionization Studies with the Amino Acid Valine in the Gas Phase and (Hydrated) in Helium Droplets. *European Physical Journal D* **2009**, *51*, 73–79.
- (91) Zettergren, H.; Schmidt, H.; Cederquist, H.; Jensen, J.; Tomita, S.; Hvelplund, P.; Lebius, H.; Huber, B. Static Over-the-Barrier Model for Electron Transfer between Metallic Spherical Objects. *PHYSICAL REVIEW A* **2002**, *66* (3). <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.66.032710>.
- (92) Chandezon, F.; Lebius, H.; Tomita, S.; Guet, C.; Pesnelle, A.; Huber, B. A. Energy Transfer in Multi-Ionizing Ion/Cluster Collisions. *Physica Scripta* **2001**, *T92*, 168–170.
- (93) Pouilly, J.-C.; Vizcaino, V.; Schwob, L.; Delaunay, R.; Kocisek, J.; Eden, S.; Chesnel, J.-Y.; Mery, A.; Rangama, J.; Adoui, L.; Huber, B. Formation and Fragmentation of Protonated Molecules after Ionization of Amino Acid and Lactic Acid Clusters by Collision with Ions in the Gas Phase. *Chemphyschem* **2015**, *16* (11), 2389–2396. <https://doi.org/10.1002/cphc.201500275>.
- (94) Tiefenthaler, L.; Oncak, M.; Kollotzek, S.; Kocisek, J.; Scheier, P. Dissociation of Valine Cluster Cations. *Journal of Physical Chemistry A* **2020**, *124* (41), 8439–8445. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.0c07208>.
- (95) Weinberger, N.; Ralser, S.; Renzler, M.; Harnisch, M.; Kaiser, A.; Denifl, S.; Boehme, D. K.; Scheier, P. Ion Formation upon Electron Collisions with Valine Embedded in Helium Nanodroplets. *European Physical Journal D* **2016**, *70* (4), 91. <https://doi.org/10.1140/epjd/e2016-60737-1>.
- (96) Kostko, O.; Bandyopadhyay, B.; Ahmed, M. Vacuum Ultraviolet Photoionization of Complex Chemical Systems. In *Annual Review of Physical Chemistry, Vol 67*; Johnson, M. A., Martinez, T. J., Eds.; 2016; Vol. 67, pp 19–40. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-040215-112553>.
- (97) Castrovilli, M. C.; Markush, P.; Bolognesi, P.; Rousseau, P.; Maclot, S.; Cartoni, A.; Delaunay, R.; Domaracka, A.; Kocisek, J.; Huber, B. A.; Avaldi, L. Fragmentation of Pure and Hydrated Clusters of 5Br-Uracil by Low Energy Carbon Ions: Observation of Hydrated Fragments. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2017**, *19* (30), 19807–19814. <https://doi.org/10.1039/c7cp02233f>.
- (98) Gamez, F.; Pysanenko, A.; Farnik, M.; Oncak, M. Ionization of Carboxylic Acid Clusters in the Gas Phase and on Free Ar-N and (H₂O)(N) Nanoparticles: Valeric Acid as a Model for Small Carboxylic Acids. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2019**, *21* (35), 19201–19208. <https://doi.org/10.1039/c9cp03279g>.
- (99) Gador, N.; Samoylova, E.; Smith, V. R.; Stolow, A.; Rayner, D. M.; Radloff, W.; Hertel, I. V.; Schultz, T. Electronic Structure of Adenine and Thymine Base Pairs Studied by Femtosecond Electron-Ion Coincidence Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry A* **2007**, *111*, 11743–11749.

- (100) Luhrs, D. C.; Knochenmuss, R.; Fischer, I. Excited-State Proton Transfer in 1-Naphthol(NH₃)(n) Clusters: Wavelength-Dependence of the Picosecond Pump-Probe Spectra. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2000**, *2* (19), 4335–4340. <https://doi.org/10.1039/b005839o>.
- (101) Shen, C.-C.; Tsai, T.-T.; Wu, J.-Y.; Ho, J.-W.; Chen, Y.-W.; Cheng, P.-Y. Watching Proton Transfer in Real Time: Ultrafast Photoionization-Induced Proton Transfer in Phenol-Ammonia Complex Cation. *The Journal of Chemical Physics* **2017**, *147* (16), 164302. <https://doi.org/10.1063/1.5001375>.
- (102) Samoylova, E.; Radloff, W.; Ritze, H.-H.; Schultz, T. Observation of Proton Transfer in 2-Aminopyridine Dimer by Electron and Mass Spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113* (29), 8195–8201. <https://doi.org/10.1021/jp903460b>.
- (103) Wu, J.-Y.; Cheng, P.-Y. Ultrafast Protonation of an Amide: Photoionization-Induced Proton Transfer in Phenol-Dimethylformamide Complex Cation. *J. Phys. Chem. A* **2019**, *123* (50), 10700–10713. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.9b09651>.
- (104) Chakraborty, T.; Holm, A. I. S.; Hvelplund, P.; Nielsen, S. B.; Pouilly, J.-C.; Worm, E. S.; Williams, E. R. On the Survival of Peptide Cations after Electron Capture: Role of Internal Hydrogen Bonding and Microsolvation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2006**, *17* (12), 1675–1680. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2006.07.018>.
- (105) Pagel, K.; Hyung, S.-J.; Ruotolo, B. T.; Robinson, C. V. Alternate Dissociation Pathways Identified in Charge-Reduced Protein Complex Ions. *Analytical Chemistry* **2010**, *82* (12), 5363–5372. <https://doi.org/10.1021/ac101121r>.
- (106) Warnke, S.; von Helden, G.; Pagel, K. Protein Structure in the Gas Phase: The Influence of Side-Chain Microsolvation. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (4), 1177–1180. <https://doi.org/10.1021/ja308528d>.
- (107) Prell, J. S.; O'Brien, J. T.; Holm, A. I. S.; Leib, R. D.; Donald, W. A.; Williams, E. R. Electron Capture by a Hydrated Gaseous Peptide: Effects of Water on Fragmentation and Molecular Survival. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (38), 12680–12689. <https://doi.org/10.1021/ja8022434>.
- (108) Byskov, C. S.; Nielsen, S. B. On the Formation, Stability, and Dissociation of Peptide Radicals after Femtosecond Electron Transfer from Alkali Metal Atoms. *International Journal of Mass Spectrometry* **2015**, *390*, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2015.05.014>.
- (109) Holm, A. I. S.; Donald, W. A.; Hvelplund, P.; Larsen, M. K.; Nielsen, S. B.; Williams, E. R. Investigation of Energy Deposited by Femtosecond Electron Transfer in Collisions Using Hydrated Ion Nanocalorimetry. *The Journal of Physical Chemistry A* **2012**, *112*, 10721.
- (110) Maclot, S.; Rangama, J.; Nielsen, S. B.; Pouilly, J.-C. Nanosolvation by Acetonitrile and 18-Crown-6 Ether Induce Strongly Different Effects on the Electron-Capture Induced Dissociation of Aromatic Tripeptide Cations in the Gas Phase. *International Journal of Mass Spectrometry* **2013**, *337*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2012.12.014>.
- (111) Abdelmouleh, M. Processus intrinsèques radio-induits dans des complexes non-covalents d'intérêt biologique et pharmaceutique, Université de Caen Normandie, 2020.
- (112) Pepin, R.; Tureček, F. Kinetic Ion Thermometers for Electron Transfer Dissociation. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (7), 2818–2826. <https://doi.org/10.1021/jp510244d>.
- (113) Holm, A. I. S.; Larsen, M. K.; Panja, S.; Hvelplund, P.; Nielsen, S. B.; Leib, R. D.; Donald, W. A.; Williams, E. R.; Hao, C.; Turecek, F. Electron Capture, Femtosecond Electron Transfer and Theory: A Study of Noncovalent Crown Ether 1,*n*-Diammonium Alkane Complexes. *International Journal of Mass Spectrometry* **2008**, *276*, 116.
- (114) Abdelmouleh, M.; Lalande, M.; Nicol, E.; Frison, G.; van der Rest, G.; Pouilly, J.-C. Chemical Processes Involving 18-Crown-6-Ether in Activated Noncovalent Complexes with Protonated Peptides. *ChemPhysChem* **2021**, *22* (12), 1243–1250. <https://doi.org/10.1002/cphc.202100075>.
- (115) Yao, C.; Tureček, F. Hypervalent Ammonium Radicals. Competitive N–C and N–H Bond Dissociations in Methyl Ammonium and Ethyl Ammonium. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7* (5), 912–920. <https://doi.org/10.1039/B414764B>.

- (116) Homayoon, Z.; Pratihari, S.; Dratz, E.; Snider, R.; Spezia, R.; Barnes, G. L.; Macaluso, V.; Somer, A. M.; Hase, W. L. Model Simulations of the Thermal Dissociation of the TIK(H⁺)(₂) Tripeptide: Mechanisms and Kinetic Parameters. *Journal of Physical Chemistry A* **2016**, *120* (42), 8211–8227. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.6b05884>.
- (117) Larriba, C.; Hogan, C. J. Ion Mobilities in Diatomic Gases: Measurement versus Prediction with Non-Specular Scattering Models. *The Journal of Physical Chemistry A* **2013**, *117* (19), 3887–3901. <https://doi.org/10.1021/jp312432z>.
- (118) Larriba, C.; Hogan, C. J. Free Molecular Collision Cross Section Calculation Methods for Nanoparticles and Complex Ions with Energy Accommodation. *Journal of Computational Physics* **2013**, *251*, 344–363. <https://doi.org/10.1016/j.jcp.2013.05.038>.
- (119) Van der Rest, G.; Halgand, F. Size Exclusion Chromatography-Ion Mobility-Mass Spectrometry Coupling: A Step Toward Structural Biology. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2017**, *28* (11), 2519–2522. <https://doi.org/10.1021/jasms.8b05432>.
- (120) Campuzano, I.; Bush, M. F.; Robinson, C. V.; Beaumont, C.; Richardson, K.; Kim, H.; Kim, H. I. Structural Characterization of Drug-like Compounds by Ion Mobility Mass Spectrometry: Comparison of Theoretical and Experimentally Derived Nitrogen Collision Cross Sections. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (2), 1026–1033. <https://doi.org/10.1021/ac202625t>.
- (121) Prell, J. S.; O'Brien, J. T.; Steill, J. D.; Oomens, J.; Williams, E. R. Structures of Protonated Dipeptides: The Role of Arginine in Stabilizing Salt Bridges. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 11442–11449.
- (122) Wu, R.; McMahon, T. B. Stabilization of the Zwitterionic Structure of Proline by an Alkylammonium Ion in the Gas Phase. *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, *46*, 3668–3671.
- (123) Tureček, F.; Julian, R. R. Peptide Radicals and Cation Radicals in the Gas Phase. *Chemical Reviews* **2013**, *113* (8), 6691–6733. <https://doi.org/10.1021/cr400043s>.
- (124) Tureček, F.; Syrtstad, E. A. Mechanism and Energetics of Intramolecular Hydrogen Transfer in Amide and Peptide Radicals and Cation-Radicals. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 3353–3369.
- (125) Weimann, D. P.; Winkler, H. D. F.; Falenski, J. A.; Kokschi, B.; Schalley, C. A. Highly Dynamic Motion of Crown Ethers along Oligolysine Peptide Chains. *Nature Chemistry* **2009**, *1*, 573–577.
- (126) Winkler, H. D. F.; Weimann, D. P.; Springer, A.; Schalley, C. A. Dynamic Motion in Crown Ether Dendrimer Complexes: A “Spacewalk” on the Molecular Scale. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48* (39), 7246–7250. <https://doi.org/10.1002/anie.200902437>.
- (127) Lalande, M.; Schwob, L.; Vizcaino, V.; Chirot, F.; Dugourd, P.; Schlatholter, T.; Pouilly, J.-C. Direct Radiation Effects on the Structure and Stability of Collagen and Other Proteins. *Chembiochem* **2019**, *20* (24), 2972–2980. <https://doi.org/10.1002/cbic.201900202>.
- (128) Astbury, W. T. The Fourth Spiers Memorial Lecture. X-Ray Adventures among the Proteins. *Trans. Faraday Soc.* **1938**, *34* (0), 378–388. <https://doi.org/10.1039/TF9383400378>.
- (129) Uitto, J.; Lichtenstein, J. R. Defects in the Biochemistry of Collagen in Diseases of Connective Tissue. *J Invest Dermatol* **1976**, *66* (02), 59–79.
- (130) Rich, A.; Crick, F. H. C. The Molecular Structure of Collagen. *Journal of Molecular Biology* **1961**, *3* (5), 483–IN4. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80016-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80016-8).
- (131) Orgel, J. P. R. O.; Irving, T. C.; Miller, A.; Wess, T. J. Microfibrillar Structure of Type I Collagen *in Situ*. *Proc Natl Acad Sci USA* **2006**, *103* (24), 9001. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502718103>.
- (132) Persikov, A. V.; Xu, Y.; Brodsky, B. Equilibrium Thermal Transitions of Collagen Model Peptides. *Protein Science* **2004**, *13* (4), 893–902. <https://doi.org/10.1110/ps.03501704>.
- (133) Berendsen, H. J. C.; Migchelsen, C. HYDRATION STRUCTURE OF FIBROUS MACROMOLECULES. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1965**, *125* (2), 365–379. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1965.tb45403.x>.
- (134) Bella, J. Collagen Structure: New Tricks from a Very Old Dog. *Biochem J* **2016**, *473* (8), 1001. <https://doi.org/10.1042/BJ20151169>.

- (135) Shoulders, M. D.; Raines, R. T. Collagen Structure and Stability. *Annual Review of Biochemistry* **2009**, *78*, 929–958. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>.
- (136) Berisio, R.; Vitagliano, L.; Mazzarella, L.; Zagari, A. Crystal Structure of the Collagen Triple Helix Model [(Pro-Pro-Gly)₁₀]₃. *Protein Science* **2002**, *11* (2), 262–270. <https://doi.org/10.1110/ps.32602>.
- (137) Pouilly, J. C.; Lecomte, F.; Nieuwjaer, N.; Manil, B.; Schermann, J. P.; Desfrancois, C.; Gregoire, G.; Ballivian, R.; Chirot, F.; Lemoine, J.; Calvo, F.; Antoine, R.; Dugourd, P. Combining Ion Mobility Mass Spectrometry and Infrared Multiphoton Dissociation Spectroscopy to Probe the Structure of Gas-Phase Vancomycin-Ac(2)(L)K(D)A(D)A Non-Covalent Complex. *International Journal of Mass Spectrometry* **2010**, *297* (1–3), 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2010.05.014>.
- (138) Le, T. N.; Pouilly, J. C.; Lecomte, F.; Nieuwjaer, N.; Manil, B.; Desfrancois, C.; Chirot, F.; Lemoine, J.; Dugourd, P.; van der Rest, G.; Gregoire, G. Gas-Phase Structure of Amyloid-Beta (12–28) Peptide Investigated by Infrared Spectroscopy, Electron Capture Dissociation and Ion Mobility Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2013**, *24* (12), 1937–1949. <https://doi.org/10.1007/s13361-013-0722-x>.
- (139) Lalande, M. Processus induits par l'irradiation de modèles peptidiques de la triple hélice du collagène en phase gazeuse, Université de Caen Normandie, 2018.
- (140) Simon, A.-L.; Chirot, F.; Choi, C. M.; Clavier, C.; Barbaire, M.; Maurelli, J.; Dagany, X.; MacAleese, L.; Dugourd, P. Tandem Ion Mobility Spectrometry Coupled to Laser Excitation. *Review of Scientific Instruments* **2015**, *86* (9), 094101. <https://doi.org/10.1063/1.4930604>.
- (141) Sakakibara, S.; Inouye, K.; Shudo, K.; Kishida, Y.; Kobayashi, Y.; Prockop, D. J. Synthesis of (Pro-Hyp-Gly)_n of Defined Molecular Weights Evidence for the Stabilization of Collagen Triple Helix by Hydroxyproline. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* **1973**, *303* (1), 198–202. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(73\)90164-5](https://doi.org/10.1016/0005-2795(73)90164-5).
- (142) Kar, K.; Amin, P.; Bryan, M. A.; Persikov, A. V.; Mohs, A.; Wang, Y.-H.; Brodsky, B. Self-Association of Collagen Triple Helic Peptides into Higher Order Structures. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281* (44), 33283–33290. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605747200>.
- (143) Bush, M. F.; Hall, Z.; Giles, K.; Hoyes, J.; Robinson, C. V.; Ruotolo, B. T. Collision Cross Sections of Proteins and Their Complexes: A Calibration Framework and Database for Gas-Phase Structural Biology. *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 9557.
- (144) Smith, D. P.; Giles, K.; Bateman, R. H.; Radford, S. E.; Ashcroft, A. E. Monitoring Copopulated Conformational States during Protein Folding Events Using Electrospray Ionization-Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, *18* (12), 2180–2190.
- (145) Daly, S.; Kulesza, A.; Poussigues, F.; Simon, A.-L.; Choi, C. M.; Knight, G.; Chirot, F.; MacAleese, L.; Antoine, R.; Dugourd, P. Conformational Changes in Amyloid-Beta (12–28) Alloforms Studied Using Action-FRET, IMS and Molecular Dynamics Simulations. *Chemical Science* **2015**, *6* (8), 5040–5047. <https://doi.org/10.1039/c5sc01463h>.
- (146) Konnermann, L.; Simons, D. A. Protein-Folding Kinetics and Mechanisms Studied by Pulse-Labeling and Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **2003**, *22*, 1–26.
- (147) Marklund, E. G.; Degiacomi, M. T.; Robinson, C. V.; Baldwin, A. J.; Benesch, J. L. P. Collision Cross Sections for Structural Proteomics. *Structure* **2015**, *23* (4), 791–799. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.02.010>.
- (148) Salbo, R.; Bush, M. F.; Naver, H.; Campuzano, I.; Robinson, C. V.; Pettersson, I.; Jørgensen, T. J. D.; Haselmann, K. F. Traveling-Wave Ion Mobility Mass Spectrometry of Protein Complexes: Accurate Calibrated Collision Cross-Sections of Human Insulin Oligomers. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2012**, *26* (10), 1181–1193. <https://doi.org/10.1002/rcm.6211>.
- (149) Brodsky, B.; Thiagarajan, G.; Madhan, B.; Kar, K. Triple-Helical Peptides: An Approach to Collagen Conformation, Stability, and Self-Association. *Biopolymers* **2008**, *89* (5), 345–353. <https://doi.org/10.1002/bip.20958>.

- (150) M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016. Gaussian 09, Revision A.02, 2016.
- (151) Yoshioka, K.; Okonski, C. Electric Properties of Macromolecules 9 Dipole Moment Polarizability and Optical Anisotropy Factor of Collagen in Solution from Electric Birefringence. *Biopolymers* **1966**, *4* (5), 499–507. <https://doi.org/10.1002/bip.1966.360040502>.
- (152) Pierson, N. A.; Clemmer, D. E. An IMS–IMS Threshold Method for Semi-Quantitative Determination of Activation Barriers: Interconversion of Proline Cis↔trans Forms in Triply Protonated Bradykinin. *International Journal of Mass Spectrometry* **2015**, *377*, 646–654. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2014.07.012>.
- (153) Wyttenbach, T.; Pierson, N. A.; Clemmer, D. E.; Bowers, M. T. Ion Mobility Analysis of Molecular Dynamics. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2014**, *65* (1), 175–196. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-040513-103644>.
- (154) Tian, Y.; Han, L.; Buckner, A. C.; Ruotolo, B. T. Collision Induced Unfolding of Intact Antibodies: Rapid Characterization of Disulfide Bonding Patterns, Glycosylation, and Structures. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (22), 11509–11515. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03291>.
- (155) Bretscher, L. E.; Jenkins, C. L.; Taylor, K. M.; DeRider, M. L.; Raines, R. T. Conformational Stability of Collagen Relies on a Stereoelectronic Effect. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (4), 777–778. <https://doi.org/10.1021/ja005542v>.
- (156) Lalande, M.; Comby-Zerbino, C.; Bouakil, M.; Dugourd, P.; Chirot, F.; Pouilly, J.-C. Isolated Collagen Mimetic Peptide Assemblies Have Stable Triple-Helix Structures. *Chemistry-a European Journal* **2018**, *24* (52), 13728–13733. <https://doi.org/10.1002/chem.201802929>.
- (157) O’Leary, L. E. R.; Fallas, J. A.; Bakota, E. L.; Kang, M. K.; Hartgerink, J. D. Multi-Hierarchical Self-Assembly of a Collagen Mimetic Peptide from Triple Helix to Nanofibre and Hydrogel. *Nature Chemistry* **2011**, *3*, 821.
- (158) Yu, S. M.; Li, Y.; Kim, D. Collagen Mimetic Peptides: Progress towards Functional Applications. *Soft Matter* **2011**, *7* (18), 7927–7938. <https://doi.org/10.1039/c1sm05329a>.
- (159) Giulivi, C.; Traaseth, N. J.; Davies, K. J. A. Tyrosine Oxidation Products: Analysis and Biological Relevance. *Amino Acids* **2003**, *25* (3), 227–232. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0013-0>.
- (160) Lee, S.; Lee, S.; Song, K. B. Effect of Gamma-Irradiation on the Physicochemical Properties of Porcine and Bovine Blood Plasma Proteins. *Food Chemistry* **2003**, *82* (4), 521–526. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00592-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00592-7).
- (161) Baccaro, S.; Bal, O.; Cemmi, A.; Di Sarcina, I. The Effect of Gamma Irradiation on Rice Protein Aqueous Solution. *Radiation Physics and Chemistry* **2018**, *146*, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2018.01.011>.
- (162) Hu, X.; Raja, W. K.; An, B.; Tokareva, O.; Cebe, P.; Kaplan, D. L. Stability of Silk and Collagen Protein Materials in Space. *Scientific Reports* **2013**, *3*, 3428.
- (163) Ventura, A.; Ngono-Ravache, Y.; Marie, H.; Levavasseur-Marie, D.; Legay, R.; Dauvois, V.; Chenal, T.; Visseaux, M.; Balanzat, E. Hydrogen Emission and Macromolecular Radiation-Induced Defects in Polyethylene Irradiated under an Inert Atmosphere: The Role of Energy Transfers toward Trans-Vinylene Unsaturations. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120* (39), 10367–10380. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b04503>.

- (164) Lucas Schwob. Ionisation et fragmentation de biomolécules sélectionnées en masse induites par impact d'ions et photo-absorption. Thèse de doctorat, Université de Caen Normandie, Caen, 2016. <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-01465838>.
- (165) Plekan, O.; Feyer, V.; Richter, R.; Coreno, M.; de Simone, M.; Prince, K. C.; Carravetta, V. Investigation of the Amino Acids Glycine, Proline, and Methionine by Photoemission Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry A* **2007**, *111*, 10998–11005.
- (166) Egorov, D.; Schwob, L.; Lalande, M.; Hoekstra, R.; Schlatholter, T. Near Edge X-Ray Absorption Mass Spectrometry of Gas Phase Proteins: The Influence of Protein Size. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2016**, *18* (37), 26213–26223. <https://doi.org/10.1039/c6cp05254a>.
- (167) Li, W.; Kavatsyuk, O.; Douma, W.; Wang, X.; Hoekstra, R.; Mayer, D.; Robinson, M. S.; Gühr, M.; Lalande, M.; Abdelmouleh, M.; Ryszka, M.; Pouilly, J. C.; Schlathölter, T. Multiple Valence Electron Detachment Following Auger Decay of Inner-Shell Vacancies in Gas-Phase DNA. *Chem. Sci.* **2021**. <https://doi.org/10.1039/D1SC02885E>.
- (168) Budnik, B. A.; Tsybin, Y. O.; Hakansson, P.; Zubarev, R. A. Ionization Energies of Multiply Protonated Polypeptides Obtained by Tandem Ionization in Fourier Transform Mass Spectrometers. *Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *37*, 1141–1144.
- (169) Canon, F.; Milosavljevic, A. R.; Nahon, L.; Giuliani, A. Action Spectroscopy of a Protonated Peptide in the Ultraviolet Range. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2015**, *17*, 25725–25733.
- (170) Jariashvili, K.; Madhan, B.; Brodsky, B.; Kuchava, A.; Namicheishvili, L.; Metreveli, N. Uv Damage of Collagen: Insights from Model Collagen Peptides. *Biopolymers* **2012**, *97*, 189–198.
- (171) Paizs, B.; Suhai, S. Fragmentation Pathways of Protonated Peptides. *Mass Spectrometry Reviews* **2005**, *24*, 508–548.
- (172) Schwob, L.; Lalande, M.; Egorov, D.; Rangama, J.; Hoekstra, R.; Vizcaino, V.; Schlatholter, T.; Pouilly, J.-C. Radical-Driven Processes within a Peptidic Sequence of Type I Collagen upon Single-Photon Ionisation in the Gas Phase. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2017**, *19* (34), 22895–22904. <https://doi.org/10.1039/c7cp03376a>.
- (173) Egorov, D.; Hoekstra, R.; Schlathölter, T. A Comparative VUV Absorption Mass-Spectroscopy Study on Protonated Peptides of Different Size. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 20608–20618. <https://doi.org/10.1039/C7CP03203J>.
- (174) Hopkinson, A. C. Radical Cations Of Amino Acids And Peptides: Structures And Stabilities. *Mass Spectrometry Reviews* **2009**, *28*, 655–671.
- (175) Giuliani, A.; Milosavljevic, A. R.; Hinsen, K.; Canon, F.; Nicolas, C.; Refregiers, M.; Nahon, L. Structure and Charge-State Dependence of the Gas-Phase Ionization Energy of Proteins. *Angewandte Chemie-International Edition* **2012**, *51* (38), 9552–9556. <https://doi.org/10.1002/anie.201204435>.
- (176) Naumkin, A.; Kraut-Vass, A.; Gaarenstroom, S.; Powell, C. NIST X-Ray Photoelectron Spectroscopy Database, 2012.
- (177) Okuyama, K.; Miyama, K.; Mizuno, K.; Bächinger, H. P. Crystal Structure of (Gly-Pro-Hyp)₉: Implications for the Collagen Molecular Model. *Biopolymers* **2012**, *97* (8), 607–616. <https://doi.org/10.1002/bip.22048>.
- (178) Abdelmouleh, M.; Espinosa Rodriguez, A.; Leroux, J.; Christodoulou, P.; Bernay, B.; Schlathölter, T.; Pouilly, J.-C. X-Ray Photoabsorption-Induced Processes within Protonated Rifamycin Sodium Salts in the Gas Phase. *Eur. Phys. J. D* **2021**, *75* (3). <https://doi.org/10.1140/epjd/s10053-021-00092-w>.
- (179) Lalande, M.; Abdelmouleh, M.; Ryszka, M.; Vizcaino, V.; Rangama, J.; Mery, A.; Durantel, F.; Schlatholter, T.; Pouilly, J.-C. Irradiation of Isolated Collagen Mimetic Peptides by x Rays and Carbon Ions at the Bragg-Peak Energy. *Physical Review A* **2018**, *98* (6), 062701. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.98.062701>.
- (180) Martin, S.; Ortega, C.; Chen, L.; Brédy, R.; Vernier, A.; Dugourd, P.; Antoine, R.; Bernard, J.; Reitsma, G.; Gonzalez-Magaña, O.; Hoekstra, R.; Schlathölter, T. Electron Capture and Deprotonation Processes Observed in Collisions between Xe⁸⁺ and Multiply Protonated Cytochrome-C. *Phys. Rev. A* **2014**, *89* (1), 012707.

- (181) Hoffmann, W. D.; Jackson, G. P. Charge Transfer Dissociation (CTD) Mass Spectrometry of Peptide Cations Using Kiloelectronvolt Helium Cations. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2014**, *25*, 1939–1943.
- (182) Li, P.; Jackson, G. P. Charge Transfer Dissociation (CTD) Mass Spectrometry of Peptide Cations: Study of Charge State Effects and Side-Chain Losses. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2017**, *28* (7), 1271–1281. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1574-y>.
- (183) Egorov, D.; Schwob, L.; Lalande, M.; Hoekstra, R.; Schlathölter, T. Near Edge X-Ray Absorption Mass Spectrometry of Gas Phase Proteins: The Influence of Protein Size. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18* (37), 26213–26223. <https://doi.org/10.1039/C6CP05254A>.
- (184) Agnihotri, A. N.; Kasthurirangan, S.; Nandi, S.; Kumar, A.; Galassi, M. E.; Rivarola, R. D.; Fojon, O.; Champion, C.; Hanssen, J.; Lekadir, H.; Weck, P. F.; Tribedi, L. C. Ionization of Uracil in Collisions with Highly Charged Carbon and Oxygen Ions of Energy 100 KeV to 78 MeV. *Physical Review A* **2012**, *85*.
- (185) Abdelmouleh, M.; Lalande, M.; Vizcaino, V.; Schlatholter, T.; Pouilly, J.-C. Photoinduced Processes within Noncovalent Complexes Involved in Molecular Recognition. *Chemistry-a European Journal* **2020**, *26* (10), 2243–2250. <https://doi.org/10.1002/chem.201904786>.
- (186) Abdelmouleh, M.; Lalande, M.; El Feghaly, J.; Vizcaino, V.; Rebelo, A.; Eden, S.; Schlathölter, T.; Pouilly, J.-C. Mass Spectral Signatures of Complex Post-Translational Modifications in Proteins: A Proof-of-Principle Based on X-Ray Irradiated Vancomycin. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2020**, *31* (8), 1738–1743. <https://doi.org/10.1021/jasms.0c00169>.
- (187) Kanai, R.; Ogawa, H.; Vilsen, B.; Cornelius, F.; Toyoshima, C. Crystal Structure of a Na⁺-Bound Na⁺,K⁺-ATPase Preceding the E1P State. *Nature* **2013**, *502* (7470), 201–206. <https://doi.org/10.1038/nature12578>.
- (188) Hamada, N.; Imaoka, T.; Masunaga, S.; Ogata, T.; Okayasu, R.; Takahashi, A.; Kato, T. A.; Kobayashi, Y.; Ohnishi, T.; Ono, K.; Shimada, Y.; Teshima, T. Recent Advances in the Biology of Heavy-Ion Cancer Therapy. *J. Radiat. Res.* **2010**, *51*, 365–383.
- (189) Mavragani, I. V.; Nikitaki, Z.; Souli, M. P.; Aziz, A.; Nowsheen, S.; Aziz, K.; Rogakou, E.; Georgakilas, A. G. Complex DNA Damage: A Route to Radiation-Induced Genomic Instability and Carcinogenesis. *Cancers* **2017**, *9*, 91. <https://doi.org/10.3390/cancers9070091>.
- (190) Sage, E.; Shikazono, N. Radiation-Induced Clustered DNA Lesions: Repair and Mutagenesis. *Free Radical Biology and Medicine* **2017**, *107*, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.008>.
- (191) Li, W.; Mjekiqi, E.; Douma, W.; Wang, X.; Kavatsyuk, O.; Hoekstra, R.; Pouilly, J.-C.; Schlatholter, T. Hole Migration in Telomere-Based Oligonucleotide Anions and G-Quadruplexes. *Chemistry-a European Journal* **2019**, *25* (70), 16114–16119. <https://doi.org/10.1002/chem.201904105>.
- (192) Lepere, V.; Lucas, B.; Barat, M.; Fayeton, J.; Picard, V.; Jouvét, C.; Carcabal, P.; Nielsen, I.; Dedonder-Lardeux, C.; Gregoire, G.; Fujii, A. Comprehensive Characterization of the Photodissociation Pathways of Protonated Tryptophan. *JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS* **2007**, *127* (13). <https://doi.org/10.1063/1.2770458>.
- (193) Lucas, B.; Barat, M.; Fayeton, J.; Jouvét, C.; Carcabal, P.; Gregoire, G. Statistical versus Non-Statistical Photo-Fragmentation of Protonated GWG Tri-Peptide Induced by UV Excitation. *CHEMICAL PHYSICS* **2008**, *347* (1–3), 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2007.09.054>.
- (194) Soorkia, S.; Dehon, C.; Kumar, S.; Pedrazzani, M.; Frantzen, E.; Lucas, B.; Barat, M.; Fayeton, J.; Jouvét, C. UV Photofragmentation Dynamics of Protonated Cystine: Disulfide Bond Rupture. *JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY LETTERS* **2014**, *5* (7), 1110–1116. <https://doi.org/10.1021/jz500158j>.
- (195) Lermyte, F.; Valkenborg, D.; Loo, J. A.; Sobott, F. Radical Solutions: Principles and Application of Electron-Based Dissociation in Mass Spectrometry-Based Analysis of Protein Structure. *Mass Spectrometry Reviews* **2018**, *37* (6), 750–771. <https://doi.org/10.1002/mas.21560>.

- (196) Ayuso, D.; Palacios, A.; Decleva, P.; Martín, F. Ultrafast Charge Dynamics in Glycine Induced by Attosecond Pulses. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2017**, *19* (30), 19767–19776. <https://doi.org/10.1039/c7cp01856h>.
- (197) Belshaw, L.; Calegari, F.; Duffy, M. J.; Trabattoni, A.; Poletto, L.; Nisoli, M.; Greenwood, J. B. Observation of Ultrafast Charge Migration in an Amino Acid. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2014**, *3*, 3751.
- (198) Calegari, F.; Ayuso, D.; Trabattoni, A.; Belshaw, L.; De Camillis, S.; Anumula, S.; Frassetto, F.; Poletto, L.; Palacios, A.; Decleva, P.; Greenwood, J. B.; Martín, F.; Nisoli, M. Ultrafast Electron Dynamics in Phenylalanine Initiated by Attosecond Pulses. *Science* **2014**, *346*, 336–339.
- (199) Nisoli, M.; Decleva, P.; Calegari, F.; Palacios, A.; Martín, F. Attosecond Electron Dynamics in Molecules. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (16), 10760–10825. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00453>.
- (200) Reitsma, G.; Gonzalez-Magana, O.; Versolato, O.; Door, M.; Hoekstra, R.; Suraud, E.; Fischer, B.; Camus, N.; Kremer, M.; Moshhammer, R.; Schlathölter, T. Femtosecond Laser Induced Ionization and Dissociation of Gas-Phase Protonated Leucine Enkephalin. *International Journal of Mass Spectrometry* **2014**, *365–366*, 365.
- (201) Servage, K. A.; Silveira, J. A.; Fort, K. L.; Russell, D. H. Cryogenic Ion Mobility-Mass Spectrometry: Tracking Ion Structure from Solution to the Gas Phase. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49* (7), 1421–1428. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00177>.
- (202) Dixit, S. M.; Polasky, D. A.; Ruotolo, B. T. Collision Induced Unfolding of Isolated Proteins in the Gas Phase: Past, Present, and Future. *Current Opinion in Chemical Biology* **2018**, *42*, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.11.010>.