HAL
open science

Ionisation et fragmentation de biomolécules sélectionnées en masse induites par impact d'ions et photo-absorption

Lucas Schwob

To cite this version:

Lucas Schwob. Ionisation et fragmentation de biomolécules sélectionnées en masse induites par impact d'ions et photo-absorption. Physique [physics]. Université de Caen Normandie, 2016. Français. NNT : . tel-01465838

HAL Id: tel-01465838

https://hal.science/tel-01465838v1

Submitted on 13 Feb 2017

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.

Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Physique

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Ionisation et fragmentation de biomolécules sélectionnées en masse induites par impact d'ions et photo-absorption

Présentée et soutenue par
Lucas SCHWOB

Thèse soutenue publiquement le mercredi 7 décembre 2016 devant le jury composé de		
M. Philippe MAITRE	Directeur de recherche, CNRS, Orsay	Rapporteur
Mme Bernadette FARIZON	Directeur de recherche, CNRS, Lyon	Rapporteur
M. Alexandre GIULIANI	Ingénieur de recherche, SOLEIL - INRA, Gif-sur-Yvette	Examinateur
M. Richard BREDY	Maître de conférences, Lyon	Examinateur
Mme Anne ZEHNACKER-RENTIEN	Directeur de recherche, CNRS, Orsay	Présidente du jury
M. Alain MERY	Maître de conférences, Caen	Co-Encadrant de thèse
M. Jean-Christophe POULLY	Maître de conférences, Caen	Co-Encadrant de thèse
M. Lamri ADOUI	Professeur des universités, Caen	Directeur de thèse

Thèse dirigée par M. Lamri ADOUI, laboratoire CIMAP

ED SIMEM

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

"This is indeed a mystery," I remarked.
"What do you imagine that it means?"
"I have no data yet.
It is a capital mistake to theorize before one has data.
Insensibly one begins to twist facts to suit theories,
instead of theories to suit facts."

THE ADVENTURES OF SHERLOCK HOLMES
Arthur Conan Doyle

Remerciements

C'est avec un grand soulagement et avec une certaine euphorie que j'entame ici l'ultime chapitre de mon manuscrit, celui des remerciements. J'attendais ce moment avec impatience depuis le début de ma rédaction et maintenant que je (re)fais face à une page blanche, les mots me manquent. Il faut dire que j'ai bien tardé à l'écrire... Mais cela m'a permis d'utiliser plus longtemps la réplique « attention, je n'ai pas encore écrit mes remerciements » comme excellent moyen de pression auprès de mes collègues, redoutant que j'écrive ici trop d'idioties à leur sujet. Je commence donc ces remerciements, et là je cite un homme d'une extrême sagesse, « en respectant un ordre inversement chronologique de ma soutenance à ma naissance, ou presque ».

Ainsi, je souhaite évidemment remercier tous les membres de mon jury : Anne Zehnacker pour l'avoir présidé, Bernadette Farizon et Philippe Maître pour avoir rapporté mon manuscrit pas toujours digeste, je le reconnais, et enfin Richard Brédy et Alexandre Giuliani pour leurs commentaires constructifs. Je les remercie pour avoir examiné mon travail avec cette grande expertise qui est la leur, ainsi que pour leurs encouragements et leurs éloges qui me vont droit au cœur.

Je ne serais pas là sans mon directeur de thèse Lamri Adoui, qui fût le premier à croire en moi et me donna l'opportunité de faire cette thèse dans son équipe. Malgré son emploi du temps très chargé de président de Normandie Université, il a su se rendre disponible lorsque nécessaire et nos entrevues étaient toujours remarquablement intéressantes. D'une grande sagesse, toujours de bon conseil, jamais avare en compliment et en encouragement mais aussi grand orateur, je lui emprunterai ce bout de phrase, celle que nous-autres scientifique nous efforçons tant bien que mal à « repousser la frontière des connaissances ». J'espère y avoir un peu contribué par mon travail de thèse. Je le remercie pour tout.

Toute ma gratitude et mon amour vont à mes encadrant, collègues, amis, de la Team PIBALE. Un thésard ne pourrait rêver avoir meilleur encadrement que ces quatre là. Au commencement, je ne connaissais rien à la physique moléculaire ni à l'instrumentation propre aux ions de basse énergies (rien de rien vous dis-je !) et la chimie sonnait plutôt comme une insulte à mes oreilles. J'ai tout appris à leurs côtés et je leur dois à tous d'être devenu le scientifique, j'espère pas trop mauvais, que je suis aujourd'hui. Ce manuscrit ne serait pas ce qu'il est sans leurs conseils, leurs sens aigu du détail et leurs nombreuses corrections. Je pourrais m'étendre en superlatifs sur de longues pages à leurs sujets, mais je tâcherai d'être court, il y a déjà suffisamment à lire dans ce manuscrit. Je procéderai pour l'occasion par ordre décroissant de taille.

À ma connaissance, il n'existe pas d'échelle pour mesurer la quantité incroyable de choses qu'Alain Méry m'a enseignées pendant ces trois années. Ni pour mesurer tout le respect qu'il m'inspire d'ailleurs. Probablement le meilleur expérimentateur que je connaisse, sa gentillesse n'a d'égale que sa modestie. Il vous dira, par exemple, qu'il ne connait que la loi d'Ohm, mais je suis certain qu'il connait aussi la

réponse à la grande question sur la vie, l'univers et le reste. J'ajouterai que lorsque qu'il vous affuble d'un « C'est de toute beauté » dont il est l'officiel dépositaire, c'est généralement que vous avez très bien travaillé. Je suis moi-même fier d'en compter quelques-uns à mon actif.

Que dire de Jean-Christophe Poully sinon qu'il est breton ? Ha oui, il est aussi chimiste. Difficile de résumer notre complicité aux simples cris de mouette, au visionnage de Dead Sushi et autres clips de Francky Vincent pendant les nuits de manips, aux quelques bières dégustées de-ci de-là dans les rues lyonnaises (entre autres) ou encore au camping à Porquerolles. Mais c'est pourtant ce que je vais faire. Blagues à part, et il en connait un rayon, je lui dois tout le chapitre 5 de cette thèse. Je le remercie pour tous ses conseils, ses encouragements et son aide toujours apportée avec la même spontanéité et abnégation. *Last but not least*, je dois aussi à cet amoureux de la langue française de m'avoir déniché mon premier contrat de post-doc et je lui en suis infiniment reconnaissant.

Un grand merci à Jimmy Rangama, Saint patron de la Mono1000, avec qui faire des manips lorsque rien ne marche correctement est un vrai bonheur. Sa bonne humeur, aussi constante que la moustache qu'il arbore fièrement, trahit évidement son origine créole, faite de rhums arrangés au bord de la route en corniche. Ca lé bon, comme disait la jeune mariée.

Dernier membre de ce quatuor d'encadrants et première dame de PIBALE, Violaine Vizcaino et son accent au parfum (et pas l'inverse) de fromage de brebis. Experte en Labview (et diplômée de surcroît) et fan de Boby Lapointe, c'est auprès d'elle que j'ai fait mes premiers pas sur le dispositif PIBALE. J'ai énormément appris sur le plan expérimental à ses côtés et eu grand plaisir à travailler avec elle. Elle a très vite eu confiance dans mes capacités et en mon raisonnement scientifique, j'en suis encore très honoré et la remercie particulièrement pour ça. Pour ça et aussi pour m'avoir appris le pas de danse du Charleston 20's que j'ai pu perfectionner pendant les longues nuits de manip à BESSY II.

Mention spéciale pour Mathieu « Viet vo dao » Lalande, mon disciple, brillamment promu du grade de « mon stagiaire » à celui de « mon thésard ». On formait une véritable équipe de choc, que ce soit pour travailler sur PIBALE ou pour les shifts de nuit à BESSY II, un gros plat de riz-ratatouille maison bien calé dans l'estomac. Bon courage pour la suite, tu sais aussi bien que moi à quel point PIBALE est capricieuse !

Évidement PIBALE ne serait pas grand-chose sans le travail formidable et l'aide inconditionnelle des équipes techniques du CIMAP, je glisse donc ici un grand merci à Jean-Marc, Thierry, Tom, Claire, Patrick, Fabien, Francis et Frédéric.

Je tiens tout particulièrement à remercier les radiobiologistes du Laria avec qui un projet commun a permis de lancer ce travail centré sur le collagène : Yannick Saintigny, François Chevalier et leurs thésardes Dounia et Charlotte, toujours accueillants et avec qui parler de biologie est un réel plaisir (même si c'est parfois un peu du charabia pour nous). Un merci tout aussi grand à ceux avec qui j'ai eu l'opportunité de collaborer autour de ce projet : Rodolphe Antoine et Philippe Dugourd de l'Institut Lumière Matière de Lyon qui m'ont initiés aux expériences de photoabsorption dans l'UV, et Thomas Schlathölter de l'université de Groningen pour m'avoir accueilli sur son dispositif pour faire des expériences au synchrotron BESSY II à Berlin (entre autre).

Plus globalement, je voudrais remercier tous mes collègues de l'équipe AMA, Patrick, Alicja, Bernd et en particulier Jean-Yves Chesnel notre chef d'équipe toujours conciliant et Monsieur le Directeur Amine Cassimi. L'ambiance dans le couloir ne serait pas ce qu'elle est sans ces trois grands gaillards, parfois un peu bruyant mais toujours très sympathique que sont Stéphane, Philippe et Hermann. Je

n'oublie pas les meilleurs, les doctorants du CIMAP : Dr. Rudy Delaunay [1], qui à ce rythme aura assez d'enfant dans six ans pour monter une équipe de football, Dr. Florent Moisy [2], dit « la force tranquille », Arek Mika Dzieki szwagier (et bon courage pour la fin !) et B.A., qui ne mérite pas plus de reconnaissance que ça mais dont les rébus sont parfois amusant. Et merci en passant aux thésards du GANIL, Pierre, Mathieu, Denis, Quentin, José-Luiz et les autres. Ils ont beau faire de la physique nucléaire, ils sont sympas quand même.

Je me dois aussi de remercier un bon nombre de personne hors du labo qui ont largement contribué à ce que ces trois années de thèse se passent à merveille : Pierre et Martin *les colocs* qui sont bien plus ça (Merci pour les diners tout prêt quand je rentrais tard du labo !), la bande de geeks Cook & Célia et Yuki & Anne, Dr. Louis Decoster [3] et sa Margaux « miss météo martienne » (pour nous avoir avoir ouvert les portes du Lindy hop, pour le vin chaud sur les pistes et bien d'autres), Dr. Chewbac de Roubin [4] (Binôme # 1), Thibaud « just married » Coroller (Binôme # 2), Maelle & Yoann pour avoir été des hôtes exceptionnels à La Réunion et enfin toute la bande de joyeux lurons de Caen ça Swing ! (un vrai rayon de soleil pendant cette troisième année de thèse). Merci à vous tous, ma reconnaissance vous est acquise pour les jours à venir.

Je tiens également à remercier mon père, répétant à qui voulait l'entendre que son fils était docteur en physique nucléaire et pour qui une expérience pompe-sonde permet d'observer l'effet kiss-cool des molécules, ma mère, qui a eu le courage de relire entièrement mon manuscrit à la recherche des fautes d'orthographe (s'il en reste, c'est donc de sa faute) et son Patrice, dont la recette de lapin à la moutarde rendrait carnivore un végétarien.

J'approche de la fin. Il me reste à exprimer une certaine gratitude à ce qui a rendu mes trois années de thèse un peu plus facile à supporter (ou pas). En vrac : le café, le cadenas, feu le store du bureau, feu le disque dur de *Paultje*, Francky Vincent, l'acquisition GANIL, La Garsouille, les clefs de 13, la bière, les blind-tests du Chef Raide, Steam, LateX, les primes d'intéressement, « Tictus », le tamagotchi du CEA, l'agrafeuse, Qtiplant et Labview (les bons jours).

Enfin, comment ne pas finir par Coralie, celle qui a partagé cette aventure avec moi tout au long de ces trois années. Merci pour ton soutien, tes encouragements et ta sincérité. C'est maintenant à moi de te souhaiter bon courage pour ta rédaction (héhé).

Table des matières

1 Introduction **1**

2 Contexte **5**

2.1 Les systèmes moléculaires d'intérêt biologique 5

2.1.1 Acides nucléiques 6

2.1.2 Peptides et protéines 7

2.1.3 Nomenclature pour les fragments peptidiques 9

2.2 Faits marquants 10

2.2.1 Interaction photons - biomolécules 11

2.2.2 Interaction électrons - biomolécules 18

2.2.3 Interaction ions atomiques - biomolécules 21

3 Techniques pour la spectrométrie de masse **27**

3.1 Source à électronébulisation 28

3.2 Confinement des ions par des champs RF inhomogènes 29

3.2.1 Funnel 31

3.2.2 Analyseur en masse quadripolaire 33

3.2.3 Guidages par multipôles 36

3.2.4 Piège de Paul 37

3.2.4.1 Principe du piégeage 37

3.2.4.2 Fonctionnement particulier : injection, accumulation et extraction des ions 39

3.3 Spectromètre de masse à temps de vol 44

3.3.1 Configuration Wiley-Mclaren 45

3.3.1.1 Équation du temps de vol 45

3.3.1.2 Focalisation en position et en vitesse 47

3.4 Détection sensible en position 48

3.4.1 Efficacité de détection des galettes à micro-canaux 49

3.4.2 Fonctionnement d'une anode à lignes à retard 51

4 Développement du dispositif expérimental PIBALE 55
4.1 Description générale . . . 56
4.1.1 Production des ions moléculaires cibles . . . 58
4.1.2 Formation des paquets d'ions cibles . . . 60
4.1.3 Détecteur diagnostic . . . 62
4.1.4 Zone d'interaction et analyse par spectrométrie de masse à temps de vol 66
4.1.5 Source d'ions projectiles . . . 69
4.2 Développement et caractérisation du dispositif . . . 74
4.2.1 Développement et mise en place d'un nouveau funnel . . . 74
4.2.1.1 Conception du funnel . . . 75
4.2.1.2 Caractérisation du funnel . . . 78
4.2.1.3 Perspective : augmentation de l'intensité du faisceau de molécules . . . 80
4.2.2 Piégeage et mise en forme du paquet d'ions cibles . . . 80
4.2.2.1 Capacité maximum du piège . . . 81
4.2.2.2 Élargissement du nuage d'ions par la charge d'espace . . . 83
4.2.2.3 Déconfinement du nuage d'ions avant l'extraction . . . 86
4.2.2.4 Effet des collisions avec le gaz tampon lors de l'extraction . . . 89
4.2.2.5 Caractéristiques d'un paquet d'ions dans la zone d'interaction 94
4.2.2.6 Perspective : amélioration des caractéristiques d'un paquet d'ions 96
4.2.3 Synchronisation des faisceaux . . . 99
4.2.3.1 Synchronisation en temps . . . 99
4.2.3.2 Effet du champ électrique créé par le faisceau projectile . . . 101
4.2.4 Spectromètre de masse à temps de vol . . . 104
4.2.4.1 Différenciation en vitesse et gamme de fonctionnement . . . 104
4.2.4.2 Exemple d'imagerie du paquet d'ions cibles . . . 110
4.3 Bilan et premières expériences en faisceaux croisés . . . 112
4.3.1 Bilan . . . 112
4.3.2 Calcul du taux d'événement attendu . . . 113
4.3.3 Résultats . . . 115
4.3.3.1 Cycle d'acquisition . . . 116
4.3.3.2 Collision entre un faisceau d'He^+ à 7 keV et une cible de kanamycine protonée . . . 117
4.4 Conclusion . . . 127

5 Étude de la stabilité de peptides de collagène après photo-absorption 129
5.1 Présentation . . . 130
5.1.1 Contexte scientifique . . . 130
5.1.2 Faits marquants . . . 133
5.1.2.1 Photo-excitation vibrationnelle par photon Infra-Rouge . . . 134

5.1.2.2 Photo-excitation électronique par photon UV 134
5.1.2.3 Photo-ionisation et photo-excitation par photon VUV et X . . 137
5.1.3 Dispositifs expérimentaux 140
5.1.3.1 Dispositif pour les expériences de photo-absorption UV . . . 140
5.1.3.2 Dispositif pour les expériences de photo-absorption VUV et X 142
5.1.4 Nomenclature pour les fragments peptidiques 146
5.2 Stabilité d'une séquence peptidique du collagène 146
5.2.1 Séquence peptidique du collagène PK26-P et PK26-Hyp 147
5.2.2 Dissociation induite par photon UV 149
5.2.2.1 Peptide $[PK26\text{-}P+3H]^{3+}$ 149
5.2.2.2 Peptide $[PK26\text{-}P+4H]^{4+}$: influence de l'état de charge . . . 152
5.2.2.3 Peptides PK26-Hyp : influence de l'hydroxylation 154
5.2.3 Ionisation et dissociation induites par photon VUV et X 155
5.2.3.1 Peptide $[PK26\text{-}P+3H]^{3+}$ 155
5.2.3.2 Peptide $[PK26\text{-}P+4H]^{4+}$: influence de l'état de charge . . . 162
5.2.3.3 Peptides PK26-Hyp : influence de l'hydroxylation 164
5.3 Stabilité d'un modèle de la triple hélice du collagène 167
5.3.1 Peptide modèle de la triple hélice du collagène $((PPG)_{10})_3$ 167
5.3.2 Ionisation et dissociation du monomère $(PPG)_{10}$ 168
5.3.2.1 Peptide $[(PPG)_{10}+3H]^{3+}$, de 12 à 28 eV 169
5.3.2.2 Peptide $[(PPG)_{10}+2H]^{2+}$, à 150 et 288 eV 172
5.3.3 Ionisation et dissociation du modèle de triple hélice $((PPG)_{10})_3$ 174
5.4 Conclusion 178

6 Conclusion et perspectives 181

Bibliographie 189

A Étude de la fragmentation des peptides PK26 par CID 211

B Spectre de photo-absorption UV des peptides PK26-Hyp 215

C Calcul de conformation des peptides PK26 217

Introduction 1

L'étude des interactions entre les rayonnements et la matière au sens large est un sujet de recherche extrêmement vaste mais fondamental pour la compréhension du monde qui nous entoure. L'élargissement des connaissances dans ce domaine a été rendu possible par l'évolution des dispositifs expérimentaux, des théories et des méthodes de calculs. La nécessité de comprendre et de maîtriser les propriétés intrinsèques des systèmes les plus simples, tels que les atomes et les molécules diatomiques, aux plus compliqués comme les hydrocarbures, les macromolécules ou encore les agrégats, en est également le moteur. L'étude des molécules composant la matière biologique est devenu un sujet d'un intérêt croissant pour la communauté scientifique, notamment motivée par la compréhension des mécanismes de dommage des rayonnements ionisants, en particulier pour leurs applications à buts thérapeutiques.

Depuis plusieurs dizaines d'années, la radiothérapie dite « conventionnelle » s'est démocratisée pour le traitement des cancers, venant compléter, voire parfois remplacer, les méthodes chirurgicales et médicamenteuses (chimio-thérapie). Toutefois, par leurs propriétés d'interaction avec la matière, les photons de haute énergie utilisés en radiothérapie (MeV) traversent le corps humain en déposant de l'énergie aussi bien dans la tumeur ciblée que dans les tissus sains avoisinants. Pouvoir épargner ces tissus sains, en particulier les organes à risques, lors de l'irradiation est crucial pour limiter les complications à court et long terme. Dans cet objectif, de nombreuses avancées technologiques dans le domaine de la radiothérapie, à la fois sur les appareils d'irradiation et sur les logiciels de planification des traitements, ont permis de maximiser le dépôt d'énergie dans une tumeur tout en minimisant l'irradiation des tissus sains environnants.

Pour certains types de cancer, l'utilisation de la radiothérapie conventionnelle peut cependant s'avérer inefficace ou non recommandée. C'est notamment le cas pour les tumeurs radiorésistantes, les tumeurs proches d'organes vitaux sensibles et le traitement des enfants, chez qui le risque d'apparition d'effets secondaires à long terme est important. Pour ces cas particuliers, l'utilisation des ions pour le traitement des cancers apporte une alternative efficace à la radiothérapie conventionnelle.

L'utilisation des faisceaux d'ions de haute énergie (centaine de MeV), protons ou ions carbone, s'est largement développée ces dernières années en une forme de thérapie à part entière, dénommée « hadronthérapie » [5]. Les principaux avantages des faisceaux d'ions sont de permettre un dépôt de dose massif dans le volume tumoral et une balistique épargnant les

tissus sains au-delà de ce dernier. Ces effets sont la traduction des propriétés de l'interaction de ces particules chargées dans la matière qui perdent leur énergie le long de leur traversée mais déposent un maximum d'énergie en fin de parcours (pic de Bragg). Leur profondeur de pénétration dans les tissus augmente avec leur énergie initiale, ce qui permet de définir avec précision le volume dans lequel ce maximum d'énergie est déposé. De plus, leur haute efficacité biologique et la forte densité d'ionisation produite par ces ions les rendent particulièrement performants pour les tumeurs radiorésistantes.

Dans le but de mieux comprendre l'effet de ces rayonnements primaires et des particules secondaires (photons, électrons, ions et radicaux libres), de nombreuses études en radiobiologie, biochimie et physique fondamentale se sont focalisées sur l'interaction de ces particules avec la matière biologique et ses conséquences à différentes échelles. Au niveau cellulaire, les dommages induits par les rayonnements ionisants sont étudiés depuis de nombreuses années dans le but d'identifier et classifier les phénomènes d'endommagement [6] et les mécanismes de réparation des cellules [7, 8]. Ces évènements interviennent sur une échelle de temps très large. Si l'ionisation du milieu cellulaire par les rayonnements intervient dans les premières femtosecondes, les réactions physico-chimiques induites par les radicaux libres ne débutent qu'après quelques nanosecondes, et les mécanismes biochimiques, tels que la réparation cellulaire, n'ont lieu que plusieurs secondes après irradiation. Les effets cliniques quant à eux, peuvent se faire ressentir quelques jours à quelques années après l'irradiation. Il a notamment été identifié que les cassures simple et double brin de l'ADN sont les principales sources de dommages aux cellules sous irradiation. De telles lésions peuvent être induites par une ionisation directe due au rayonnement primaire, par les électrons et ions secondaires, ainsi que par les radicaux libres, produits dans la trace des particules primaires [9]. Pour comprendre les mécanismes suivant l'irradiation et pouvoir délivrer des traitements plus performants, il est nécessaire de découpler les effets de ces différentes interactions que les études *in vivo* seules ne permettent pas de différencier.

Les études en phase gazeuse permettent d'explorer les processus induits par l'irradiation à l'échelle moléculaire en s'affranchissant des effets du solvant. De telles expériences menées sur des systèmes moléculaires de plus en plus gros (les acides nucléiques, les protéines et leurs composants de base), par absorption de photons ou par interaction avec des électrons ou des ions de basse énergie, ont montré l'importance des particules secondaires dans les processus de fragmentation de l'ADN. De plus, les propriétés intrinsèques des molécules comme la nature de leur liaison, leur structure électronique et tridimensionnelle et leurs interactions avec leur environnement moléculaire sont des informations fondamentales pour la connaissance et la compréhension du comportement de ces systèmes. Observer de quelle manière un système moléculaire se relaxe après l'avoir perturbé par différents types de rayonnements est une méthode permettant d'évaluer de nombreuses propriétés de ces systèmes. De telles mesures peuvent être réalisées par des techniques comme la spectrométrie de masse et la spectroscopie, deux techniques donnant respectivement accès à la nature des fragments moléculaires et à celle des rayonnements produits lors de la relaxation d'un système.

C'est dans ce contexte général que s'inscrit cette thèse, avec pour objectif l'exploration des mécanismes de relaxation des systèmes d'intérêt biologique en interaction avec différents types de rayonnements.

Dans l'équipe Atomes, Molécules et Agrégats (AMA) au sein du laboratoire CIMAP (Centre de recherche sur les Ions, les MAtériaux et la Photonique), nous nous intéressons à l'ionisation et à la fragmentation de molécules d'intérêt biologique en phase gazeuse (bases de l'ADN, acides aminés, etc.), isolées ou environnées (par agrégation ou nano-solvatation), par collision avec des ions multichargés de basse énergie. Ces collisions donnent lieu à des transferts de charge et d'énergie entre l'ion projectile et la molécule cible, capable de fortement perturber sa structure électronique et permettant de sonder ses mécanismes de dissociation. Jusqu'à maintenant, les études ont porté sur des systèmes de petite taille pouvant être transférés intacts en phase gazeuse par évaporation thermique. Toutefois cette technique ne permet pas d'explorer les propriétés de systèmes plus gros ou des agrégats de taille et d'environnement contrôlés. C'est dans cet objectif qu'a été conçu le dispositif PIBALE (Plateforme pour l'Irradiation de Biomolécules et d'Agrégats Libres et Environnés). Cet instrument permettra d'étudier des systèmes moléculaires tels que des oligonucléotides ou des protéines, mais aussi d'explorer l'influence d'un environnement moléculaire contrôlé, par la production en phase gazeuse de systèmes nano-solvatés et d'agrégats sélectionnés en taille. De plus, il permettra d'analyser la cinématique de fragmentation de ces systèmes par une méthode de détection des fragments en coïncidence. Ces caractéristiques en feront un instrument unique au monde mais pose un réel défi expérimental. Le dispositif PIBALE a récemment été installé dans le hall ARIBE (Accélérateur pour la Recherche sur les Ions de Basse Énergie) du GANIL (Grand Accélérateur National d'Ions Lourds) afin d'y poursuivre son développement et de procéder aux premières expériences. Le développement et la caractérisation de ce dispositif représente une grande partie de ce travail de thèse.

Contrairement aux ions, les photons permettent de déposer une quantité d'énergie précise dans une molécule et ainsi de sonder sa structure électronique. Il est alors possible d'explorer différentes voies de dissociations d'une molécule après sa ionisation ou son excitation via des transitions particulières. Nous avons donc choisi d'étudier les mécanismes de relaxation de molécules d'intérêt biologique en phase gazeuse par photo-absorption, ce qui constitue la seconde partie de cette thèse.

Une grande majorité des études réalisées en phase gazeuse sur des systèmes d'intérêt biologique se sont focalisées sur les molécules présentes dans les cellules, plutôt que sur celles de la matrice extra-cellulaire. Pendant cette thèse, nous nous sommes intéressés au collagène, la protéine structurale la plus abondante du corps humain et le constituant majeur de la matrice extra-cellulaire du cartilage, dont les propriétés particulières la rendent intéressante d'un point de vue biologique et fondamental. En effet, cette protéine possède une structure tridimensionnelle en forme de triple hélice dont la stabilité est renforcée par l'hydroxylation des prolines, particulièrement abondantes dans le collagène. Pour étudier certaines propriétés intrinsèques de cette protéine, des expériences de photo-absorption menées sur des peptides de collagène

protonés en phase gazeuse ont été réalisées. Nous avons ainsi exploré l'effet de l'énergie du photon absorbé sur une grande gamme (5,6 à 540 eV) ainsi que l'influence de l'état de charge, de l'hydroxylation des prolines et de la structure en triple hélice sur les mécanismes de relaxation de ces peptides. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec les équipes de Philippe Dugourd (Institut Lumière Matière, Lyon, France) et de Thomas Schlathölter (Zernike Institute for Advanced Materials, Groningen, Pays-Bas).

Ce manuscrit s'articule autour de quatre chapitres.

Les chapitres 2 et 3 sont dédiés à la présentation du contexte scientifique et des différentes techniques expérimentales utilisées pendant cette thèse. La nature des systèmes moléculaires d'intérêt biologique et un état de l'art de leur interaction avec des photons, des électrons et des ions sont présentés dans le chapitre 2. La description du fonctionnement des techniques expérimentales (chapitre 3) a pour but de fournir des outils permettant une meilleure compréhension des expériences présentées dans la suite de ce manuscrit.

Le chapitre 4 présente le développement et la caractérisation du dispositif PIBALE. Une description complète de cet instrument y est d'abord présentée. Nous détaillerons ensuite les points clefs du dispositif : la source à électronébulisation pour la production des molécules cibles, le piège de Paul pour leur accumulation en un paquet dense pour l'interaction et le spectromètre de masse à temps de vol pour l'analyse des produits de la collision avec un faisceau d'ions atomiques. Enfin, nous présenterons les premiers résultats d'expériences en faisceaux croisés obtenus sur ce dispositif.

Le chapitre 5 traite des expériences de photo-absorption réalisées sur les peptides de collagène. Le contexte particulier de cette étude est abordé au début de cette partie et est suivi d'un état de l'art de la photo-absorption dans le cas précis des peptides et des protéines protonées en phase gazeuse. Le fonctionnement des deux dispositifs expérimentaux utilisés est introduit avant la présentation des résultats. Dans un premier temps, nous explorerons les mécanismes de relaxation d'un peptide de collagène isolé en fonction de l'énergie des photons, de son état de charge et de la présence d'hydroxyproline. Dans un second temps, les résultats obtenus sur un modèle de la triple hélice de collagène seront exposés.

Contexte | 2

Sommaire

2.1 Les systèmes moléculaires d'intérêt biologique 5

2.1.1 Acides nucléiques 6

2.1.2 Peptides et protéines 7

2.1.3 Nomenclature pour les fragments peptidiques 9

2.2 Faits marquants 10

2.2.1 Interaction photons - biomolécules 11

2.2.2 Interaction électrons - biomolécules 18

2.2.3 Interaction ions atomiques - biomolécules 21

Ce chapitre est dédié à la présentation du contexte scientifique dans lequel s'inscrit cette thèse. Dans une première partie, les systèmes moléculaires d'intérêt biologique, ou « biomolécules », tels que les acides nucléiques, les protéines et leurs composants de base, seront présentés. Nous établirons ensuite un état de l'art de leurs interactions avec différents types de rayonnement (photons, électrons, ions) à partir des résultats d'expériences réalisées en phase gazeuse afin d'avoir une vue globale sur les mécanismes de relaxation de ces systèmes d'intérêt biologique.

2.1 Les systèmes moléculaires d'intérêt biologique

Les biomolécules font partie intégrante des organismes vivants et participent à leur métabolisme. Elles régulent l'ensemble des réactions chimiques permettant le développement et la survie d'un organisme. Les protéines et les acides nucléiques sont particulièrement importants vis-à-vis de l'irradiation par des rayonnements ionisants. En effet, les dommages provoqués par ces rayonnements dans la chromatine (contenu du noyau d'une cellule), tels que les cassures simple et double brins de l'ADN, sont la cause première de mortalité radio-induite des cellules. L'intérêt d'explorer les effets de l'irradiation de l'ADN et de ses composants est donc évident. Par ailleurs, les protéines ont des rôles très variés dans le métabolisme et la structuration des organismes vivants. Leur destruction ou la modification de leurs propriétés physico-chimiques induites par des rayonnements ionisants peuvent avoir des conséquences directes sur l'activité métabolique et la survie des cellules. Dans cette partie, nous décrirons les propriétés de l'ADN et des protéines qui seront utiles dans la suite de ce manuscrit.

2.1.1 Acides nucléiques

Le code génétique de tout organisme vivant est contenu et régulé par les macromolécules complexes que sont les acides nucléiques. L'ADN (Acide DésoxyriboNucléique), formé d'une double hélice à deux brins (figure 2.1.1), est présent dans le noyau des cellules et contient toute l'information génétique d'un organisme et gère son développement. L'ARN (Acide RiboNucléique), constitué d'un unique brin, est le produit de la transcription de l'ADN. Cet acide a de nombreuses fonctions métaboliques dont la copie de l'information génétique pour la transcription de l'ADN (ARN messager) et la traduction de cette information pour créer différents peptides et protéines ayant des activités biologiques définies. Ce processus biologique, appelé le dogme central (figure 2.1.1), est celui qui prévaut aujourd'hui dans la description de la transmission de l'information génétique.

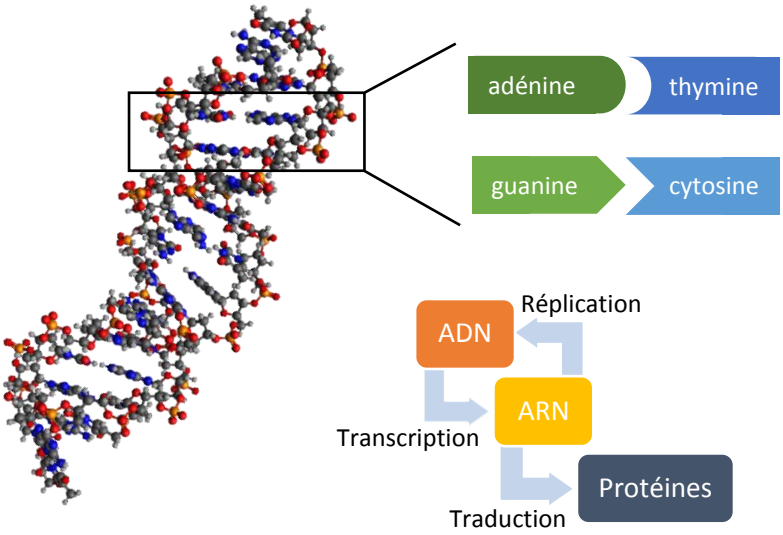


Figure 2.1.1 : *Structure en double hélice de l'ADN, liée par les paires adénine - thymine et guanine-cytosine, et représentation du mécanisme du dogme central.*

Les brins des acides nucléiques sont formés d'une séquence de nucléotides liés entre eux par des liaisons phosphodiesters. L'ensemble des groupements phosphate-sucre constitue le squelette d'un acide nucléique. La rupture d'une liaison covalente dans ce squelette est dénommée « rupture simple brin ». Le terme *oligonucléotide* (figure 2.1.2) est utilisé pour décrire une séquence courte d'acide nucléique composée de plusieurs nucléotides. Comme le présente la figure 2.1.2, chaque nucléotide est constitué de trois parties : la base nucléique (ou nucléobase), le sucre (pentose) et le groupement phosphate.

Il existe cinq bases nucléiques réparties en deux familles (figure 2.1.2) :

— les dérivés de la purine : l'adénine et la guanine,

— les dérivés de la pyrimidine : la cytosine, la thymine et l'uracile.

Dans l'ADN, la structure en double hélice est formée par des liaisons hydrogènes entre bases

complémentaires : adénine - thymine et guanine - cytosine (figure 2.1.1) [10]. Pour l'ARN, l'uracile est substituée à la thymine comme complément de l'adénine.

L'association de ces bases avec un sucre désoxyribose, dans le cas de l'ADN, et ribose, dans le cas de l'ARN, se fait via la liaison glycosidique et forme ce que l'on appelle les nucléosides (figure 2.1.5). On en dénombre quatre pour l'ADN et autant pour l'ARN :

— ADN : désoxyadénosine, désoxyguanosine, désoxycytidine et thimidine,
— ARN : adénosine, guanosine, cytidine et uridine.

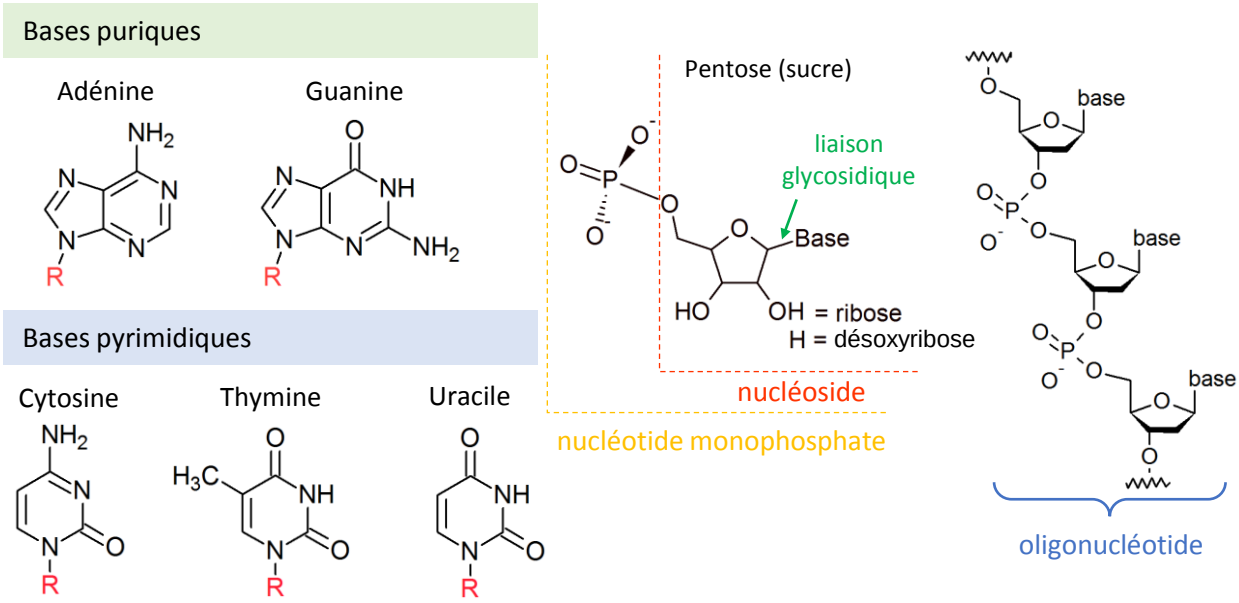


Figure 2.1.2 : *Bases nucléiques par familles où R représente le sucre dans les nucléosides ou les nucléotides monophosphates.*

2.1.2 Peptides et protéines

Les protéines sont des macromolécules, codées lors de la traduction par certaines séquences de l'ADN, qui présentent une grande diversité de fonction biologique dans les cellules et les tissus. Par exemple, l'hémoglobine permet le transport du dioxygène dans l'organisme, l'ubiquitine cible les protéines devant être détruites et le collagène a un rôle structurant dans les matrices extra-cellulaires. La nature et l'activité biologique des protéines sont déterminées par leur composition en acides aminés (structure primaire) et leur structure tridimensionnelle (structure secondaire, tertiaire et quaternaire). Des modifications des acides aminés, dites « post-traductionnelles » car se produisant après la traduction de l'ARN, sont susceptibles de modifier les propriétés physico-chimiques des protéines.

Les acides aminés possèdent la structure chimique H_2N-C_α(R)-COOH, où R est la chaîne latérale qui caractérise les différents acides aminés. La polymérisation de ces molécules permet de les relier via des liaisons peptidiques et de former les peptides (figure 2.1.3). Ainsi par extension,

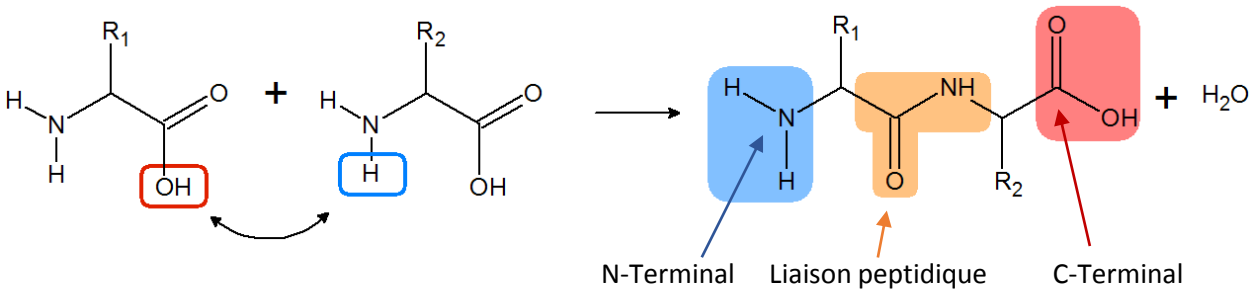


Figure 2.1.3 : *Formation de la liaison peptidique entre deux acides aminés composés des chaînes latérales R_1 et R_2. Le dipeptide formé présente les groupes N- et C-terminaux ainsi que le groupement impliqué dans la liaison peptidique CONH.*

le squelette d'une chaîne polypeptidique est caractérisé par l'ensemble des groupements NH et C=O liés par les liaisons peptidiques entre les différents acides aminés, et des groupements aux extrémités : N-terminale (NH_2) et C-terminale (COOH). Les 20 acides aminés naturels codés par l'ADN sont représentés dans la figure 2.1.5. Parmi eux, on peut distinguer les acides aminés basiques (Arg, Lys et His), dont la chaîne latérale peut être positivement chargée par protonation, et les acides aminés acides (Asp et Glu), qui peuvent être négativement chargés par déprotonation du groupement carboxyle de leur chaîne latérale. La séquence de ces acides aminés dans un peptide ou une protéine constitue sa structure primaire.

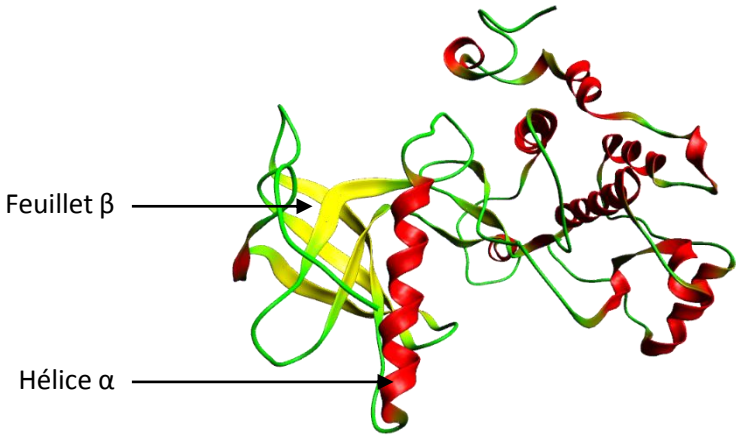


Figure 2.1.4 : *Exemple de structure tridimensionnelle d'une protéine (kinase). Les segments adoptant une structure secondaire en hélice α et en feuillet β sont, respectivement, de couleur rouge et jaune. Les régions coloriées en vert correspondent à des structures non définies de la chaîne polypeptidique.*

La structure secondaire d'une protéine est définie localement par des liaisons hydrogènes entre des acides aminés voisins. Il existe huit types de structures secondaires, mais deux d'entre elles sont souvent rencontrées : l'hélice α et le feuillet β (figure 2.1.4). La structure tertiaire est l'arrangement spatial des segments de structures secondaires différentes. Elle est formée par

différents types d'interactions entre les chaînes latérales des acides aminés d'une protéine et joue un rôle important dans son activité biologique. Enfin, la structure quaternaire est l'arrangement de plusieurs protéines entres elles dans les complexes de protéines. Le collagène, par exemple, est constitué de trois protéines s'enroulant dans une forme particulière d'hélice, qui sera décrite précisément dans la partie 5.1.1.

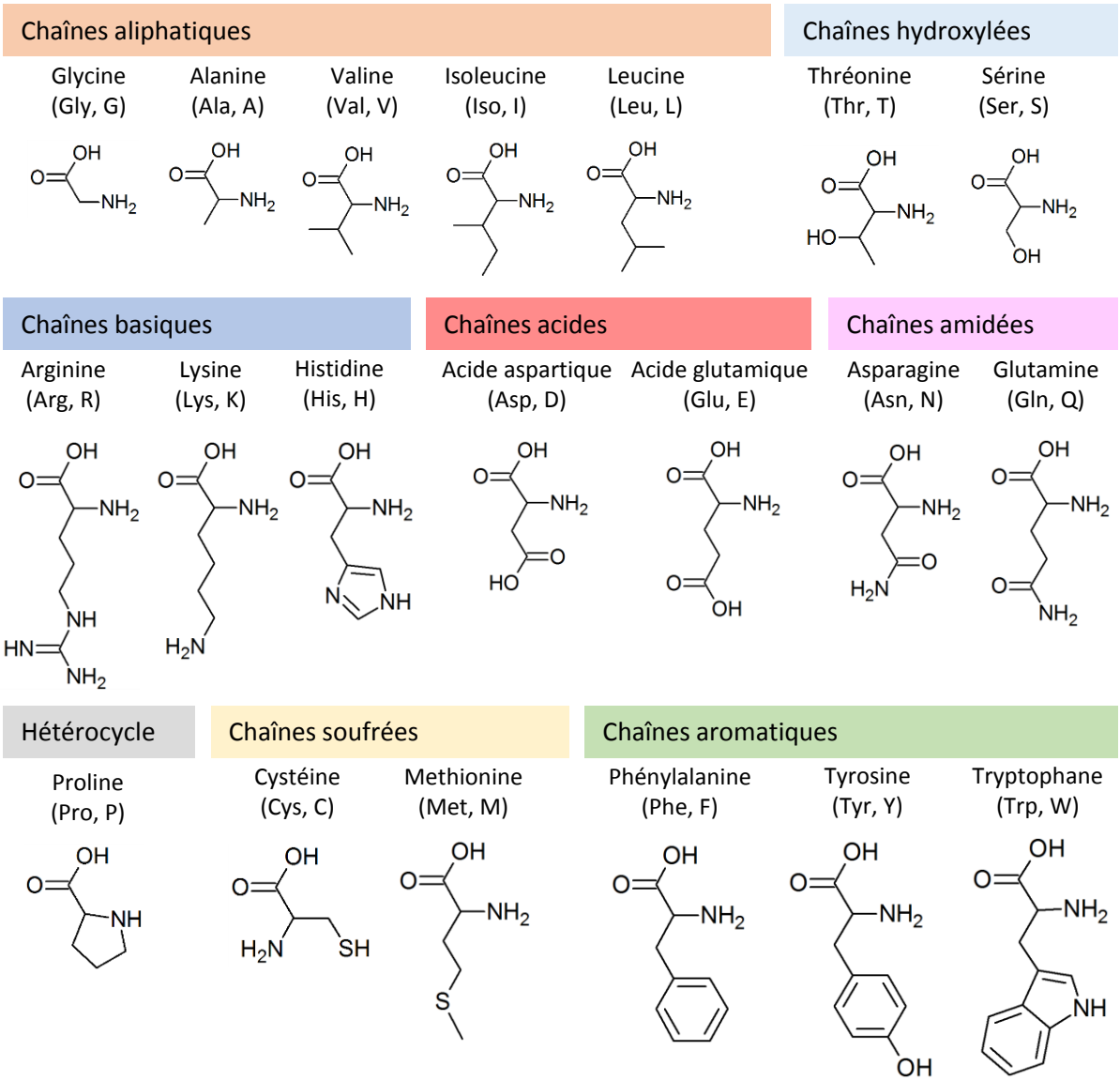


Figure 2.1.5 : *Les 20 acides aminés naturels.*

2.1.3 Nomenclature pour les fragments peptidiques

Dans la suite de ce manuscrit et pour nommer les différents fragments peptidiques, nous utiliserons la règle de nomenclature introduite par Rœpstorff & Folhman [11] et Biemann [12, 13]. Cette règle définit le nom d'un ion créé en fonction de la liaison covalente rompue

le long du squelette du peptide. La figure 2.1.6 présente cette nomenclature dans le cas d'un peptide composé de quatre acides aminés avec les chaînes latérales R_1, R_2, R_3 et R_4, numérotées à partir de l'extrémité N-terminale (NH_2) jusqu'au C-terminal (COOH).

Dans le cas d'un peptide monochargé, après rupture d'une liaison du squelette, la charge est localisée soit du côté du N-terminal formant des fragments a_j, b_j ou c_j, soit du côté du C-terminal, produisant des fragments x_i, y_i ou z_i. Les chiffres i et j correspondent au numéro de la liaison peptidique rompue, en comptant à partir du N-terminal pour les ions a_j, b_j et c_j, et C-terminal pour les ions x_i, y_i et z_i.

De plus, ces notations correspondent à la liaison covalente rompue. Ainsi, les ions a_j et x_i correspondent à la rupture de la liaison $C_{\alpha,i}$-C, les ions b_j et y_i à celle de la liaison C-N et enfin les ions c_j et z_i à celle de la liaison N-$C_{\alpha,i+1}$ où $C_{\alpha,i}$ correspond à l'atome de carbone lié à la chaîne latérale R_i. Dans le cas d'un peptide multichargé, il est possible que des charges soient localisées de chaque côté de la liaison rompue, pouvant ainsi former des couples d'ions complémentaires.

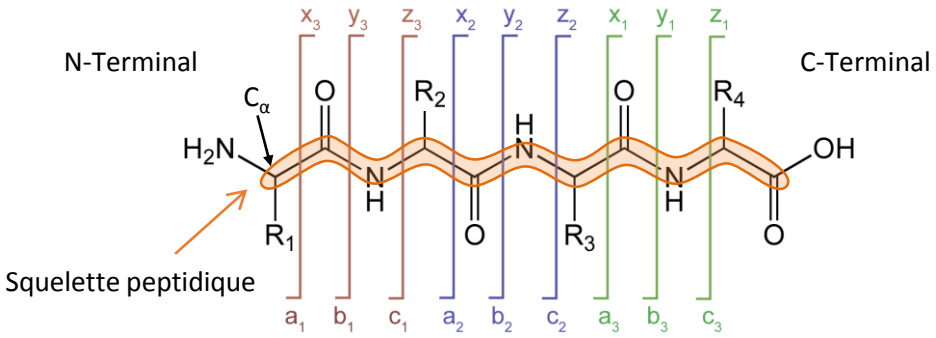


Figure 2.1.6 : *Nomenclature des fragments peptidiques : exemple pour un peptide composé de quatre acides aminés.*

2.2 Faits marquants

Avec l'utilisation des rayonnements ionisants pour le traitement des cancers (radio- et hadron-thérapie), la compréhension des processus biologiques, chimiques et physiques de l'interaction entre ces rayonnements et la matière biologique, des tissus aux biomolécules, est devenue un champ de recherche important pour une large communauté scientifique. Dans la matière, la majorité des dommages biologiques n'est pas due aux ionisations primaires mais aux interactions des nombreuses particules secondaires de plus basses énergies (électrons, ions, radicaux, photons) produites le long du parcours du faisceau. Ainsi, avec pour objectif de comprendre les mécanismes physiques et physico-chimiques à l'origine des dommages biologiques, de nombreux groupes se sont intéressés depuis plusieurs décennies à l'étude, en phase gazeuse, de l'interaction de ces particules secondaires avec les acides nucléiques, les protéines et leurs constituants élémentaires (nucléobases et acides aminés). Ces études en phase gazeuse sont

importantes d'un point de vue fondamental, car elles permettent d'explorer les processus intrinsèques se produisant au sein des molécules en s'affranchissant des effets du solvant, dont l'eau est le principal élément dans la matière biologique.

L'évolution des techniques expérimentales, en particulier la spectrométrie de masse et les méthodes de vaporisation des molécules, a permis l'étude de systèmes de plus en plus complexes. Les premières expériences sur des biomolécules en phase gazeuse ont été réalisées sur des nucléobases et des acides aminés neutres et isolés. Le chauffage de ces molécules sous forme de poudre permet leur vaporisation et la production d'un jet moléculaire cible d'espèces neutres. Cette technique se trouve cependant rapidement limitée par la taille des systèmes pouvant être vaporisés, son principal défaut résidant dans la dégradation des biomolécules lors du chauffage. Le développement de nouvelles sources de vaporisation douce a permis d'outrepasser cette limite et d'explorer de plus gros systèmes (acides nucléiques et protéines par exemple). Parmi ces techniques de vaporisation, on peut citer l'ionisation par électronébulisation (ESI, *ElectroSpray Ionization*, voir section 3.1), la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI, *Matrix-Assited Laser Desorption Ionization*) [14] ou encore la désorption acoustique induite par laser (LIAD, *Laser-Induced Acoustic Desorption*) [15]. Une propriété intéressante de ces méthodes de vaporisation est qu'elles produisent des molécules chargées positivement (protonées $[M+nH]^{n+}$) ou négativement (déprotonées $[M-nH]^{n-}$), ce qui permet d'utiliser les techniques d'optique ionique pour guider, accumuler et sélectionner ces ions selon leur rapport masse-sur-charge avant leur interaction avec un quelconque rayonnement (voir chapitre 3). Grâce à ces progrès technologiques, des molécules de plus en plus pertinentes du point de vue biologique et mieux contrôlées (taille, conformation, environnement) ont pu être étudiées.

Dans la suite, une revue des faits marquants liés à ce contexte scientifique est présenté. Nous nous concentrerons sur les résultats d'expériences réalisées en phase gazeuse impliquant des photons, des électrons ou des ions en interaction avec des molécules d'intérêt biologique. Pour chaque type de rayonnement nous discuterons, dans un premier temps, des constituants élémentaires, tels que les nucléobases et les acides aminés, et dans un second temps des systèmes plus complexes comme les acides nucléiques ou les protéines. On peut noter ici que, si la plupart des études réalisées sur les acides nucléiques ont pour objectif la compréhension des mécanismes de rupture de brin (dommage entraînant presque toujours la mort d'une cellule), celles effectuées sur les protéines sont plus orientées vers le développement de techniques pour le séquençage « *de novo* » qui consiste à définir la séquence d'acides aminés d'une protéine inconnue [16].

2.2.1 Interaction photons - biomolécules

L'absorption d'un photon permet de déposer une certaine quantité d'énergie directement dans les modes d'excitation vibrationnelle ou électronique d'une molécule. En fonction de l'énergie du photon absorbé, différentes transitions électroniques peuvent être sondées (figure 2.2.1 et 2.2.2) et donc différentes voies de relaxation peuvent potentiellement être impliquées. Le retour à l'état fondamental peut se faire de manière radiative (émission d'un photon, figure

2.2.3.a) ou non radiative, par exemple par conversion interne de l'énergie d'excitation électronique en excitation vibrationnelle (figure 2.2.3.b). La dissociation d'un système peut alors se produire depuis l'état fondamental après conversion de l'énergie absorbée en énergie interne ro-vibrationnelle ou depuis un état électronique excité dissociatif (figure 2.2.3.c). Si le photon est suffisamment énergétique, son absorption peut ioniser la molécule depuis les orbitales moléculaires de valence, voire les orbitales internes atomiques.

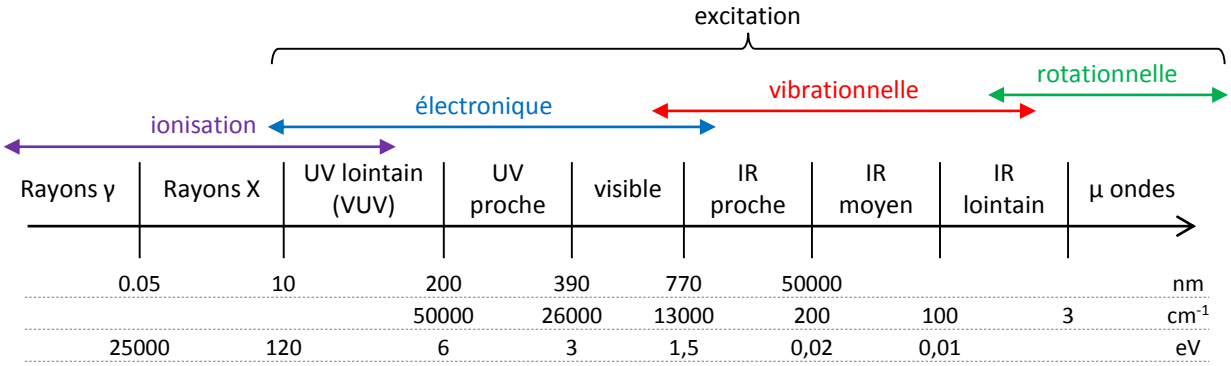


Figure 2.2.1 : *Domaine spectral correspondant à l'ionisation et à l'excitation dans des états électroniques, vibrationnels et rotationnels en unité de longueur d'onde λ (nm), de nombre d'onde (cm^{-1}) et d'énergie (eV) [17].*

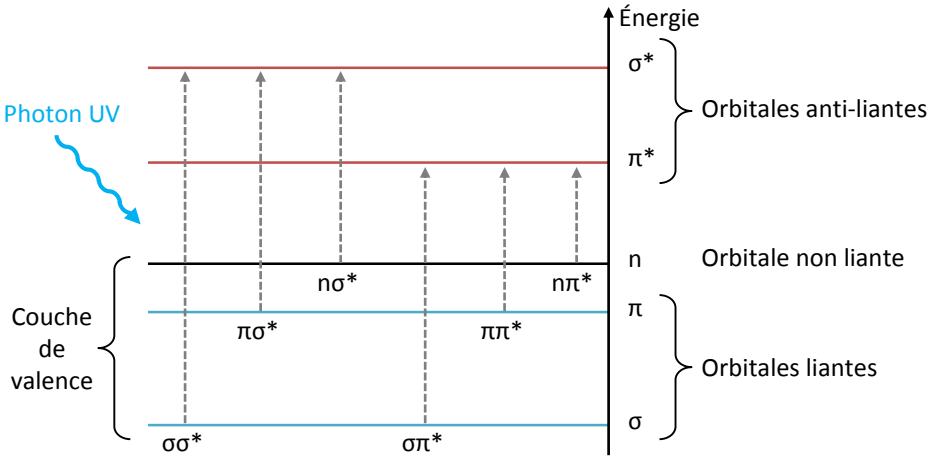


Figure 2.2.2 : *Schématisation des transitions moléculaires accessibles par l'absorption d'un photon UV-VUV.*

Nous ne discuterons pas ici de l'absorption des photons infra-rouges (IRMPD, *Infra Red Multi-Photon Dissociation*), qui excitent vibrationnellement les molécules, pour nous concentrer sur les processus d'excitation électronique, de photo-ionisation et de photo-détachement d'électron. La section 5.1.2 du chapitre 5 présente un état de l'art plus détaillé dans le cas des peptides et des protéines protonés.

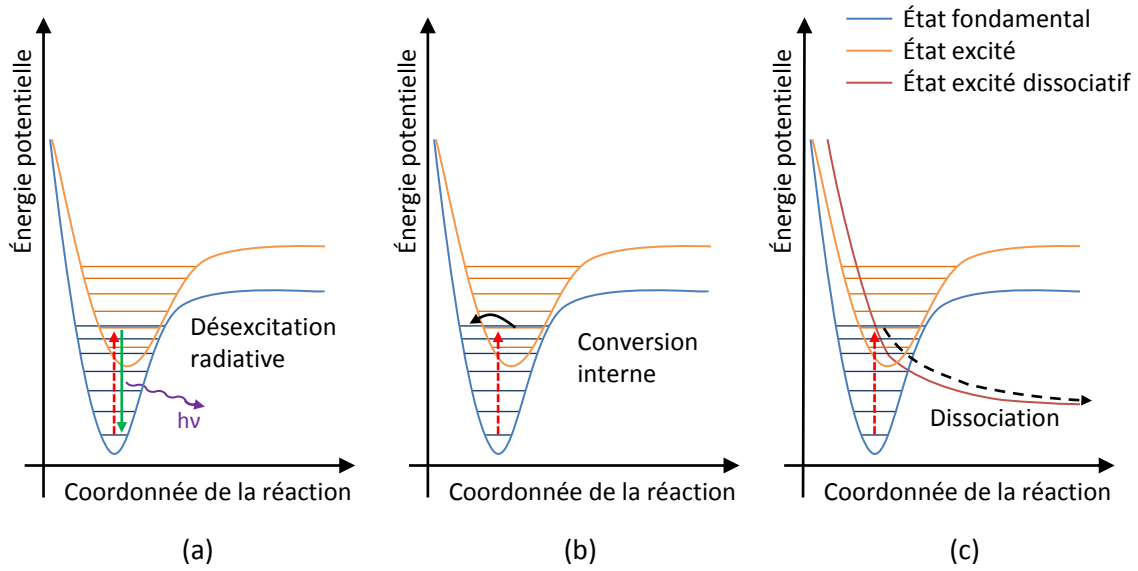


Figure 2.2.3 : *Schématisation de différentes voies de relaxation d'une molécule après excitation électronique (symbolisée par la flèche rouge).* ***(a)*** *Désexcitation radiative de l'état excité vers l'état fondamental.* ***(b)*** *Conversion interne de l'énergie d'excitation électronique en énergie vibrationnelle de l'état fondamental, pouvant être suivie d'une redistribution dans différents modes de vibration de la molécule.* ***(c)*** *Excitation vers un état excité dissociatif pouvant provoquer une dissociation de la molécule.*

Excitation électronique par photon UV

La photo-absorption dans l'UV par un chromophore permet d'exciter des électrons via des transitions moléculaires spécifiques, et peut être suivie de la dissociation du système selon le processus 2.2.1 :

$$AB \xrightarrow{h\nu} AB^* \longrightarrow A + B \tag{2.2.1}$$

Dans l'UV, les nucléobases absorbent fortement à 260 nm ($\sim$ 4,8 eV) [18], portant un électron d'une orbitale moléculaire π vers une orbitale excitée π^* (transition $\pi\pi^*$). En général, l'état excité $\pi\pi^*$ a une très courte durée de vie (inférieur à la picoseconde) [19]. La désexcitation peut se faire via une intersection avec un état $\pi\sigma^*$ qui est dissociatif dans le cas de l'adenine neutre et provoque une perte d'atome d'hydrogène depuis l'azote N-H normalement impliqué dans la liaison glycosidique [20]. Dans le cas des mononucleotides déprotonés, le photon est aussi absorbé par la nucléobase [21, 22]. La fragmentation du système se produit dans l'état fondamental, après la redistribution de l'énergie dans les modes de vibration de la molécule. Des ruptures de la liaison glycosidique et de la liaison phosphate/sucre (rupture du squelette), typiques de la dissociation d'origine vibrationnelle de ces systèmes, sont principalement observées [22].

Pour les acides aminés, seuls ceux composés d'une chaîne latérale aromatique (tyrosine, tryptophane et phénylalanine) absorbent dans l'UV autour de 260-280 nm [23, 24]. Une énergie plus importante ($\lambda <$ 240 nm) est nécessaire pour exciter les acides aminés et les peptides

via les électrons des groupements NH et C=O des liaisons peptidiques [25]. Dans le cas des acides aminés aromatiques protonés, deux voies de dissociation sont principalement observées après l'excitation d'un électron du chromophore dans un état $\pi\pi^*$. D'une part, la perte d'un atome d'hydrogène peut se faire depuis l'état $\pi\sigma^*_{\mathrm{NH_3}}$ après transfert de l'électron excité vers le groupement NH_3, et d'autre part la rupture de la liaison C_α-C_β (liaison entre le « squelette » et la chaîne latérale) directement depuis l'état $\pi\pi^*$ ou après un transfert vers l'orbitale $\pi\pi^*_{\mathrm{CO}}$ du groupe carboxyle [26, 27].

Dans des peptides protonés contenant ces acides aminés, la fragmentation se fait à proximité du chromophore par rupture d'une liaison peptidique [28, 29] ou par la perte d'un atome d'hydrogène ou de la chaîne latérale aromatique absorbant le photon [30], comme observé lorsqu'ils sont isolés. Aux longueurs d'ondes de 193 nm (6,4 eV) et 157 nm (7,9 eV), la fragmentation des peptides par rupture des liaisons peptidiques est forte et forme une multitude de fragment de tous types (a, b, c, x, y et z) répartis sur toute la séquence peptidique [31]. Si la formation des ions b/y est commune avec les processus de dissociation induite par excitation vibrationnelle (CID, IRMPD) [32], la rupture homolytique menant à la production les ions a/x est plus spécifique de l'absorption d'un photon énergétique [33, 34].

Dissociation et ionisation par photon VUV et X

L'absorption d'un photon VUV ou X peut déposer suffisamment d'énergie pour libérer un électron et laisser la molécule protonée sous la forme d'un photo-ion radicalaire, soit dans l'état fondamental, soit dans un état électronique excité pouvant entraîner sa fragmentation. En particulier, les photons VUV permettent d'ioniser les systèmes moléculaires en arrachant des électrons des couches de valence. Un photon X est capable d'exciter (processus 2.2.2) ou de libérer (processus 2.2.3) un électron de cœur des orbitales atomiques 1s [35]. Le réarrangement du cortège électronique qui suit ces processus peut donner lieu à l'éjection d'un électron par un processus Auger résonant ou non [36, 37] (figure 2.2.4). Plusieurs électrons peuvent aussi être éjectés de cette manière via des processus Auger résonants simultanés ou en cascade [38, 39]. L'ion moléculaire peut toutefois avoir encore assez d'énergie interne pour fragmenter.

$$\begin{aligned} M^{n+} &\xrightarrow{h\nu} M^{n+*} \\ M^{n+*} &\longrightarrow M^{(n+k)+\bullet} + ke^- \end{aligned} \tag{2.2.2}$$

$$\begin{aligned} M^{n+} &\xrightarrow{h\nu} M^{(n+1)+\bullet *} \\ M^{(n+1)+\bullet *} &\longrightarrow M^{(n+1+k)+\bullet} + (k+1)e^- \end{aligned} \tag{2.2.3}$$

La réponse des nucléobases et des acides aminés à l'absorption d'un photon VUV ionisant est différente, les premières présentant, comme dans l'UV, une certaine « photo-stabilité ». Alors

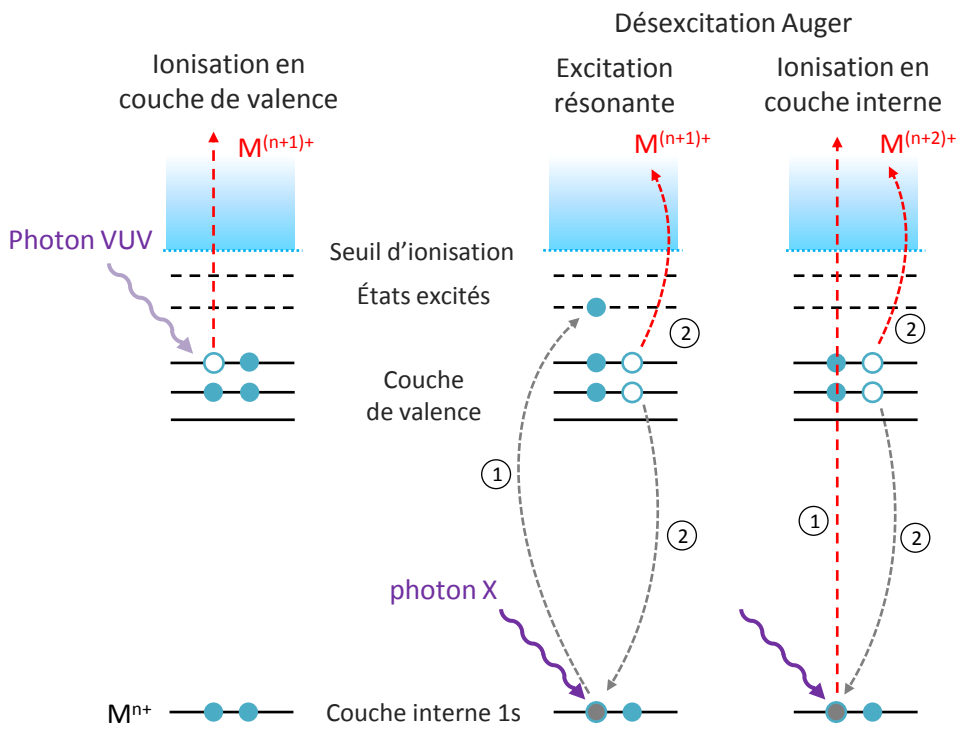


Figure 2.2.4 : *Représentation schématique, pour une molécule protonée M^{n+}, des processus d'ionisation en couche de valence par photon VUV, d'excitation et d'ionisation en couche interne 1s par photon X, suivie de l'émission d'un électron par désexcitation Auger.*

que les énergies d'ionisation des formes neutres des nucléobases et de la glycine sont proches ($\sim$ 8-9 eV), leur seuil d'énergie de dissociation après ionisation varie de 0,36 eV pour la glycine à 3,36 eV pour l'adénine [41]. Cette plus grande stabilité des nucléobases peut être associée à leur structure cyclique [40, 41]. Les voies de fragmentation de plus basse énergie impliquent la perte de HCN pour l'adénine qui nécessite la rupture de deux liaisons covalentes, et la perte de COOH pour la glycine c'est-à-dire une rupture de la liaison C_α-C [40, 41]. En augmentant l'énergie du photon absorbé, la dissociation de ces systèmes augmente avec l'apparition de plus petits fragments, comme par exemple, des pertes successives de HCN pour l'adenine (figure 2.2.5).

Pour des dérivés des acides nucléiques plus grands, comme l'adénosine monophosphate protonée (AMP) $[AMP+H]^+$ [42] ou l'oligonucléotide $[dGCAT+2H]^{2+}$ [43], l'absorption d'un photon VUV d'énergie proche du seuil d'ionisation entraîne principalement la rupture d'une liaison glycosidique et la détection de la base protonée correspondante $[B+H]^+$. En augmentant l'énergie du photon, le sucre ionisé apparaît et devient majoritaire devant les bases dans le cas de l'ionisation en couche 1s [43]. On peut noter que ce fragment requiert la perte de la base mais aussi une rupture du squelette, ce qui se traduit par une rupture de brin pour l'acide nucléique. De plus, il semble que la taille de l'AMP ne lui permette pas de rester intact après

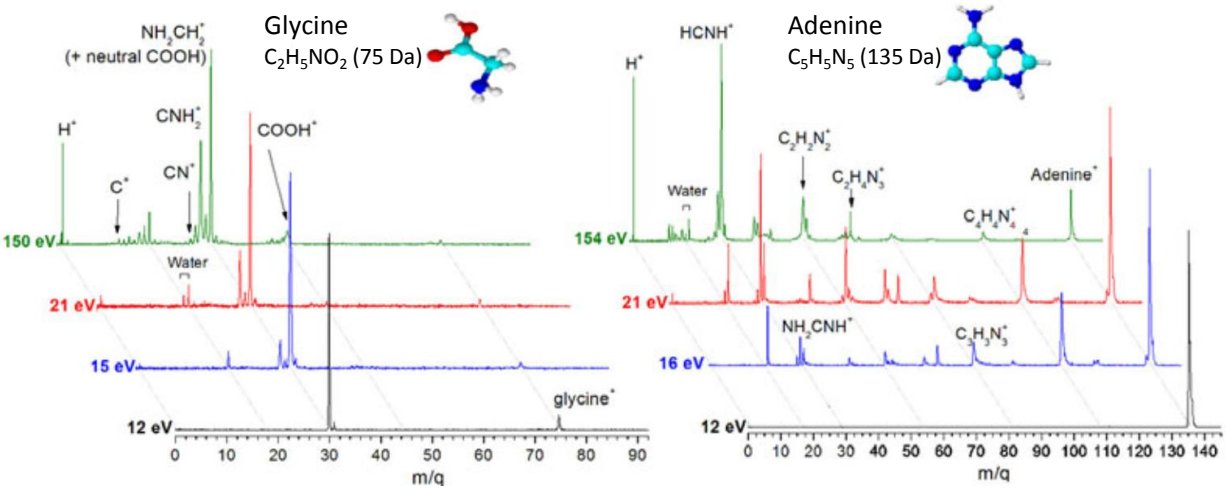


Figure 2.2.5 : *Spectre de masse de la glycine et de l'adénine pour différentes énergies de photons, par Pilling et co. [40].*

ionisation [42] alors que l'oligonucléotide photo-ionisé intact $[dGCAT+2H]^{3+\bullet}$, qui est plus gros, est observé pour des photons de 15 eV et jusqu'à au moins 40 eV [43] .

Pour les peptides protonés longs de quelques acides aminés, l'absorption d'un photon d'énergie proche du seuil d'ionisation, ou inférieur de quelques eV, entraîne majoritairement la perte de chaînes latérales depuis l'ion parent [44, 45]. Au dessus du seuil d'ionisation, le peptide photo-ionisé est observé intact et également avec des pertes de molécules neutres, attribuées aux chaînes latérales [44]. Dans une moindre mesure, la fragmentation du squelette produit une variété d'ions de tous types répartis sur l'ensemble du peptide. En comparaison, l'absorption d'un photon par une protéine telle que le cytochrome c (104 acides aminés, 12,4 kDa) entraîne uniquement sa ionisation, sans fragmentation du squelette [46]. Dans le cas de l'absorption d'un photon X en couche interne 1s, les protéines restent intactes après l'éjection de plusieurs électrons via des processus Auger (figure 2.2.6a) [47, 48], alors que les plus petits peptides fragmentent complétement [48, 49]. Ce résultat est semblable à celui observé dans le cas de la photo-ionisation dans l'UV pour l'AMP [42] et l'oligonucleotide dGCAT [43], et suggère que la survie du système à l'ionisation (simple ou multiple) dépend de sa taille.

Photo-détachement d'électron

Le photo-détachement d'électron (EPD, *Electron PhotoDetachment*) correspond au phénomène résultant de l'absorption d'un photon par une molécule déprotonée $[M\text{-}nH]^{n-}$. Contrairement au cas de la photo-absorption UV d'une molécule protonée qui provoque principalement sa dissociation, le principal mécanisme de relaxation dans le cas de l'EPD est l'éjection d'un électron qui laisse la molécule sous forme radicalaire et avec une charge réduite (processus 2.2.4 et figure 2.2.6b) [51]. Le photo-détachement de l'électron est un processus rapide qui intervient avant la redistribution de l'énergie dans les modes de vibration [51]. Comme cette

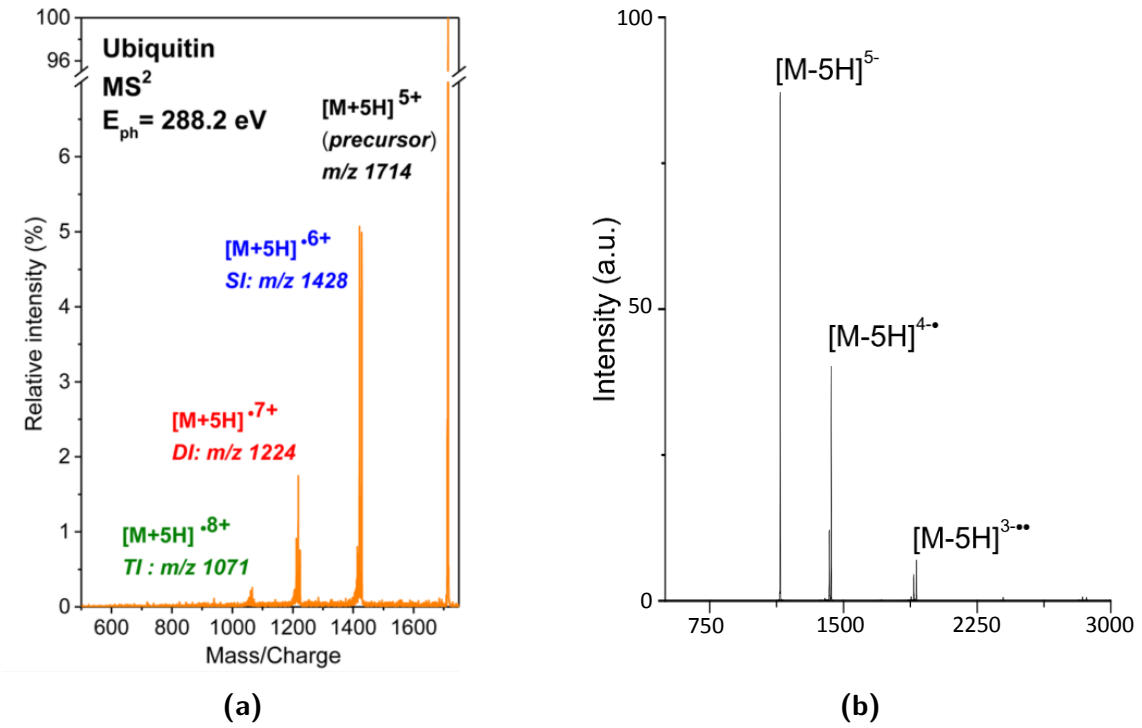


Figure 2.2.6 : ***(a)*** *Spectre de masse de l'ubiquitine protonée, [M+5H]$^{5+}$ (m/q = 1714), après absorption d'un photon de 288,2 eV (énergie d'excitation d'un électron de couche 1s du carbone) [47].* ***(b)*** *Spectre de masse de l'insuline déprotonée, [M-5H]$^{5-}$ (m/q = 1145), après absorption d'un photon de 15 eV [50].*

technique requiert des molécules multi-déprotonées, elle est principalement appliquée à des systèmes moléculaires de grande taille (oligonucleotides, peptides, protéines).

$$[M - nH]^{n-} \xrightarrow{h\nu} [M - nH]^{(n-1)-\bullet} + e^- \tag{2.2.4}$$

Dans le cas de l'absorption d'un photon UV par des oligonucleotides, l'EPD est fortement lié à la composition des nucléobases (qui absorbent les photons dans l'UV) mais n'implique pas le squelette ribose/phosphate [52]. En particulier, l'efficacité de l'EPD à une longueur d'onde donnée est d'autant plus grande que les nucléobases présentes ont une faible énergie d'ionisation [52]. Comme la guanine est la nucléobase ayant le potentiel d'ionisation le plus bas, l'EPD est un processus d'autant plus efficace que le nombre de guanines est grand [52, 53]. Cette technique n'entraîne pas la dissociation de complexes non covalents et peut d'ailleurs permettre de sonder leur structure quaternaire en phase gazeuse (formation de duplex ou de quadruplex par exemple) [54]. Des mécanismes similaires sont impliqués dans le cas de l'EPD de peptides et de protéines induits par photon UV [51, 55].

L'activation vibrationnelle par CID de l'anion radicalaire, $[M\text{-}nH]^{(n-1)-\bullet}$, produit par l'EPD, entraîne une fragmentation en partie causée par l'action du radical et différente de celle pouvant être obtenue par CID de la molécule parente $[M\text{-}nH]^{n-}$. Dans le cas des oligonucléotides, une variété de fragments du squelette et une très forte proportion de pertes de molécules neutres

(nucléobase, CO, H_2O/NH_3) sont produites [53, 56]. Pour les peptides, cela entraîne aussi la perte de molécules neutres (chaînes latérales, majoritairement CO_2 des groupements carboxyliques déprotonés des acides aspartiques et glutamiques et du C-terminal) ainsi que la rupture du squelette produisant de nombreux fragments répartis sur l'ensemble de la séquence, dont majoritairement les ions a/x [51, 55, 57].

L'absorption d'un photon VUV par une protéine déprotonée peut éjecter plusieurs électrons sans entraîner la fragmentation du système [50, 58, 59] (figure 2.2.6b). Contrairement à l'ionisation des protéines protonées [60], l'augmentation de l'état de charge initial de la protéine n'affecte pas le seuil d'énergie du multi-détachement d'électron mais améliore la probabilité du processus [58].

Ainsi, le photo-détachement d'électrons pour des systèmes déprotonés et la photo-ionisation de systèmes neutres ou protonés, sont des sources importantes de production d'électrons. Ces électrons, lorsqu'ils entrent en interaction avec la matière biologique, peuvent alors entraîner des dommages via différents processus.

2.2.2 Interaction électrons - biomolécules

Les électrons mis en mouvement dans la matière lors de l'ionisation du milieu par le rayonnement primaire sont produits sur une très large gamme d'énergie. Par exemple, l'ionisation par effet photo-électrique ou par diffusion Compton de photons « thérapeutiques » (de l'ordre de la centaine de keV à quelques MeV) peut libérer des électrons de plusieurs centaines de keV d'énergie cinétique, tandis que des électrons « secondaires » ont de plus faibles énergies, de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines d'eV. En interagissant avec la matière (ionisation, excitation), ces électrons vont rapidement perdre leur énergie et peuvent atteindre, en fin de parcours, une énergie inférieure au seuil d'ionisation des molécules du milieu. Dans cette gamme, l'électron est alors susceptible d'être capturé par une molécule par un processus résonant. Ce dernier processus est la source d'importants dommages dans la matière biologique, pouvant notamment être à l'origine de rupture des brins d'ADN [61–63].

Attachement électronique dissociatif

L'attachement d'un électron de basse énergie ($<$ 10 eV) sur une molécule neutre est un processus résonant qui dépend de l'énergie de l'électron et qui peut entraîner la fragmentation de la molécule (DEA, *Dissociative Electron Attachment*). En fonction de l'énergie de l'électron et de l'orbitale sur lequel celui-ci s'attache, la molécule peut relaxer soit en éjectant cet électron soit en se dissociant (processus 2.2.5).

$$AB + e^- \longrightarrow AB^{-*} \longrightarrow A^- + B \tag{2.2.5}$$

Pour les nucléobases, la principale voie de dissociation après attachement d'un électron d'environ 1 eV est la perte d'un atome d'hydrogène [64]. Par exemple dans le cas de la thymine,

cette résonance possède deux structures centrées à 1,0 eV et 1,8 eV qui différencient le groupe N-H duquel l'hydrogène est éjecté. La première résonance correspond à l'azote normalement impliqué dans la liaison glycosidique, tandis que la seconde implique l'azote de la liaison non covalente avec la base complémentaire du second brin dans l'ADN [65]. À plus haute énergie (5-12 eV), la perte d'hydrogène est aussi observée par rupture d'une liaison N-H ($\sim$ 5-7 eV) ou C-H ($\sim$ 8-10 eV) [66], et plusieurs fragments peuvent être produits par la dissociation de l'hétérocycle [67]. Pour la thymidine (nucléoside), les mêmes résonances autour de 1 eV sont observées et impliquent la rupture de la liaison glycosidique (1,2 eV) et la perte d'un atome d'hydrogène (1,8 eV), ce qui est cohérent avec le site N-H sélectionné par ces résonances dans le cas de la nucléobase seule [68]. Enfin dans le cas de la molécule ribose-5-phosphate (groupement phosphate + sucre), l'attachement d'un électron proche de 0 eV entraîne la rupture de la liaison phosphate-sucre, ce qui peut être interprété comme la rupture d'un brin de l'ADN [69].

Pour les acides aminés, l'attachement d'un électron autour de 1 eV (résonance à $\sim$ 1,4 eV) entraîne la perte d'un atome d'hydrogène mais, à plus haute énergie (5-10 eV), provoque principalement la rupture de la liaison C_α-C [70–74]. Dans le cas des peptides, la probabilité de la perte d'un atome d'hydrogène diminue avec le nombre d'acides aminés. Des fragments de types c/z deviennent majoritaires, formés par la rupture de la liaison N-C_α affaiblie par l'attachement de l'électron sur une orbitale π^* ou σ^* des groupements de la liaison peptidique NH et C=O [75].

Dissociation par capture d'électron

La dissociation par capture d'électron (ECD, *Electron Capture Dissociation*) réfère au processus de l'attachement d'un électron de basse énergie (0,1 - 10 eV) sur une molécule chargée positivement, donc généralement protonée (processus 2.2.6). La probabilité de cette capture augmente avec l'état de charge initial de la molécule [76].

$$[M + nH]^{n+} + e^- \longrightarrow [M + nH]^{(n-1)+\bullet *} \tag{2.2.6}$$

Dans le cas des acides nucléiques, qui ne sont toutefois pas présents à l'état protoné dans l'ADN, l'ECD peut provoquer la perte de nucléobases neutres ainsi que des ruptures des liaisons phosphate-sucre (rupture de brin) [77, 78]. Pour les protéines, les fragments c/z et ceux formés par rupture de liaisons dissulfides S-S sont majoritairement produits [76] comme dans le cas du DEA pour des petits peptides [75]. La dissociation du radical cation implique un mécanisme radicalaire et se fait de manière non statistique (différent de la CID). Les liaisons non-covalentes intramoléculaires (la structure secondaire) sont donc conservées par ECD [76, 79, 80].

Détachement d'électron dissociatif

L'interaction d'un électron d'énergie supérieure à 10 eV sur une molécule déprotonée (EDD, *Electron Detachment Dissociation*) entraîne l'éjection d'un électron (processus 2.2.7). Ce pro-

cessus présente certaines similitudes avec l'EPD [81].

$$[M - nH]^{n-} + e^- \longrightarrow [M + nH]^{(n-1)-\bullet *} + 2e^- \tag{2.2.7}$$

Comme dans le cas de l'activation vibrationnelle de l'anion radicalaire créé en EPD, l'EDD de protéine provoque une importante perte de CO_2 depuis l'anion radicalaire, ainsi que la rupture du squelette (fragments a/x majoritaires), préférentiellement à proximité des acides aspartiques et glutamiques portant la charge [82, 83]. Le même type de fragmentation est aussi observé dans le cas des olignucléotides [84]. Toutefois, comme une plus grande énergie est apportée par ces électrons que par les photons UV, la présence de la guanine ne semble plus être un facteur déterminant pour le détachement de l'électron [53, 84].

Ionisation par impact d'électron

L'impact d'électron (EI, *Electron Impact*) de haute énergie peut être utilisé pour ioniser des molécules protonées (processus 2.2.8).

$$[M + nH]^{n+} + e^- \longrightarrow [M + nH]^{(n+1)+\bullet *} + 2e^- \tag{2.2.8}$$

L'impact électronique au dessus du seuil d'ionisation pour des peptides ou des protéines présente des résultats très similaires à l'ionisation par photon VUV ou X [85–88]. L'énergie d'ionisation des peptides protonés $[M+H]^+$, de masse comprise en 1 et 3 kDa, est d'environ 10 -11 eV [85]. L'absence du peptide ionisé intact pour de plus petits systèmes suggère, ici aussi, un effet de la taille du peptide sur sa survie après ionisation [85]. La dissociation succédant à l'ionisation se fait majoritairement par des pertes de molécules neutres (chaînes latérales) depuis le peptide ionisé, ainsi que par des ruptures du squelette formant des fragments a/x et c/z répartis sur l'ensemble du peptide [87]. Comme pour l'ionisation par photons X, l'impact d'un électron de 288 eV provoque l'éjection d'un électron de la couche 1s du carbone. Ce processus peut être suivi par l'émission d'un électron Auger pour former le peptide doublement ionisé $[M+nH]^{(n+2)+\bullet\bullet}$ [88] (figure 2.2.7).

En résumé, les processus induits par l'interaction d'un électron avec les molécules d'intérêt biologique dépendent fortement de l'énergie initiale de l'électron et du potentiel d'ionisation du système. En dessous du seuil d'ionisation, l'électron peut être capturé par la molécule et provoquer sa dissociation (DEA, ECD). Au-dessus du seuil d'ionisation (EDD, EI), l'électron incident entraîne l'éjection d'un ou plusieurs électrons d'une manière similaire à l'absorption d'un photon de même énergie (VUV, X), ce qui peut être vu comme une source d'électrons secondaires. Ceci laisse le système sous forme radicalaire et, dans le cas des peptides, provoque majoritairement des pertes de molécules neutres et la production des fragments a/x.

Ainsi, il semble que la réaction à l'ionisation de tels systèmes soit similaire que ce soit par l'interaction avec un photon ou avec un électron. Les ions mono- et -multichargés sont un autre type de projectile capable de provoquer l'ionisation de systèmes moléculaires, et donc aussi de générer de nombreux électrons secondaires. Comme la nature de ces particules est très

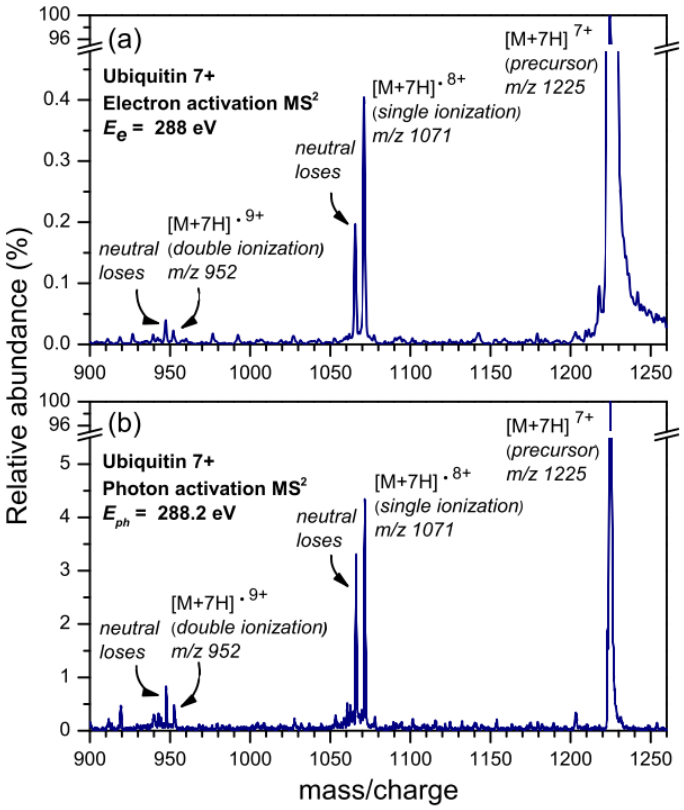


Figure 2.2.7 : *Spectre de masse de l'ubiquine protonée $[M+7H]^{7+}$ après impact électronique à 288 eV ou absorption d'un photon de 288,2 eV [88].*

différente des électrons et des photons, différents processus moléculaires peuvent être impliqués lors de leur interaction avec les molécules.

2.2.3 Interaction ions atomiques - biomolécules

L'interaction entre un ion atomique projectile (A^{q+}) et une molécule peut impliquer différents processus qui dépendent des caractéristiques du projectile, telles que son état de charge q et sa vitesse v_p (nous l'exprimerons en unité atomique ua, dans la suite de cette section : 1 ua $= 2{,}19.10^6$ m/s) . À haute vélocité ($v_p > 1$ ua) les processus d'excitation (processus 2.2.9) et d'ionisation (processus 2.2.10) sont dominants.

$$M + A^{q+} \longrightarrow M^* + A^{q+*} \tag{2.2.9}$$

$$M + A^{q+} \longrightarrow M^{n+\bullet *} + ne^- + A^{q+*} \tag{2.2.10}$$

Lorsque la vitesse du projectile est inférieure à la vitesse des électrons de la cible ($v_p \ll 1$ ua), le processus de capture électronique (processus 2.2.11) devient le processus dominant. Celui-ci implique un transfert de charge de la cible vers le projectile. De cette manière, l'électron arraché à la molécule n'est pas éjecté comme un électron libre et, dans la matière, ne participe pas aux

rayonnements secondaires.

$$M + A^{q+} \longrightarrow M^{n+\bullet *} + A^{(q-n)+*} \tag{2.2.11}$$

Cependant dans le cas des expériences qui sont présentées par la suite, la vitesse des ions projectiles est proche de 1 ua et les processus d'ionisation et de capture peuvent cœxister (processus 2.2.12).

$$M + A^{q+} \longrightarrow M^{(n+m)+\bullet *} + A^{(q-n)+*} + me^{-} \tag{2.2.12}$$

Le paramètre d'impact, c'est-à-dire la distance à laquelle se fait l'interaction, a un rôle important sur la probabilité de ces processus. À grands paramètres d'impacts, la capture électronique est le processus le plus favorable tandis qu'à petit paramètre d'impact, l'ionisation est plus probable. Ainsi, en variant les caractéristiques du projectile, il est possible de favoriser certains de ces processus par rapport aux autres et d'étudier leur influence sur les voies de fragmentation des molécules.

Toutefois, la multiplicité et la complexité des processus d'interaction ne permet pas une analyse fine de la collision avec un simple spectre de masse, mais peut être réalisée grâce à des mesures complémentaires. Par exemple, la détection des fragments chargés en coïncidence [89, 90] permet, entre autres, de connaître l'état de charge de la molécule avant sa fragmentation. Celle de l'état de charge final du projectile [91–94] et du nombre d'électrons éjectés par la cible [91, 95, 96] permet de différencier les processus d'ionisations et de captures électroniques. La mesure de l'énergie cinétique perdue par le projectile pendant la collision [97, 98] permet, quant à elle, de remonter à l'énergie d'excitation transférée dans la molécule. En complément de ces mesures, les calculs de dynamique moléculaire *ab initio* se sont révélés être un outil puissant pour analyser les résultats de ces collisions [90, 99]. On peut noter que jusqu'à maintenant, la grande majorité des expériences sur des molécules d'intérêt biologique ont été réalisées avec des espèces neutres produites par évaporation thermique. Seulement très récemment, quelques études ont été menées sur des biomolécules plus larges produites par électronébulisation [43, 100–102].

De manière générale, pour une molécule donnée, les caractéristiques du projectile (numéro atomique, charge, vitesse) ont peu d'influence sur la nature des fragments observés mais peuvent modifier leur intensité relative. La multi-ionisation et la multi-capture sont des processus possibles et plus probables à faible paramètre d'impact. Par exemple pour la molécule d'adénine, la capture de trois électrons par un ion F^{2+} à 30 keV (0,18 ua) représente $\sim$1 % de tous les événements de capture électronique [92], et jusqu'à sept électrons peuvent être capturés par un ion Ar^{8+} à 30 keV (0,06 ua) [91]. On peut noter que l'utilisation d'ions He^{+} comme projectile induit, à basse énergie, une fragmentation souvent plus intense que pour les autres ions. Ce phénomène peut être attribué au fait que les niveaux d'énergie de cet ion ne soient pas résonants avec celui du plus haut état moléculaire occupé (HOMO, *Highest Occupied Molecular Orbital*), ce qui peut impliquer une plus grande énergie d'excitation transférée à la molécule cible [89, 100, 101, 103–105].

Dans le cas des nucléobases, le cation formé par la collision peut généralement être détecté intact alors que le dication est plus instable et fragmente dans la majorité des cas [93, 95, 104].

L'adenine fragmente par évaporation de molécules neutres de HCN et forme majoritairement le fragment CNH_2^+. La multi-ionisation favorise la formation de petits fragments tels que H^+ ou C^+ [95,96]. Cette plus forte fragmentation peut-être due à une plus grande énergie déposée via un petit paramètre d'impact (projectiles peu multichargés) ou à une explosion coulombienne de la molécule. Pour l'uracile, la collision avec des protons de 20 à 150 keV produit principalement les fragments CO^+, CNO^+ et $C_3H_3NO^+$ [94, 106]. Ces mêmes fragments sont observés par collision des ions C^{6+} à 42 MeV sans atomisation de la molécule [107].

La molécule de déoxyribose isolée présente une forte fragmentation et une très faible survie du cation [103]. Il a été mesuré que l'énergie d'excitation déposée en moyenne dans la molécule lors de la double capture d'électron par des protons de 3 et 7 keV est, respectivement, de 6,5 eV et 11 eV [98]. Une plus grande énergie d'excitation permet de former les plus petits fragments. De plus, l'intensité des différents fragments varie selon une loi de puissance caractéristique d'une fragmentation statistique, où les plus petits fragments sont formés en majorité par rapport aux plus gros [103]. La constante de proportionnalité k de cette loi dépend du projectile et il a été proposé qu'elle puisse être reliée à l'énergie d'excitation déposée dans la molécule [98].

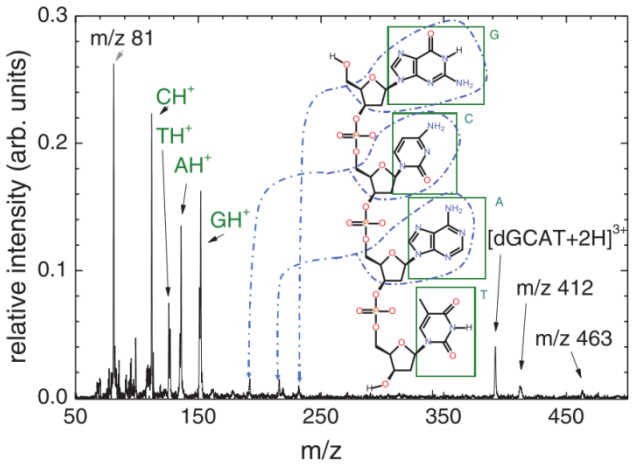


Figure 2.2.8 : *Spectre de masse de l'oligonucléotide protoné $[dGCAT+2H]^{2+}$ après collision, dans un piège de Paul, avec des ions C^{4+} à 40 keV. Le pic à $m/z = 81$ peut être attribué à $C_5H_5O^+$ du sucre [43].*

Les collisions entre des ions et des nucléosides ne permettent pas au cation de rester intact mais entraîne sa fragmentation principalement via la rupture de la liaison glycosidique. Pour les nucléosides composés d'une base d'adénine, de cytosine ou de guanine, cette rupture mène à la formation de la base cationique, tandis que pour la thymine, dont l'énergie d'ionisation est la plus élevée, la charge reste préférentiellement sur le sucre qui peut être détecté intact [108,109]. Des séries de fragments de plus petites masses sont observées mais ne peuvent être attribuées sans ambiguïté à des fragments de la base ou du sucre. Pour un système plus grand comme l'oligonucléotide doublement protoné $[dGCAT+2H]^{2+}$ en interaction avec des ions carbones multichargés, la fragmentation suit un principe assez similaire [43]. Le système peut survivre à

l'ionisation, mais les fragments majoritaires sont les quatre bases (la thymine ayant l'intensité la plus faible) et le sucre dont la formation implique une (ou deux) rupture de brin et la perte d'une base [43] (figure 2.2.8).

Pour les quelques acides aminés étudiés jusqu'à maintenant (glycine, valine et alanine), la survie du cation formé lors de la collision est bien plus faible que dans le cas des nucléobases et la rupture de la liaison C_α-C est la voie de fragmentation majoritaire [90,99,105,110]. Comme la charge est préférentiellement retenue sur le groupe NH_2, le cation formé par la perte de COOH est observé. Cependant le fragment $COOH^+$ peut-être observé dans des conditions de double ionisation/capture électronique où la charge est répartie sur la molécule [90, 110]. Des calculs de dynamique moléculaire sur le dication de glycine montrent que l'explosion coulombienne est le processus de fragmentation dominant lorsque peu d'énergie d'excitation est transférée dans la molécule, et peut intervenir dès ∼30 fs [90].

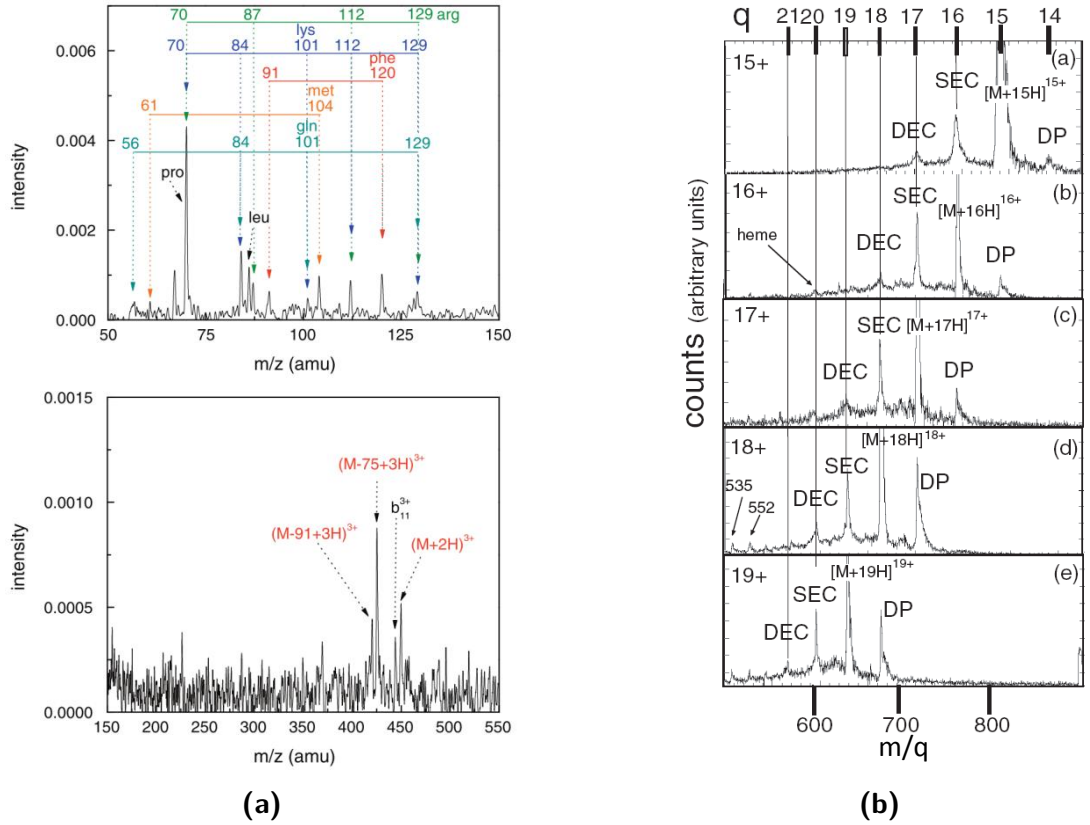


Figure 2.2.9 : ***(a)*** *Spectre de masse de la substance P (1347 Da) doublement protonée $[M+2H]^{2+}$, après collision, dans un piège de Paul, avec des ions H^+ à 5 keV [101].* ***(b)*** *Spectre de masse du cytochrome C (12,5 kDa) d'état de charge 15+ à 19+, après collision dans un piège de Paul avec des ions Xe^{8+} à 96 keV [102]. Les pics « SEC » et « DEC » indiquent respectivement les produits de la capture simple et double, et le pic « DP » indique celui de la déprotonation de la protéine.*

La fragmentation des peptides protonés de masse comprise entre 555 Da (leucine - enképhaline) et 1357 Da (substance P), par collision avec des ions (H^+, He^+, He^{2+}), présente

un schéma similaire [100, 101]. Le peptide ionisé peut être observé intact et avec la perte de chaînes latérales neutres ou parfois chargées [101]. Toutefois la fragmentation du peptide est généralement intense et produit de nombreux ions de rapport m/q inférieur à 150. La majorité de ces fragments sont des acides aminés avec une chaîne latérale complète ou partielle (figure 2.2.9a). Quelques fragments du squelette peptidique (a, b, c, y, z) sont observés, mais les ions complémentaires sont absents des spectres de masse [101]. La protéine cytochrome C (12,5 kDa) réagit différemment à l'interaction avec des ions Xe^{8+} à 96 keV [102]. Dans cette collision, l'ion peut arracher jusqu'à deux électrons mais aussi un proton à la protéine, qui peut rester intacte. L'intensité du pic correspondant à ce processus de déprotonation augmente avec l'état de charge initial de la protéine et du projectile (figure 2.2.9b). Toutefois, environ 70 à 80 % des protéines ayant interagi fragmente en une grande variété de fragments pouvant être à l'origine du large fond non résolu présent sur les spectres de masse (figure 2.2.9b).

En conclusion, la plupart des travaux réalisés entre des ions et des molécules d'intérêt biologique ont été comparés aux résultats pouvant être obtenus par impact d'électron (souvent 70 eV) ou par photo-ionisation (VUV, X). Pour chaque système, les spectres de masse sont qualitativement semblables. Les mêmes fragments sont généralement observés mais avec des intensités variables. Si les études sur les nucléobases sont nombreuses, celles sur les acides aminés se sont limitées à seulement quelques uns des vingt acides aminés ce qui permet de comprendre comment leur chaîne latérale peut influencer leur fragmentation. De plus, l'étude des collisions entre des ions et des molécules produites par électronébulisation est un champ d'investigation très large et encore très peu exploré. Ces ions peuvent provoquer des pertes de chaînes latérales chargées et la déprotonation des protéines. Ces deux voies de dissociation, non observées dans le cas des électrons et des photons, méritent d'être étudiées en détail. De nombreux systèmes pourraient intéresser la communauté scientifique, tels que les di- et tri-peptides, qui sont d'excellent candidats pour explorer les mécanismes de dissociation de plus gros peptides, ou encore les composants des acides nucléiques à l'état déprotoné. Enfin, la réalisation de ces expériences au sein d'un piège à ions ne permet pas une analyse fine de la fragmentation et laisse de nombreuses questions sans réponses, comme l'état de charge de la molécule avant sa dissociation ou la raison de l'absence des fragments complémentaires. Ces réponses pourraient être obtenues grâce aux techniques de mesure en coïncidence des fragments de la collision. C'est notamment dans cet esprit que le dispositif PIBALE a été développé. Nous verrons dans le chapitre 4 de quelle manière ce dispositif a été conçu pour répondre à ces questions.

Techniques pour la spectrométrie de masse | 3

Sommaire

3.1 Source à électronébulisation 28

3.2 Confinement des ions par des champs RF inhomogènes 29

3.2.1 Funnel 31

3.2.2 Analyseur en masse quadripolaire 33

3.2.3 Guidages par multipôles 36

3.2.4 Piège de Paul 37

3.2.4.1 Principe du piégeage 37

3.2.4.2 Fonctionnement particulier : injection, accumulation et extraction des ions 39

3.3 Spectromètre de masse à temps de vol 44

3.3.1 Configuration Wiley-Mclaren 45

3.3.1.1 Équation du temps de vol 45

3.3.1.2 Focalisation en position et en vitesse 47

3.4 Détection sensible en position 48

3.4.1 Efficacité de détection des galettes à micro-canaux 49

3.4.2 Fonctionnement d'une anode à lignes à retard 51

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse de particules chargées en phase gazeuse selon leur rapport masse sur charge (m/q). La nécessité d'étudier des systèmes moléculaires de plus en plus complexes (protéines, ADN, etc...) et leurs propriétés physico-chimiques a mené au développement de techniques expérimentales de pointe pour la spectrométrie de masse. L'étude de l'interaction de ces systèmes moléculaires avec des faisceaux de particules (photons, électrons, ions etc...) requiert généralement une densité de molécule cible élevée de façon à maximiser le rapport signal/bruit et minimiser les temps d'acquisition. Ce chapitre présente le principe de fonctionnement des principaux outils expérimentaux utilisés durant cette thèse. Les mécanismes de production en phase gazeuse de molécules chargées par une source d'ionisation par électronébulisation ainsi que les outils pour le guidage, la sélection en masse et le piégeage de ces ions seront détaillés dans un premier temps. Enfin, le fonctionnement d'un spectromètre de masse à temps de vol sera présenté, suivi d'une description des galettes à micro-canaux et leur utilisation comme détecteur sensible en position.

3.1 Source à électronébulisation

Le développement des sources d'ionisation à électronébulisation (ESI), en association avec les méthodes de spectrométrie de masse, a valu à son inventeur John Bennet Fenn le prix Nobel de chimie en 2002 [111, 112]. Cette technique permet la mise en phase gazeuse de molécules fragiles isolées ou de complexes non covalents, ainsi que des systèmes moléculaires de taille plus conséquente, tels que des protéines ou des brins d'ADN. Le perfectionnement de cette technique a notamment permis la mise en phase gazeuse de virus, encore viables après électronébulisation [113].

Cette technique d'ionisation dite "douce" repose sur la production de microgouttelettes chargées à pression atmosphérique. Leur désolvatation conduit à la formation d'ions en phase gazeuse généralement introduits vers des dispositifs expérimentaux sous vide. Initialement, la molécule d'intérêt est dissoute dans un solvant (par exemple 50% eau et 50% méthanol), et se trouve suivant le pH de la solution à l'état protoné $[M+nH]^{n+}$ ou déprotoné $[M-nH]^{n-}$, respectivement par ajout en solution d'un acide (donneur de proton) ou d'une base (accepteur de proton). La solution est injectée à un débit constant de quelques dixièmes de μL.min^{-1} le long d'un fin capillaire jusqu'à une aiguille métallique.

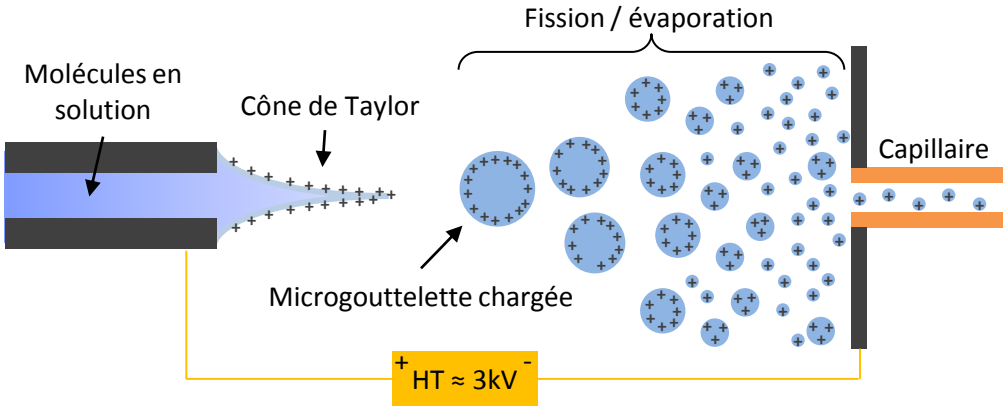


Figure 3.1.1 : *Schéma de principe d'une source d'ionisation à électronébulisation.*

Comme présentée en figure 3.1.1, l'aiguille dans laquelle est injectée la solution est portée à un potentiel de quelques kilovolts, à quelques millimètres d'un capillaire permettant l'interface entre la pression atmosphérique et une pression de 0,1 à 1 mbar. Le champ électrique ainsi créé provoque une accumulation de charges à la pointe de l'aiguille, déformant la surface du fluide jusqu'à prendre la forme d'un cône, dit "de Taylor" [114]. À la pointe du cône de Taylor, la répulsion des charges électriques est telle que de fines gouttelettes chargées de quelques μm de diamètre sont libérées. Un processus répété de fission-évaporation entraîne alors la réduction de la taille des gouttelettes et leur désolvatation. La densité de charge au sein des gouttelettes augmente alors jusqu'à ce que la répulsion électrostatique surpasse la tension de surface, la limite de Rayleigh est atteinte [114]. Il y a alors explosion coulombienne de la gouttelette,

générant plusieurs dizaines de gouttelettes secondaires, elles-mêmes proches de la limite de Rayleigh, et ainsi de suite. Certaines techniques permettent d'accélérer ce processus, tel que l'utilisation d'un capillaire chauffant ou d'un contre flux de N_2 utilisé comme gaz séchant.

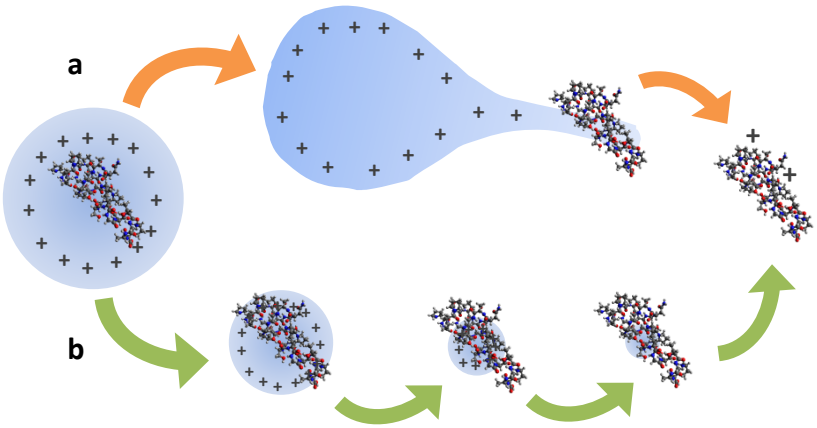


Figure 3.1.2 : *Mécanismes proposés pour la formation d'ions en phase gazeuse à partir d'une micro-gouttelette fortement chargée, en **a** selon le modèle de l'évaporation ionique, et en **b** selon le modèle de la charge résiduelle.*

La dernière étape du processus d'évaporation conduisant à la formation de l'ion complètement désolvaté est complexe et peut s'expliquer au travers de deux modèles distincts : *l'évaporation ionique* [115] et *la charge résiduelle* [116]. Tel que présenté en figure 3.1.2, le premier modèle propose que l'ion peut être extrait directement de la surface de la gouttelette lorsque celle-ci est suffisamment petite (diamètre < 20 nm), alors que le second propose que le processus d'évaporation-fission de la gouttelette se poursuit jusqu'à la formation de l'ion désolvaté. Il est généralement admis que la validation de ces modèles dépend aussi de la nature, de la taille et de l'état de charge de l'ion moléculaire finalement produit.

3.2 Confinement des ions par des champs RF inhomogènes

Les propriétés des ions dans un champ électrique radio-fréquence (RF) inhomogène telles que décrites par D. Gerlich [117], ont trouvé de nombreuses applications dans la physique des particules et la spectroscopie. De tels champs électriques permettent le guidage et le confinement des ions dont la stabilité des trajectoires peut dépendre de leur rapport m/q, donnant le caractère sélectif en masse de ces techniques. Le fonctionnement du funnel, des guides d'ions multipolaires et du piège de Paul sera détaillé ici.
La trajectoire d'un ion de masse m et de charge q évoluant dans un champ RF inhomogène, formé d'une composante statique $\vec{E}_s(\vec{r})$ et d'une composante dépendante du temps

$\vec{E_0}(\vec{r})cos(\Omega t + \phi)$, est décrite par l'équation

$$m\frac{d^2\vec{r}(t)}{dt^2} = q\vec{E_0}(\vec{r})cos(\Omega t + \phi) + q\vec{E_s}(\vec{r}) \tag{3.2.1}$$

où $E_0(\vec{r})$ est l'amplitude de l'oscillation du champ électrique de pulsation $\Omega = 2\pi f$ et de déphasage ϕ.

Dans le cas général, l'équation différentielle 3.2.1 ne trouve pas de solution purement analytique mais trouve une solution approximative sous certaines conditions. Si l'on considère dans un premier temps uniquement la composante dépendante du temps, que le champ électrique E_0 varie peu suivant $\vec{r}$ et que l'oscillation se fait à une fréquence f élevée, l'équation du mouvement $\vec{r}(t)$ suit la superposition de deux termes : un terme de dérive (aussi appelé *mouvement séculaire* ou *macromouvement*) $\vec{R_0}(t)$ et un terme d'oscillation rapide (*micromouvement*) du mouvement $\vec{R_1}(t) = \vec{\alpha}(t)cos(\Omega t)$:

$$\vec{r}(t) = \vec{R_0}(t) + \vec{\alpha}(t)cos(\Omega t) \tag{3.2.2}$$

avec

$$\vec{\alpha}(t) = \frac{q\vec{E_0}\vec{R_0}(t)}{m\Omega^2} \tag{3.2.3}$$

En considérant que $\vec{R_0}(t)$ et $\vec{\alpha}(t)$ varient lentement dans le temps, entraînant que $\dot{\alpha}(t) \ll \Omega\alpha(t)$ et $\ddot{R_0}(t) \ll \dot{R_0}\Omega$, le terme de dérive $\vec{R_0}(t)$ moyen sur une période répond alors à l'équation différentielle suivante :

$$m\frac{d^2\vec{R_0}(t)}{dt^2} = -\frac{q^2}{4m\Omega^2}\vec{\nabla}\|\vec{E_0}\|^2 \tag{3.2.4}$$

Cette équation montre l'effet global dans le temps du champ oscillant sur la trajectoire d'un ion. Cette force dépend de la masse mais pas du signe de la charge de la particule, et elle est dirigée suivant le gradient du champ électrique E_0^2. De cette façon, les particules sont toujours conduites vers les régions où le champ est le plus faible. En incluant de nouveau la composante statique du champ électrique $\vec{E_s}(\vec{r})$, tel que

$$\vec{E_s} = -\vec{\nabla}\Phi_s \tag{3.2.5}$$

où Φ_s est le potentiel électrostatique, on peut alors définir le *pseudo-potentiel* V^*, indépendant du temps, représentant la force moyenne s'exerçant sur un ion dans un champ électrique oscillant inhomogène :

$$V^* = \frac{qE_0^2}{4m\Omega^2} + \Phi_s \tag{3.2.6}$$

Les variations du pseudo-potentiel induites dans certains cas particuliers de géométries d'électrodes peuvent ainsi être à l'origine de forces permettant de guider et confiner efficacement des particules chargées.

3.2.1 Funnel

Le funnel, ou "entonnoir", est un système de guidage et de focalisation pour des ions de faible énergie cinétique. Opérant à des pressions de l'ordre du mbar, il permet d'assurer la transmission des ions à l'interface entre deux étages de pompage différentiel. On le trouve ainsi souvent couplé aux sources ESI [118–121]. Le principe du funnel est semblable à celui des guides d'ions par empilement d'électrodes circulaires [117] illustré sur la figure 3.2.1a. L'empilement d'électrodes circulaires présente des potentiels électriques oscillants de phases opposées entre électrodes adjacentes, créant un champ électrique radial confinant les ions sur l'axe des électrodes. On peut noter que la superposition d'un champ statique adéquat permet d'utiliser cet assemblage comme piège à ions linéaire (*Ring Electrode Trap : RET*) [122].

Le fonctionnement du funnel, illustré par la figure 3.2.1b, repose sur trois principes :

— un potentiel électrique radiofréquence (RF) permet de confiner les ions radialement le long de l'axe pour compenser les déviations des trajectoires des ions dues aux nombreuses collisions sur les molécules du gaz résiduel (libre parcours moyen de $\sim$200 μm à 1 mbar)

— sa forme d'entonnoir favorise la transmission au travers d'une conductance à l'interface entre deux régions de pompage différentiel.

— un champ électrique axial de plusieurs V/cm permet de guider les ions vers la sortie du funnel.

De plus, le différentiel de pression produit un écoulement du gaz résiduel dans l'axe du funnel à des vitesses de l'ordre de la centaine de m/s [123]. Cet écoulement crée une force d'entraînement des ions vers les zones de pressions plus basses, donc vers la sortie du funnel. Elle peut entraîner aussi bien la perte des ions qu'une aide à leur transmission. On peut aussi noter que des collisions énergétiques (quelques eV pour des complexes faiblement liés) avec le gaz peuvent conduire à une augmentation de l'énergie interne des ions moléculaires et à leur fragmentation. Expérimentalement, la qualité de la transmission des ions dépend de la valeur du gradient de potentiel, de l'amplitude V_0 et de la fréquence Ω de l'oscillation RF, de la pression dans la chambre et de la vitesse d'entraînement du gaz dû à la différence de pression avec les chambres adjacentes.

Le pseudo-potentiel créé par la géométrie du funnel dépend du rayon intérieur ρ des électrodes et de leur espacement d, et suit la relation [117, 118] :

$$V^*(r,z) = V_{trap}\left[I_1^2\left(\frac{r}{\delta}\right)cos^2\left(\frac{z}{\delta}\right) + I_0^2\left(\frac{r}{\delta}\right)sin^2\left(\frac{z}{\delta}\right)\right] \tag{3.2.7}$$

avec

$$V_{trap} = \frac{V_{max}}{I_0^2(\rho/\delta)} \tag{3.2.8}$$

$$V_{max} = \frac{qV_0^2}{4m\Omega^2\delta^2} \tag{3.2.9}$$

où V_0 et Ω sont respectivement l'amplitude et la fréquence du potentiel RF, δ=d/π et z est la coordonnée suivant l'axe des électrodes en coordonnées cylindriques, I_0 et I_1 sont respectivement

des fonctions de Bessels d'ordre 0 et 1 [124]. V_{trap} est l'amplitude du puits de potentiel le long de l'axe. V_{max} est la valeur du potentiel à son maximum, lorsque r=ρ et z=d/2 (entre deux électrodes adjacentes).

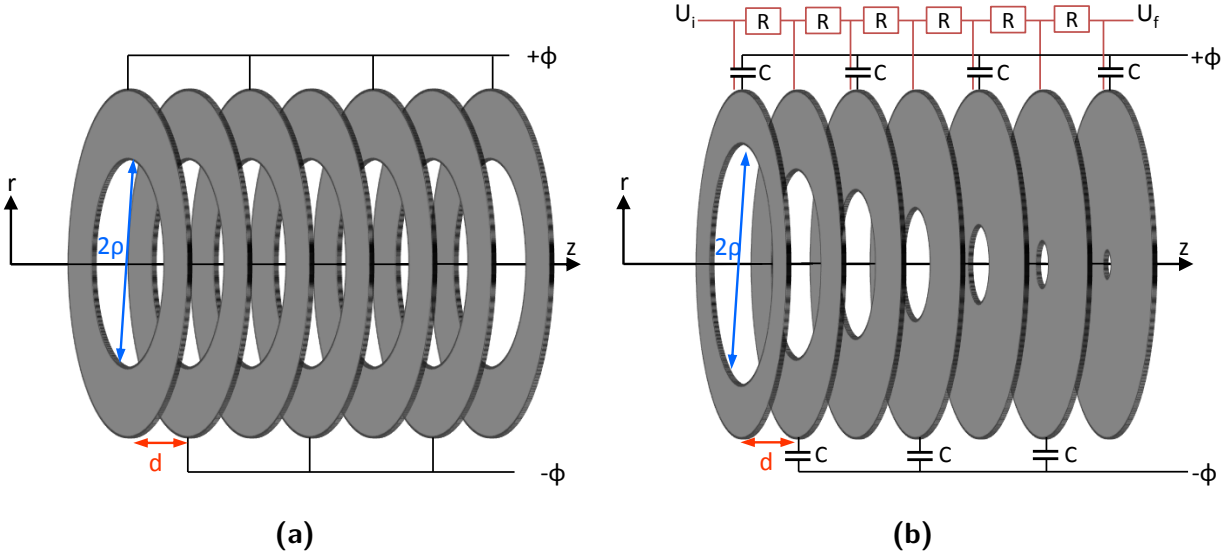


Figure 3.2.1 : *(a) : Vue schématique d'un assemblage d'électrodes circulaires pour le guidage des ions. (b) : Vue schématique d'un assemblage type funnel avec diminution du diamètre intérieur des électrodes. Les tensions continues U_i, U_f et le pont de résistances R permettent d'appliquer un gradient de potentiel suivant l'axe z du funnel. Les capacités C permettent de découpler le potentiel RF du potentiel continu.*

Les travaux de l'équipe de Richard D. Smith [118, 121] font apparaître que ce pseudo-potentiel peut être à l'origine de phénomènes de confinement localisé entre deux électrodes. Dans le cas où d $<$ r $<$ ρ, le pseudo-potentiel $V^*(r)$ peut être approximé par :

$$V^*(r) \approx V_{max}\frac{\rho}{r}\exp\left(\frac{r-\rho}{\delta/2}\right) \tag{3.2.10}$$

Le puits de potentiel V_{trap} le long de l'axe devient :

$$V_{trap} \approx V_{max}2\pi\frac{\rho}{\delta}\exp\left(-\frac{2\rho}{\delta}\right) \tag{3.2.11}$$

En pratique, si V_{trap} est très intense, i.e. proche de V_{max}, le puits de potentiel le long de l'axe devient suffisant pour piéger les ions et empêche leur transfert au travers de l'empilement d'électrodes. La condition pour que $V_{trap} \ll V_{max}$ dépend alors uniquement de la géométrie du système, ρ et d :

$$f(\rho,\delta) = 2\pi^2\frac{\rho}{d}exp\left(-\frac{2\pi\rho}{d}\right) \ll 1 \tag{3.2.12}$$

La figure 3.2.2 présente les valeurs prises par $f(\rho, \delta)$ en fonction de d pour différents diamètres intérieurs des électrodes. La condition pour que $f(\rho, \delta) \ll 1$ impose que la distance entre deux électrodes doit être au moins inférieure à la moitié de leur rayon, d$< \rho/2$.

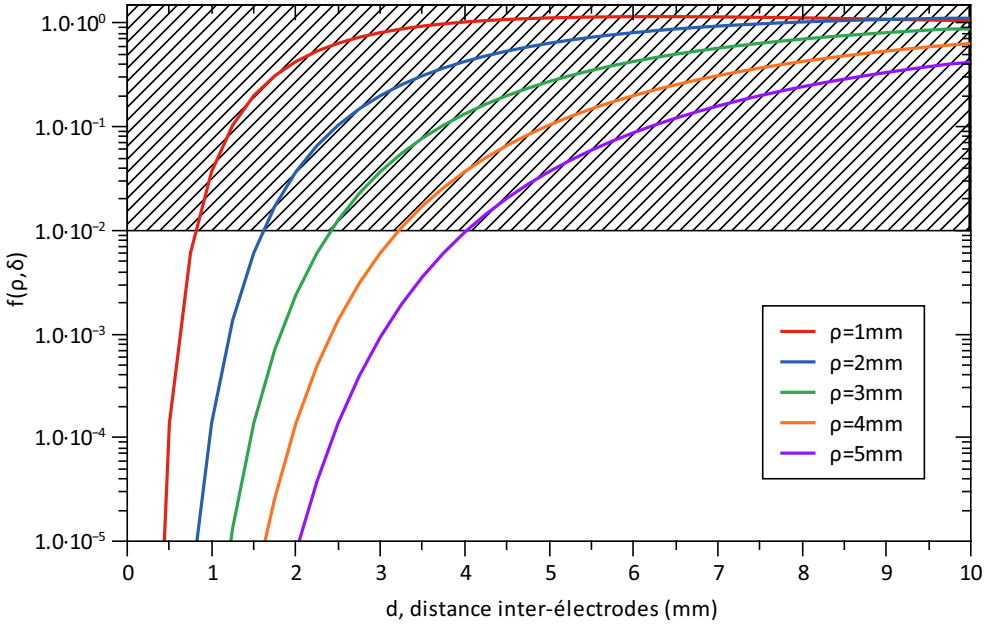


Figure 3.2.2 : *Tracé de la relation* (3.2.12) *pour deux électrodes de rayon ρ en regard, en fonction de la distance entre les électrodes. La zone non hachurée inclut les paramètres pour que cette condition soit $\ll$0,01 : pas de piégeage possible.*

Cette condition est particulièrement critique dans le cas d'un funnel où le diamètre intérieur des électrodes est progressivement réduit jusqu'à quelques millimètres, comme présenté en figure 3.2.1b. Le risque de confinement peut alors devenir non négligeable près de la sortie d'un funnel et un soin particulier doit être porté à cette condition lors de la conception d'un tel appareil.

Le funnel développé par l'équipe de Richard D. Smith [118, 121] est un bon exemple de géométrie prenant en compte cet effet. Leur funnel est composé de 100 électrodes de 0,5 mm d'épaisseur espacées de 0,5 mm par des feuillets isolants. Les 55 premières électrodes ont un diamètre intérieur constant de 25,4 mm tandis les 45 suivantes voient leur diamètre se réduire jusqu'à l'électrode de conductance de 1,5 mm de diamètre intérieur. Ce funnel opère à $\sim$1,3 mbar et des intensités élevées de faisceaux d'ions ont été mesurées en sortie de funnel, jusqu'à plusieurs nA.

Les caractéristiques du funnel conçu pour notre dispositif sont développées en section 4.2.1.

3.2.2 Analyseur en masse quadripolaire

L'analyseur en masse quadripolaire (QMS par la suite) fonctionne selon un principe décrit par Paul et Steinwell au début des années 1950. Ces travaux, ainsi que ceux du piège à ions (voir 3.2.4) ont été récompensés du prix Nobel de physique en 1989 [125]. Le QMS utilise

les propriétés particulières d'un champ RF quadripolaire pour permettre la sélection des ions suivant leur rapport masse/charge. Cet outil est notamment utilisé pour la spectrométrie de masse dite *tandem* (MS/MS) couplée à une source ESI, pour pré-sélectionner l'ion à étudier parmi les différentes espèces produites par la source.
Un QMS est composé de quatre électrodes cylindriques (idéalement de section hyperbolique) de rayon R_0 et de longueur finie, tel que présenté en figure 3.2.3. En pratique, la création du

champ quadripolaire dans une large région de l'espace est possible avec l'approximation des électrodes cylindriques à la condition que R_0/r_0=1,1468 [126]. Sur chaque couple d'électrodes (électrodes d'un même axe) sont appliquées des tensions oscillantes en opposition de phase. Le potentiel quadripolaire ainsi créé prend la forme :

$$\Phi(\vec{r},t) = \Phi_0(t)\frac{x^2-y^2}{2r_0^2} \tag{3.2.13}$$

avec

$$\Phi_0(t) = U_0 - V_0\cos(\Omega t) \tag{3.2.14}$$

où $2r_0$ est la distance entre deux électrodes, U_0 est un potentiel statique et V_0 est l'amplitude du potentiel oscillant.

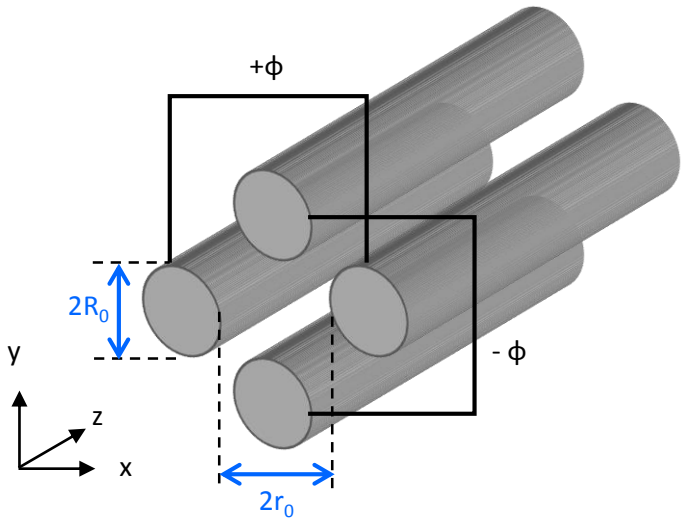


Figure 3.2.3 : *Vue schématique des électrodes cylindriques d'un analyseur en masse quadripolaire.*

Les ions dans un tel champ quadripolaire répondent à l'équation du mouvement suivante :

$$m\frac{d^2\vec{r}}{dt^2} + q\vec{\nabla}\Phi(\vec{r},t) = 0 \tag{3.2.15}$$

La forme du champ ne dépendant que des variables x et y, les ions ne sont donc pas accélérés dans la direction axiale du QMS. En posant le changement de variables suivant :

$$a_u = a_x = -a_y = \frac{4qU_0}{m\Omega^2 r_0^2}, \quad q_u = q_x = -q_y = \frac{2qV_0}{m\Omega^2 r_0^2}, \quad \tau = \frac{\Omega t}{2} \tag{3.2.16}$$

on peut alors réécrire l'équation 3.2.15 :

$$m\frac{d^2u}{d\tau^2} + (a_u - 2q_u\cos(2\tau))u = 0 \tag{3.2.17}$$

avec u=x,y et où a_u et q_u sont les paramètres de Mathieu tel que $\frac{a_u}{q_u} = \frac{2U_0}{V_0}$.

L'équation 3.2.17 (équation de Mathieu) admet deux types de solution : une trajectoire stable où l'ion oscille dans le plan (xOy) avec une faible amplitude permettant à l'ion de traverser le QMS, et une trajectoire instable où l'amplitude de l'oscillation augmente exponentiellement, entraînant la perte de l'ion. Mathématiquement, ces solutions dépendent entièrement du couple (a_u,q_u), représenté par le diagramme de stabilité de la figure 3.2.4. Ce diagramme présente des régions où la stabilité des trajectoires des ions est assurée dans le plan radial (xOy) du quadripôle (région A, B, C et D). La première région de stabilité dans le plan (xOy) (région A) est la région usuelle de fonctionnement d'un QMS. Grâce aux équations 3.2.16, il est possible de passer du diagramme dans l'espace (a_u,q_u) à celui dans l'espace des tensions (U_0,V_0), pour un ion de rapport m/q fixé. La figure 3.2.5 présente un zoom de la région A dans l'espace (U_0,V_0) pour des masses différentes, tel que $m_1<m_2<m_3$. En fixant U_0 et V_0, seuls les ions d'un certain rapport m/q suivent une trajectoire stable et sont guidés le long de l'analyseur ; tous les autres ions ont des trajectoires instables et sont perdus. Un analyseur en masse quadripolaire peut donc *scanner* d'une masse à une autre en faisant évoluer U_0 et V_0 à rapport constant.

On peut noter que la résolution en masse m/Δm de l'analyseur, soit la capacité à distinguer deux ions séparés de 1 u.m.a, est constante sur toute la gamme de m/q pour un rapport U_0/V_0 donné. Comme montré sur la figure 3.2.5, Δm étant donné par l'intersection de la droite U_0/V_0=constante avec le diagramme de stabilité d'une masse donnée. Ainsi Δm est d'autant plus petit, et donc la résolution d'autant plus grande, que le coefficient directeur de la droite suivie par le scan est grand. Néanmoins, augmenter la résolution entraîne une diminution de la transmission des ions au travers de l'analyseur.

De plus, pour que la séparation en masse soit possible, il est nécessaire que les ions ayant un rapport m/q incorrect évoluent assez longtemps dans l'analyseur pour que l'instabilité de leur trajectoire conduise à leur perte. Ceci impose alors une relation entre l'énergie des ions E_z dans l'axe de l'analyseur et la longueur L des électrodes. Cette relation peut être approximée par :

$$E_z < \frac{\Omega^2 L^2}{100\pi^2}\left(\frac{\Delta m}{m}\right)m \tag{3.2.18}$$

Enfin, dans le mode particulier où la composante statique du champ U_0 est nulle, le QMS laisse passer tous les ions avec un rapport m/q supérieur à la valeur fixé par V_0 tel que $q_u \leq 0{,}9$ et agit alors comme un simple guide d'ions.

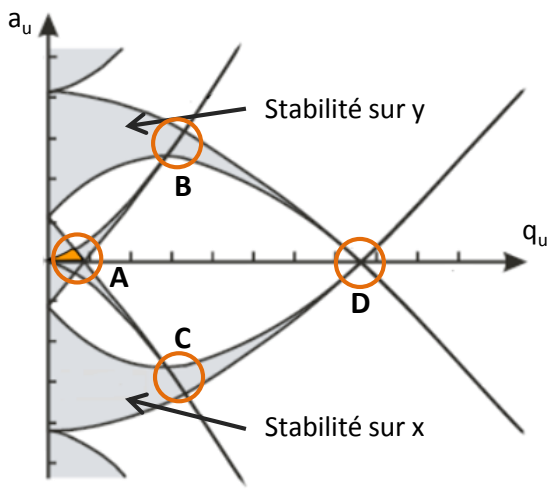


Figure 3.2.4 : *Diagramme de stabilité des trajectoires dans l'espace (a_u,q_u). Les régions A, B, C et D représentent les couples (a_u,q_u) tels que la trajectoire des ions est stable dans le champ quadripolaire. Un QMS fonctionne dans la région A.*

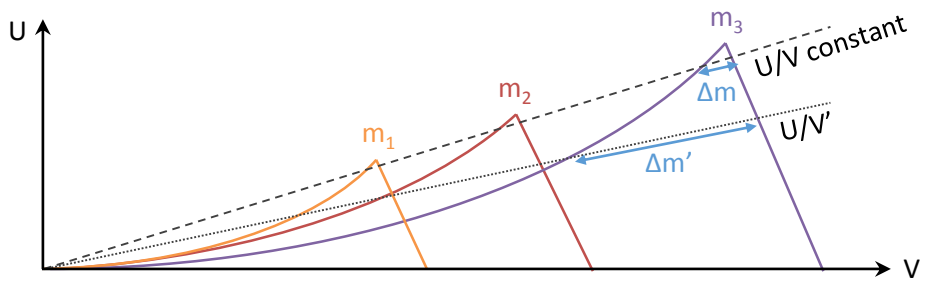


Figure 3.2.5 : *Zoom sur la première région de stabilité A pour des ions de différentes masses, avec $m_1<m_2<m_3$. La droite U_0/V_0=constante représente la ligne de scan de fonctionnement d'un QMS.*

3.2.3 Guidages par multipôles

Les multipôles constitués de 2n électrodes avec n>2, tel que l'octupole, constituent plus efficacement des guides d'ions. Dans cette configuration particulière d'électrodes, les trajectoires selon les coordonnées x et y, orthogonales à l'axe du multipôle, sont couplées et ne peuvent plus être considérées séparément avec des diagrammes de stabilité. La tension appliquée n'a qu'une composante oscillante permettant de transmettre les ions sur une large gamme de rapport m/q. Le pseudo-potentiel ainsi créé est purement radial, donc confine les ions le long de l'axe, et dépend du nombre 2n de poles :

$$V^*(r) = \frac{qn^2V_0^2}{4m\Omega^2r_0^2}\left(\frac{r}{r_0}\right)^{2n-2} \tag{3.2.19}$$

La proportionnalité du pseudo-potentiel en r^{2n} le rend très fort proche des électrodes et relativement plat au centre, permettant de confiner la trajectoire des ions sur une large section pour

une transmission accrue. La stabilité de la trajectoire des ions dans un multipôle est conservée tant que la composante r du mouvement reste inférieure à une valeur r_m tel que $r_m/r_0<0{,}8$ et que le paramètre de stabilité η suit [117] :

$$\eta(r = r_m) = 2n(n-1)\frac{qV_0}{m\Omega^2 r_0^2}\left(\frac{r_m}{r_0}\right)^{(n-2)} < 0,3 \tag{3.2.20}$$

En négligeant le terme d'énergie centrifuge, on peut exprimer l'amplitude minimale nécessaire pour guider des ions à une énergie maximale $E_m = qV^*(r_m)$ tel que :

$$qV_0 = 8\frac{n-1}{n}\frac{E_m}{\eta_m}\left(\frac{r_0}{r_m}\right)^n \tag{3.2.21}$$

Par exemple pour une particule simplement chargée dans un octupole (n=4) avec $r_m/r_0=0{,}8$, η_m=0,3 et E_m=1 eV, une amplitude de l'oscillation RF de l'ordre de 50 V permet de guider les ions.

3.2.4 Piège de Paul

3.2.4.1 Principe du piégeage

La réalisation du piège à ions imaginé par W. Paul *et co.* [125] a représenté une avancée majeure pour la spectroscopie en physique atomique. Le confinement des ions dans un champ électrostatique tridimensionnel est rendu possible par la forme particulière des électrodes du piège.

La géométrie du piège de Paul consiste en trois électrodes de forme hyperbolique : un anneau central encadré par deux électrodes chapeaux, tel que présenté en figure 3.2.6a. Le rapport entre le rayon r_0 de l'anneau central et la distance z_0 entre le centre du piège et une électrode chapeau doit respecter la condition $r_0^2 = 2z_0^2$ pour obtenir un champ quadripolaire en chaque point du piège. Un potentiel de la forme $U_0 + V_0\cos(\Omega t)$ appliqué entre l'anneau central et les deux électrodes chapeaux permet de créer un champ quadripolaire tridimensionnel de la forme [127] :

$$\Phi(r,z,t) = \frac{U_0 + V_0\cos(\Omega t)}{2dr_0^2}(2z^2 - r^2) \tag{3.2.22}$$

où

$$r^2 = x^2 + y^2 \tag{3.2.23}$$

Du fait des signes opposés de $+z^2$ et $-r^2$ dans cette équation, ce potentiel est à un instant donné confinant dans une dimension (par exemple z) et fuyant dans l'autre (r). L'utilisation d'un potentiel sinusoïdal permet d'alterner successivement les directions de confinement et de fuite comme illustré en figure 3.2.6b. Ainsi en choisissant convenablement V_0 et Ω il est possible de piéger des ions dans le champ quadripolaire. De même que pour l'analyseur quadripolaire, la stabilité de la trajectoire des ions dans le champ électrique généré répond aux équations de Mathieu [117, 127]. Les paramètres de Mathieu associés au piège de Paul sont de la forme :

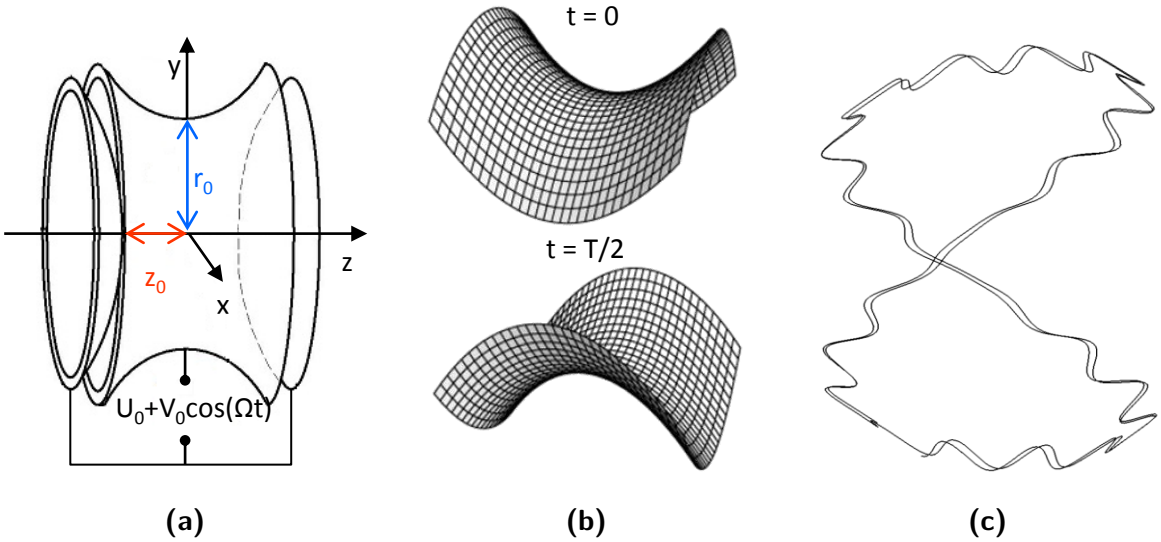


Figure 3.2.6 : ***(a)*** *: Vue schématique du piège de Paul. Un potentiel $U_0 + V_0 \cos(\Omega t)$ est appliqué entre l'anneau central et les électrodes chapeaux, créant un champ quadratique tridimensionnel.* ***(b)*** *: Surface d'équipotentielles dans un piège de Paul, oscillant à une période T.* ***(c)*** *: Trajectoire d'une particule chargée dans un piège de Paul présentant les deux composantes du mouvement : le mouvement séculaire et le micromouvement.*

$$a_z = -2a_r = -\frac{8qU_0}{mr_0^2\Omega^2}, \quad q_z = -2q_r = \frac{4qV_0}{mr_0^2\Omega^2} \tag{3.2.24}$$

Ainsi, il existe des régions de stabilité dans l'espace (a_u,q_u) (avec u = r ou z), illustrées par la figure 3.2.7, permettant de faire évoluer les ions sur des trajectoires stables à la fois selon les directions axiale et radiale. La trajectoire des ions dans le champ quadripolaire prend alors deux composantes : un mouvement séculaire lent et un micromouvement oscillant à la fréquence Ω, comme présenté en figure 3.2.6c. On peut noter que lorsque a_z est nul, soit lorsque la composante statique du champ U_0 est nulle, alors les trajectoires des ions sont stables dans la région définie par $q_z \leq 0{,}908$. Ainsi, à une amplitude V_0 et une fréquence Ω de l'oscillation fixées, les ions respectant le rapport m/q suivant peuvent être piégés :

$$\frac{m}{q} \geq \frac{4V_0}{0.908 r_0^2 \Omega^2} \tag{3.2.25}$$

Cette relation met en avant une coupure aux masses faibles à V_0 fixé. Cette caractéristique est importante pour les expériences impliquant la fragmentation des ions au sein du piège de Paul puisqu'elle définit la taille des plus petits fragments pouvant être effectivement stockés [128]. Comme le montrent les résultats de Ifflander et Werth [129] présentés en figure 3.2.7b, une densité d'ions piégés optimale peut être obtenue pour des paramètres de Mathieu proche de a_z=-0,02 et q_z=0,55.

Dans le cas où $q_z \leq 0{,}4$, l'approximation du puits de pseudo-potentiel pour un piège de Paul permet de définir la profondeur du puits de potentiel V_z^* dans la direction axiale et V_r^*

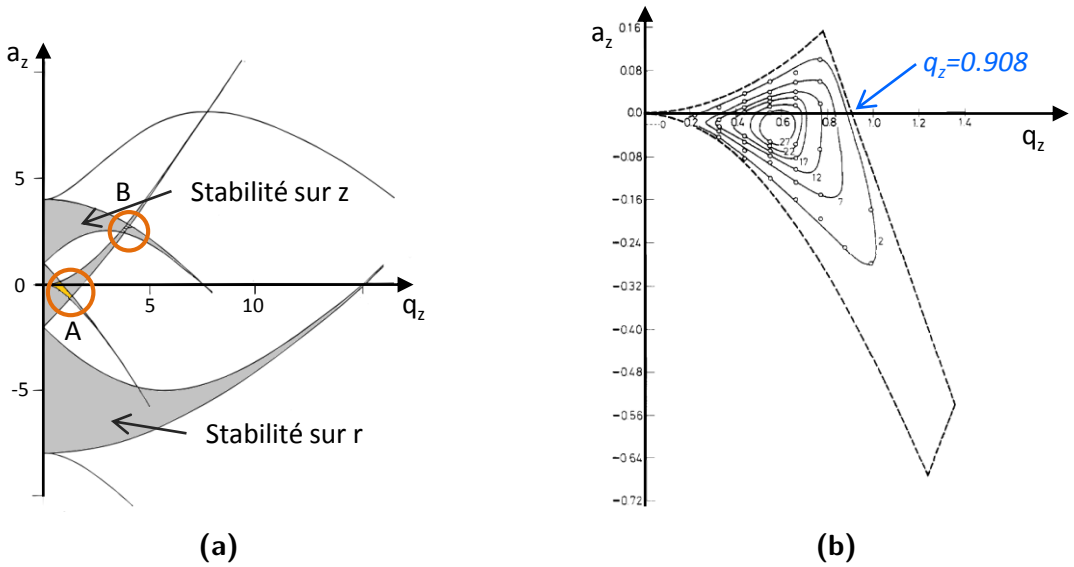


Figure 3.2.7 : ***(a)*** *: Diagramme de stabilité des trajectoires dans l'espace (a_z, q_z) pour un piège de Paul quadripolaire. Les régions A et B représentent les régions pour lesquelles les trajectoires axiales et radiales sont stables simultanément.* ***(b)*** *: Ligne pointillée : zoom sur la première région de stabilité A. Lignes d'égales densités d'ions dans l'espace (a_z, q_z) définies par des expériences de fluorescence induite par laser [129]. Les nombres indiquent les valeurs de densité relative.*

dans la direction radiale en fonction :

$$V_z^* = V_z + \frac{U_0}{2}, \quad V_r^* = V_r - \frac{U_0}{2} \tag{3.2.26}$$

où V_z et V_r sont les puits de potentiels créés par le potentiel oscillant tels que

$$V_z = 2V_r = \frac{qV_0^2}{2mr_0^2\Omega^2} + \frac{U_0}{2} \tag{3.2.27}$$

L'équation 3.2.26 peut être exprimée en fonction des paramètres de Mathieu q_z et q_r grâce aux équations 3.2.24 :

$$V_z^* = \frac{q_z}{8}V_0 + \frac{1}{2}U_0, \quad V_r^* = -\frac{q_r}{8}V_0 - \frac{1}{2}U_0 \tag{3.2.28}$$

L'application d'un potentiel statique sur les électrodes du piège modifie la profondeur des puits de potentiel en opposition dans les directions axiale et radiale. En pratique, la profondeur du puits de pseudo-potentiel ainsi créé dans un piège de Paul est de l'ordre de la dizaine de volt. En prenant comme exemple le piège de Paul utilisé pendant cette thèse, avec $r_0 = 10$ mm, $\Omega = 2\pi\times1$ MHz et $U_0 = 0$ V, alors pour un ion de rapport m/q = 200 u.m.a et un paramètre de piégeage $q_z = 0{,}4$, il vient $V_0 = 820$ V et $V_z^* = 41$ V.

3.2.4.2 Fonctionnement particulier : injection, accumulation et extraction des ions

Dans notre cas, l'un des intérêts de l'utilisation d'un piège à ions est de pouvoir accumuler les ions dans un paquet relativement dense (10^6 ions/cm^3) et d'utiliser ces paquets pour des

expériences d'irradiation par des faisceaux de particules (photons, électrons, ions etc...). Utilisé dans ces conditions, le cycle d'utilisation d'un piège peut être décrit en trois phases : l'injection des ions en continu et la dissipation de leur énergie initiale avec la méthode du "gaz tampon", le confinement et l'accumulation des ions dans le piège et leur extraction du piège sous forme de paquets denses.

Injection des ions dans le piège

L'injection des ions dans le piège se fait au travers d'un trou dans la première électrode chapeau le long de l'axe z, que l'on nommera électrode d'entrée, telle que présentée sur la figure 3.2.8. L'injection des ions en continu requiert l'utilisation d'un gaz tampon pour dissiper l'énergie cinétique initiale des ions et assurer leur piégeage dans le puits de potentiel [130]. La pression du gaz tampon dans le piège doit être suffisamment grande pour que le libre parcours moyen des ions soit inférieur aux dimensions du piège (pression de l'ordre de 10^{-2} mbar). Par exemple pour une section efficace de collision $\sigma \simeq 50.10^{-20}$ m^2 et une pression de 0,1 mbar (soit n $\simeq$ 2,4.10^{21} atome/m^3), le libre parcours moyen $\lambda = \frac{1}{n\sigma}$ est de l'ordre du millimètre. L'utilisation d'un gaz léger et inerte, comme l'hélium, permet le refroidissement des ions par une multitude de collisions élastiques douces. Lorsque la masse des ions piégés est grande devant celle du gaz tampon, $m_{ion} \gg m_{gaz}$, alors l'effet des collisions peut être interprété en moyenne comme une force de frottement.

Il est possible d'estimer le nombre de collisions, et donc le temps nécessaire pour la thermalisation des ions, en considérant en première approximation le cas de collisions élastiques par un modèle de sphères dures. Ainsi, pour des ions d'énergie cinétique E_c en collision avec un gaz tampon au repos, la perte d'énergie par choc E_c-E'_c est donnée par :

$$E_c - E'_c = E_c \left[1 - \frac{m_{ion}^2 + m_{gaz}^2}{(m_{ion} + m_{gaz})^2} + \frac{2 m_{ion} m_{gaz}}{(m_{ion} + m_{gaz})^2} cos(\theta_{cdm}) \right] \tag{3.2.29}$$

$$= E_c . f(\theta_{cdm}) \tag{3.2.30}$$

où θ_{cdm} est l'angle de diffusion dans le centre de masse. Pour déterminer le nombre de collisions nécessaires pour thermaliser les ions, on peut considérer la perte moyenne d'énergie par collision. On montre que cette perte d'énergie est égale à la moitié de la perte maximale (cas où $\theta_{cdm} = 180°$)et s'exprime $\overline{\Delta E} = \frac{1}{2} E_c \times f(180°) = E_c \overline{f}$ avec $\overline{f} = f(180°)/2$. On peut alors écrire l'évolution de l'énergie cinétique d'un ion en fonction du nombre de collisions subi *i* :

$$E_c(i) = E_c(0) \times e^{-\overline{f}.i} = E_c(0) \times e^{-\frac{ln2}{\tau_{col}}.i} \tag{3.2.31}$$

où τ_{col} est le nombre de collisions nécessaire pour faire diminuer de moitié l'énergie cinétique des ions. On peut alors estimer le temps τ nécessaire pour refroidir les ions à partir du temps moyen entre deux collisions $\langle dt \rangle = \lambda / \langle v \rangle$, où on considère une vitesse moyenne des ions $\langle v \rangle$ pendant le refroidissement et une section efficace σ indépendante de l'énergie des ions, tel que $\tau = \langle dt \rangle \times \tau_{col}$. Ainsi pour des ions de masse m_{ion} = 200 u.m.a et d'énergie cinétique

$E_c = 5$ eV et un gaz d'hélium de masse $m_{gaz} = 4$ u.m.a au repos à une pression de 0,1 mbar, en considérant $\lambda = 0{,}8$ mm il vient $\tau_{col} = 18$ collisions et $\langle dt \rangle = 0{,}4$ μs, soit $\tau \sim 8$ μs.

Il faut donc plusieurs dizaines de microsecondes pour thermaliser les ions à température ambiante T $\simeq$ 300 K. Nous verrons en section 4.2.2.3 que cet ordre de grandeur est cohérent avec les résultats de simulations de la thermalisation des ions dans notre piège de Paul. Il est important de noter ici que ce temps de refroidissement est bien inférieur à la durée d'un cycle de piégeage (centaines de millisecondes) nous permettant de garantir que tous les ions dans le piège sont refroidis avant leur extraction.

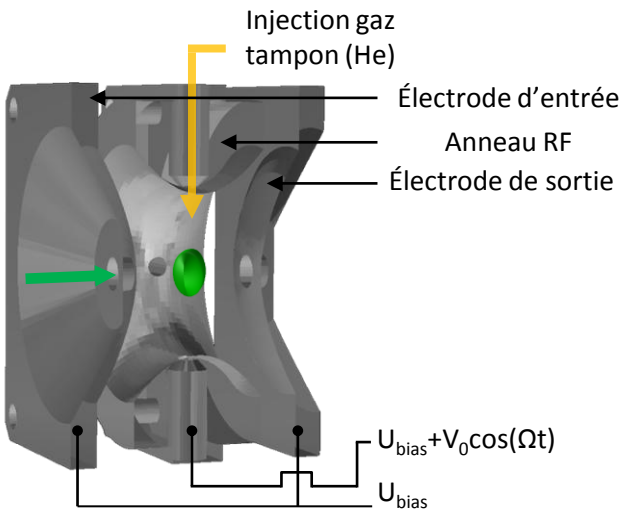


Figure 3.2.8 : *Schématisation du piège et des tensions appliquées sur les électrodes pendant l'injection des ions. Le gaz tampon est injecté dans le piège par un orifice pratiqué dans l'anneau central du piège. Les ions entrent dans le piège par un orifice en centre de l'électrode chapeau d'entrée.*

Accumulation des ions dans le piège

En injectant continuellement les ions dans le piège, il est possible de les accumuler et de former des paquets (ou nuages) de quelques mm^3.

Tant que la densité d'ions dans le piège est faible ($\leq 10^5$-10^6 ions/cm^3), on peut considérer que la trajectoire des ions n'est pas modifiée par les interactions coulombiennes entre les ions. On est donc dans le cas de trajectoires de particules indépendantes décrit précédemment. Dans ce cas, le nuage peut être décrit comme un gaz de particules à l'équilibre thermique dont l'énergie dépend du puits de potentiel du piège. On peut alors calculer la distribution de la densité des ions dans le piège n(r,z), qui prend une forme gaussienne dans les trois dimensions de l'espace [127] :

$$n(r,z) = \frac{1}{r_0^2 z_0} \frac{1}{(\pi k_B T)^{3/2}} \sqrt{q^3 V_r V_z}.exp\left[-2\left(\frac{r}{\Delta r}\right)^2 - 2\left(\frac{z}{\Delta z}\right)^2\right] \tag{3.2.32}$$

avec

$$\Delta r = 2\sigma_r = r_0\sqrt{\frac{2k_BT}{qV_r}}, \quad \Delta z = 2\sigma_z = z_0\sqrt{\frac{2k_BT}{qV_z}} \tag{3.2.33}$$

En prenant en compte la condition $r_0^2 = 2z_0^2$ alors le pseudo-potentiel du champ quadratique est deux fois plus confinant dans la direction axiale que dans la direction radiale : $V_z = 2V_r$ entraîne alors $\Delta r = 2\Delta z$. Par conséquent le nuage d'ions est deux fois plus large dans la direction radiale. Ainsi pour reprendre l'exemple précédent de notre piège avec $r_0 = 10$ mm, $q_z = 0{,}4$, pour des ions rapport $m/q = 200$ à une température $T = 300$ K, on obtient $\Delta z = 0{,}17$ mm et $\Delta r = 0{,}34$ mm.

Dans le cas contraire où la densité d'ions dépasse 10^6 ions/cm^3, l'accumulation de charge dans le piège donne lieu à un potentiel de charge d'espace $\phi_{ch}(r,z)$ répondant à l'équation de Poisson [131] :

$$\nabla^2\Phi_{ch}(r,z) = -\frac{qn(r,z)}{\varepsilon_0} \tag{3.2.34}$$

où ε_0 est la permittivité du vide et n(n,r) est la densité de particules chargées dans le piège. Le signe négatif de ce potentiel va donc avoir l'effet de réduire la profondeur des puits de potentiel V_r^* et V_z^*. Ceci a aussi pour effet de modifier la forme du diagramme de stabilité [127]. On voit d'après les équations 3.2.33 que diminuer les valeurs des puits de potentiels entraîne l'élargissement des dimensions du nuage Δr et Δz et donc limite la densité du nuage. Il existe alors un nombre maximal d'ions pouvant être simultanément piégés. Une étude de ce phénomène pour déterminer la capacité maximale de chargement de notre piège sera présentée en section 4.2.2.

Extraction des ions du piège

L'extraction des ions du piège se fait au travers d'un orifice au centre de la seconde électrode chapeau le long de l'axe z, que l'on nommera électrode de sortie, telle que présentée sur la figure 3.2.9a. Une rampe de potentiel appliquée suivant l'axe z du piège permet d'extraire les ions au travers d'un trou au centre de l'électrode chapeau de sortie. La rampe de potentiel est créée en appliquant simultanément sur les électrodes d'entrée et de sortie, les tensions $U_{bias}+V_{ext}^e$ et $U_{bias}-V_{ext}^s$ respectivement, comme illustré en figure 3.2.9. Dans le cas où $V_{ext}^e=V_{ext}^s=V_{ext}$, le potentiel au centre du piège lors de l'extraction est donc U_{bias} (par symétrie).

La rampe de potentiel crée un champ d'extraction $\overrightarrow{E_{ext}}$ homogène au centre du piège, qui en première approximation peut être défini par :

$$\overrightarrow{E_{ext}} = \frac{V_{ext}^e + V_{ext}^s}{2z_0}.\vec{u_z} \tag{3.2.35}$$

En réalité, la rampe de potentiel n'est pas strictement linéaire mais est déformée par les effets de bords et la géométrie du piège. La figure 3.2.10 montre la forme du potentiel le long de l'axe z appliqué dans le cas de notre piège ($z_0 = 7$ mm) pour $V_{ext} = 30$ V. Ici, le champ

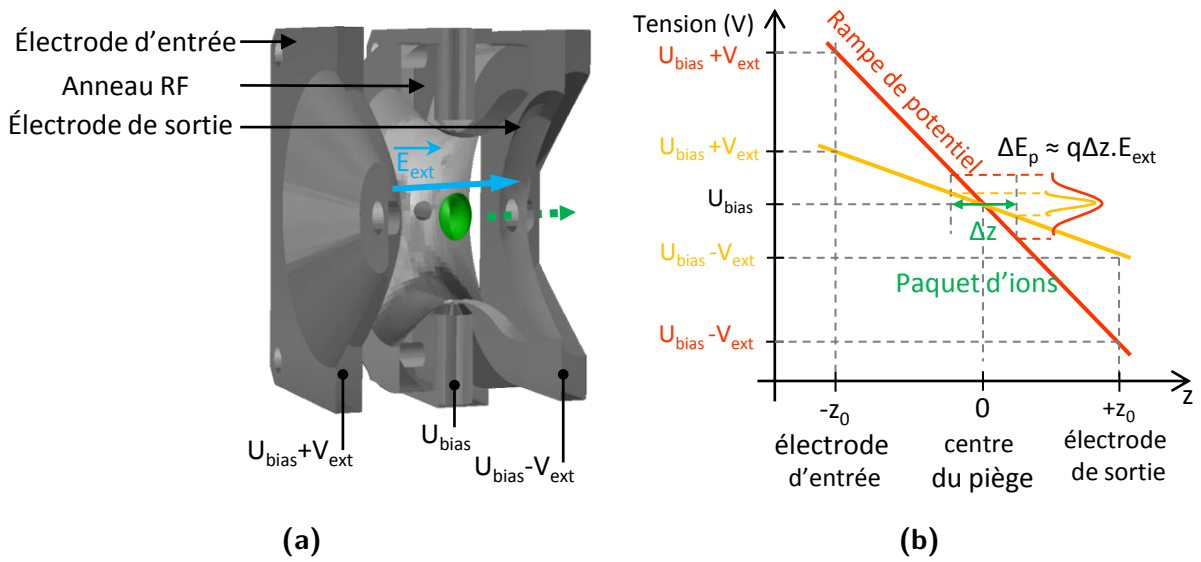


Figure 3.2.9 : ***(a)*** *: Schématisation du piège et des tensions appliquées sur les électrodes pour l'extraction des ions. Les ions sortent du piège par un orifice en centre de l'électrode chapeau de sortie.* ***(b)*** *: Rampe de potentiel appliquée dans le piège pour l'extraction d'un paquet d'ions de taille Δz dans la direction axiale. La rampe est crée par l'application des potentiels V_{ext}^{e} et $-V_{ext}^{s}$, respectivement sur les électrodes d'entrée et de sortie, avec ici $V_{ext}^{e} = V_{ext}^{s} = V_{ext}$.*

électrique est homogène au centre du piège sur $\pm$ 1 mm et vaut $\|\overrightarrow{E_{ext}}\|$ = 3,4 V/mm alors que le calcul de l'équation 3.2.35 donne $\|\overrightarrow{E_{ext}}\|$ = 4,3 V/mm, soit une différence de 20%.

L'énergie potentielle moyenne $\langle E_p \rangle$ des ions extraits du piège est directement liée à ce potentiel, soit $\langle E_p \rangle$ = qU(z=0) = qU_{bias}. Cette énergie potentielle est convertie en énergie cinétique lorsque les ions traversent une zone de potentiel nul, comme la zone d'interaction dans notre cas. Comme vu précédemment, la taille du nuage d'ions au centre du piège est petite $\Delta z < 1$ mm et on peut considérer homogène le champ d'extraction dans la dimension du nuage. Si l'on néglige la température initiale des ions du nuage, la dispersion en énergie ΔE_p est alors directement reliée à la taille du nuage Δz et au champ électrique $\|\overrightarrow{E_{ext}}\|$ dans la direction axiale du piège :

$$\Delta E_p = q\Delta U = q\Delta z \|\overrightarrow{E_{ext}}\| \tag{3.2.36}$$

Ainsi, la dispersion en énergie d'un paquet d'ions est d'autant meilleure que le champ d'extraction est faible. En pratique cependant, plusieurs facteurs influencent la taille du nuage et la résolution en énergie des paquets d'ions. L'étude de ces différents phénomènes sera présentée en détail en section 4.2.2 spécifiquement pour notre dispositif. Dans notre cas, cette dispersion en énergie est importante puisqu'elle conditionne la taille du nuage en dehors du piège. En effet plus ΔE est grand, plus la dispersion en vitesse est grande et plus la dispersion en position des ions dans le nuage augmente rapidement.

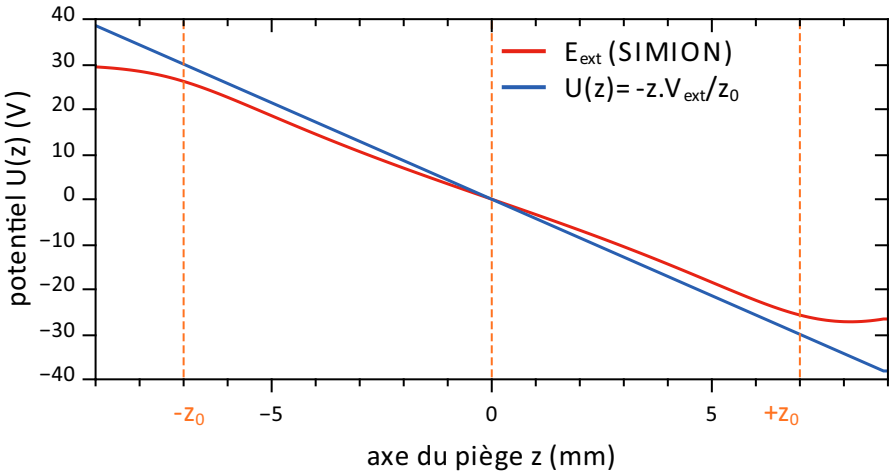


Figure 3.2.10 : *Potentiel appliqué le long de l'axe du piège pour V_{ext} = 30 V en fonction de coordonnée z de piège, où z = 0 correspond au centre du piège. En rouge, potentiel appliqué déterminé dans la géométrie réelle du piège simulé avec le programme SIMION. Le champ électrique au centre du piège vaut E_{ext} = 3,4 V/mm. En bleu, droite d'équation U(z) = -zV_{ext}/z_0 avec E_{ext} = 4,3 V/mm.*

3.3 Spectromètre de masse à temps de vol

La spectrométrie de masse à temps de vol est une méthode reposant sur la mesure du temps de vol de particules chargées soumises à un champ électrique. Le temps de vol d'une particule étant relié à son rapport masse/charge (m/q), cette technique permet donc de séparer les différentes particules selon ce rapport et de faire l'acquisition de spectres de masse. La mesure du temps de vol des ions nécessite la définition d'un temps t_0 auquel est référencé le temps t de détection des particules chargées à l'autre extrémité du spectromètre. En pratique et selon le dispositif expérimental, il existe plusieurs méthodes pour définir t_0. On pourra citer comme exemple la détection d'électrons émis de la cible ou du projectile diffusé, ou encore l'instant de l'application d'un champ d'extraction $\vec{E}$ en fonctionnement pulsé, comme c'est le cas pour notre spectromètre.

Pour un spectromètre de masse à temps de vol, on montre que le temps de vol T = t-t_0 d'un ion de masse m et de charge q initialement au repos, accéléré par une différence de potentiel V, suit la relation :

$$T \propto \sqrt{\frac{m}{qV}} \tag{3.3.1}$$

alors, pour une tension V fixée,

$$\frac{m}{q} \propto T^2 \tag{3.3.2}$$

On définit la résolution en masse m/Δm comme la capacité à pouvoir séparer deux masses proches, pour des ions de charge q fixée :

$$\frac{m}{\Delta m} = \frac{1}{2}.\frac{T}{\Delta T} \tag{3.3.3}$$

où Δt est la largeur en temps de vol mesurée pour des ions de masse m.

3.3.1 Configuration Wiley-Mclaren

Un spectromètre à temps de vol du type Wiley-McLaren [132, 133] offre une résolution en masse élevée ($\frac{m}{\Delta m}$ →2000). Son fonctionnement repose sur l'utilisation de deux champs électriques $\vec{E_1}$ et $\vec{E_2}$ homogènes. Le rapport de ces deux champs est ajusté de manière à focaliser en temps de vol les ions sur un détecteur. Cette focalisation permet de compenser la dispersion initiale en position Δz_0 des ions extraits suivant l'axe z du spectromètre, comme illustré sur la figure 3.3.1. Le spectromètre est divisé en 3 zones :

— une zone d'extraction, soumise à un champ électrique $\vec{E_1}$ dans laquelle se trouvent initialement les ions à analyser,
— une zone d'accélération, soumise à un champ électrique $\vec{E_2}$,
— une zone de vol libre où les ions évoluent en l'absence de champ électrique jusqu'au détecteur. C'est principalement dans cette zone que se fait la séparation en temps de vol des ions de différents rapport m/q.

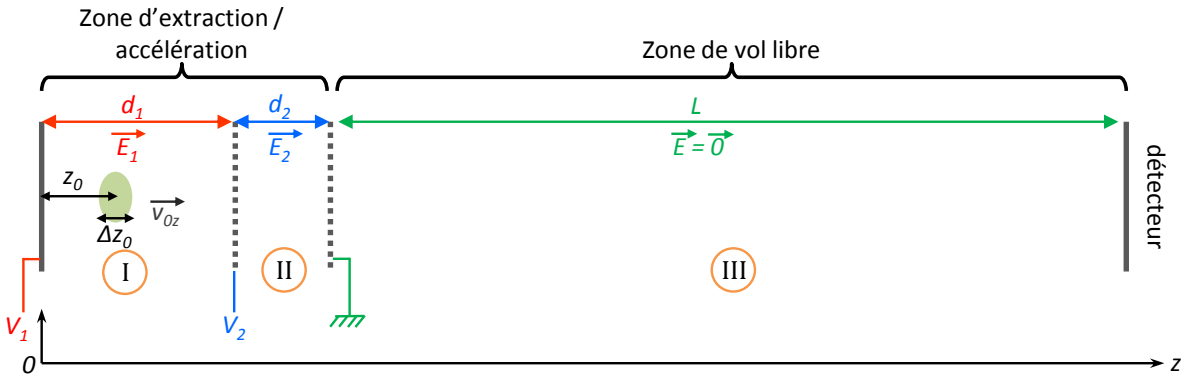


Figure 3.3.1 : *Vue schématique d'un spectromètre de masse à temps de vol de type Wiley-McLaren. Des grilles séparant les régions I et II puis II et III permettent d'assurer l'homogénéité des champs électriques dans chaque région.*

3.3.1.1 Équation du temps de vol

Le temps de vol total T(z,v_z) d'un ion extrait dans ce type de spectromètre peut être calculé comme la somme des temps passés dans chacune des trois zones T(z,v_z)=T_I(z,v_z) + T_{II}(z,v_z) + T_{III}(z,v_z). Les régions I, II et III, de longueurs d_1, d_2 et L, correspondent respectivement aux zones d'extraction, d'accélération et de vol libre.

Les champs électriques $\vec{E_1}$ et $\vec{E_2}$ sont définis par :

$$\vec{E_1} = \frac{V_1 - V_2}{d_1}\vec{u_z}, \quad \vec{E_2} = \frac{V_2}{d_2}\vec{u_z} \tag{3.3.4}$$

Ainsi, pour un ion de masse m, de charge q et de position initiale z_0 dans la région I, avec une vitesse initiale v_{0z} selon l'axe du spectromètre, on peut calculer le temps T_I à partir du principe fondamental de la dynamique :

$$m\frac{dv_{1z}}{dt} = \frac{q}{m}E_1 \tag{3.3.5}$$

$$v_{1z}(t) = \frac{q}{m}E_1 t + v_{0z} \tag{3.3.6}$$

$$z_1(t) = \frac{q}{2m}E_1 t^2 + v_{0z}t + z_0 \tag{3.3.7}$$

À $t = T_I$, $z_1(T_I) = d_1$, et en posant $z' = d_1 - z_0$ la distance parcourue par les ions dans la région I, il vient :

$$\frac{q}{2m}E_1 T_I^2 + v_{0z}T_I + z_0 = d_1 \tag{3.3.8}$$

$$\frac{q}{2m}E_1 T_I^2 + v_{0z}T_I - z' = 0 \tag{3.3.9}$$

Cette équation admet deux solutions :

$$T_I' = \frac{-v_{0z} - \sqrt{v_{0z}^2 + \frac{2q}{m}E_1 z'}}{\frac{q}{m}E_1}$$

$$T_I'' = \frac{-v_{0z} + \sqrt{v_{0z}^2 + \frac{2q}{m}E_1 z'}}{\frac{q}{m}E_1}$$

T_I'' est la seule solution positive, on a donc :

$$T_I(z', v_{0z}) = \frac{m}{qE_1}\left(\sqrt{v_{0z}^2 + \frac{2q}{m}E_1 z'} - v_{0z}\right) \tag{3.3.10}$$

Ainsi, à $t = T_I$, la vitesse des ions v_{1z} vaut :

$$v_{1z}(t = T_I) = \sqrt{v_{0z}^2 + \frac{2q}{m}E_1 z'} = v_{1z_0} \tag{3.3.11}$$

De la même manière, on peut calculer $T_{II}(z', v_{0z})$ et $T_{III}(z', v_{0z})$:

$$T_{II}(z', v_{0z}) = \frac{m}{qE_2}\left[\sqrt{v_{1z_0}^2 + \frac{2q}{m}E_2 d_2} - v_{1z_0}\right] \tag{3.3.12}$$

$$T_{III}(z', v_{0z}) = \frac{L}{v_{2z_0}} \tag{3.3.13}$$

où

$$v_{2z_0} = v_{2z}(t = T_{II}) = \sqrt{v_{1z_0}^2 + \frac{2q}{m}E_2 d_2} \tag{3.3.14}$$

En pratique en phase gazeuse, la vitesse des ions selon z est nulle en moyenne. Ainsi $T(z', v_z = 0)$ définit le centroïde du pic de temps de vol tandis que la dispersion σv_z des ions influence

la largeur de ce pic. On peut alors calculer le temps de vol moyen T(z',$v_z = 0$) d'ions de masse m et de charge q par :

$$T(z',0) = T_I(z',0) + T_{II}(z',0) + T_{III}(z',0) \tag{3.3.15}$$

$$= \frac{m}{qE_1}\sqrt{\frac{2q}{m}E_1 z'} + \frac{m}{qE_2}\sqrt{\frac{2q}{m}(E_1 z' + E_2 d_2)} - \sqrt{\frac{2q}{m}E_1 z'} + \frac{L}{\sqrt{\frac{2q}{m}(E_1 z' + E_2 d_2)}} \tag{3.3.16}$$

$$= \sqrt{\frac{m}{q}}\left[\sqrt{\frac{2z'}{E_1}} + \frac{\sqrt{2E_1 z' + 2E_2 d_2} - \sqrt{2E_1 z'}}{E_2} + \frac{L}{\sqrt{2E_1 z' + 2E_2 d_2}}\right] \tag{3.3.17}$$

$$= K\sqrt{\frac{m}{q}} \tag{3.3.18}$$

On vérifie ainsi que le temps de vol est proportionnel à m/q. En prenant pour exemple la géométrie de notre spectromètre caractérisé par z' = 9 cm, d_2 = 3 cm et L = 126 cm, avec E_1 = 107,3 V/cm et E_2 = 904 V/cm (soit V_1 = 4000 V et V_2 = 2710 V), il vient T = 1,92×$\sqrt{\frac{m}{q}}$ μs, soit un temps de vol T $\simeq$ 27,2 μs pour un ion de rapport m/q = 200.

3.3.1.2 Focalisation en position et en vitesse

Nous allons maintenant voir comment il est possible de compenser la position initiale des ions selon z. En se plaçant dans le cas où la vitesse initiale est négligeable, $v_{0z} = 0$ on peut exprimer la condition de focalisation pour laquelle le temps de vol T(z') est indépendant de la dispersion en position dz autour de z_0. On obtient alors que cette condition de focalisation ne dépend que des champs électriques $\vec{E_1}$ et $\vec{E_2}$ et de la géométrie du système, z', d_2 et L, et suit la relation [132] :

$$\frac{dT(z')}{dz} = L - 2z' k_0^{\frac{3}{2}}\left(1 - \frac{1}{k_0 + \sqrt{k_0}}\frac{d_2}{z'}\right) = f(k_0) = 0 \tag{3.3.19}$$

où :

$$k_0 = \frac{z'E_1 + d_2 E_2}{z'E_1} \tag{3.3.20}$$

Ainsi pour une géométrie du spectromètre donnée (d_2, z' et L fixes), il existe une valeur de k_0 pour laquelle la focalisation en position est obtenue. En déterminant graphiquement k_0 tel que $f(k_0) = 0$ on peut déduire le rapport des champs $\vec{E_1}$ et $\vec{E_2}$ nécessaire à cette focalisation :

$$E_2 = E_1\frac{z'}{d}(k_0 - 1) \tag{3.3.21}$$

Pour reprendre l'exemple précédant, avec z' = 9 cm, d_2 = 3 cm et L = 126 cm on a $k_0 \simeq$ 3,8 et donc $E_2/E_1 \simeq$ 8,4. On peut aussi remarquer qu'avec un seul champ d'extraction $\vec{E_1}$ (d_2 = 0 et k_0 = 1), la focalisation en position se fait à une longueur L = 2z'.

Ce type de spectromètre ne permet pas en revanche une compensation de la vitesse initiale des ions. On peut définir ΔT_v la différence de temps de vol entre deux ions de mêmes positions initiales mais de vitesses initiales v_{0z} opposées suivant l'axe du spectromètre. L'ion ayant sa vitesse initiale dirigée dans la direction opposée à celle du champ électrique $\vec{E_1}$ doit faire un demi-tour au début de sa trajectoire dans la région I pour être dirigé vers le détecteur. La différence ΔT_v est donnée par :

$$\Delta T_v = T_I(z', -v_{0z}) - T_I(z', v_{0z}) \tag{3.3.22}$$

soit,

$$\Delta T_v = \frac{2mv_{0z}}{qE_1} \tag{3.3.23}$$

On voit directement la dépendance en v_{0z} de la largeur des pics de temps de vol et donc sur la résolution du spectromètre. Un champ d'extraction E_1 fort permet de compenser partiellement cette dépendance. Plus cette vitesse initiale sera grande plus la résolution en temps $T/\Delta T$ et donc la résolution en masse sera faible. Cependant cette caractéristique peut être utilisée par exemple pour analyser l'énergie cinétique libérée (*KER*) [134] des produits de la fragmentation d'une molécule au sein de la zone d'extraction. Ainsi pour reprendre l'exemple du spectromètre précédent, pour un ion de rapport m/q = 200 u.m.a fragmentant symétriquement avec un KER de 10 eV, la vitesse des fragments dans l'axe peut atteindre $v_{0z} = 0{,}3$ cm/μs, soit $\Delta T_v \simeq 560$ ns. En comparaison, la dispersion en temps de vol dû à la vitesse initiale dans l'axe z (vitesse thermique $\simeq 0{,}04$ cm/μs) est de ~ 70 ns. L'ordre de grandeur de ΔT_v est donc expérimentalement mesurable. De plus tant que la dispersion en temps de vol introduite par le KER est grande devant celle due à vitesse initiale des ions, il est possible de remonter à l'énergie cinétique libérée lors de la fragmentation des ions.

On peut enfin noter que si les informations de vitesses dans l'axe du spectromètre z sont contenues dans le spectre de temps de vol, celles dans le plan transverse sont contenues dans la position d'impact des ions sur le détecteur du spectromètre. Ainsi, à l'aide d'un détecteur sensible en position il apparaît possible de remonter aux composantes transverses des impulsions des ions induites par la fragmentation.

3.4 Détection sensible en position

Les détecteurs sensibles en position (*DSP* par la suite) sont des détecteurs plans permettant de définir le point d'impact d'une particule à leur surface. L'utilisation de galettes à micro-canaux couplées avec des *écrans* pour définir la position, permet généralement d'avoir des surfaces de détection larges de plusieurs centimètres de diamètre. Pour la détection d'ions de très basse énergie (< 1 keV), il existe différentes techniques d'*écrans* permettant la mesure de la position dans le plan du détecteur : anodes résistives, écrans phosphores ou encore anodes à lignes à retard. Ils présentent des caractéristiques très intéressantes . Ces détecteurs sensibles en position sont notamment fréquemment utilisés pour l'imagerie de faisceau de particules de faible

intensité ($< 10^7$ particules/s), la spectroscopie d'impulsion d'ions de recul et la spectrométrie de masse. Sur le dispositif PIBALE nous utilisons des galettes à micro-canaux et des anodes à lignes à retard car il offre une résolution de l'ordre de la centaine de μm et une réponse temporelle de l'ordre de la nanoseconde [135]. Nous discuterons ici de cette technique en particulier.

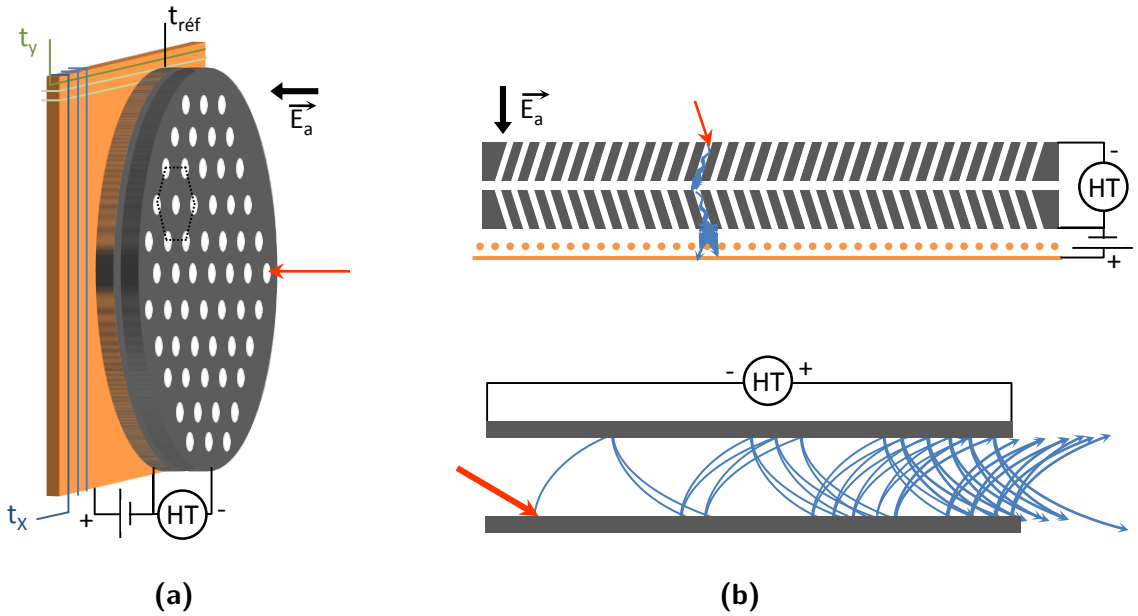


Figure 3.4.1 : ***(a)*** *: Vue schématique d'un détecteur sensible en position composé de deux galettes en chevrons (en gris) suivies des deux plans d'anodes à lignes à retard (en orange) permettant de reconstituer les positions d'impact en x et y. Le champ de post-accélération $\vec{E_a}$ permet d'accélérer les ions (flèche rouge) avant l'impact. La différence de potentiel entre la face arrière de la dernière galette et les plans d'anodes permet d'accélérer les électrons vers ces derniers.* ***(b)*** *: En haut, coupe schématique d'un détecteur sensible en position. La gerbe d'électron amorcée par l'impact de l'ion incident se répand jusqu'à l'anode à ligne à retard. En bas, schéma du processus de multiplication des électrons le long d'un canal polarisé agissant comme une dynode continue.*

3.4.1 Efficacité de détection des galettes à micro-canaux

Les galettes à micro-canaux sont réalisées en matériaux semi-conducteurs et sont caractérisées par leur ouverture géométrique (surface couverte par les micro-canaux), et sont généralement montées en ensemble de deux à trois galettes disposées en chevron (figure 3.4.1). Le fonctionnement d'une galette à micro-canaux repose sur le fait que chaque canal agit comme un multiplicateur d'électrons pour produire un signal électrique, la surface intérieure d'un canal agissant comme une dynode continue (par analogie aux dynodes discrètes d'un photomultiplicateur), comme illustré en figure 3.4.1b. L'angle des canaux par rapport au plan de la galette assure que les ions ayant une incidence normale au détecteur impactent la surface interne des canaux et génèrent l'émission d'électrons secondaires. La disposition de deux galettes

en chevron permet d'augmenter l'intensité de la gerbe d'électrons (gain).

En pratique, l'efficacité maximale d'un tel détecteur est limitée par l'ouverture géométrique totale de l'ensemble des micro-canaux par rapport à la surface totale de la galette et est noté $\varepsilon_{géo}$. Cette efficacité maximale est atteinte lorsque chaque particule impactant dans un des micro-canaux génère une gerbe d'électrons conduisant à un signal. Dans le cas où les canaux sont répartis régulièrement suivant un motif hexagonal, comme illustré en figure 3.4.1a, alors $\varepsilon_{géo}$ peut être exprimé par [136] :

$$\varepsilon_{géo} = \frac{2\pi}{\sqrt{3}} \left(\frac{D}{2p}\right)^2 \tag{3.4.1}$$

où D est le diamètre d'un canal et p est le pas du motif hexagonal. Dans le cas de la plupart des galettes commercialisées, $\varepsilon_{géo}$ est de l'ordre de 50 $\%$ [135, 137]. Par exemple pour D $=$ 25 μm et p $=$ 32 μm on a $\varepsilon_{géo} = 55$ $\%$.

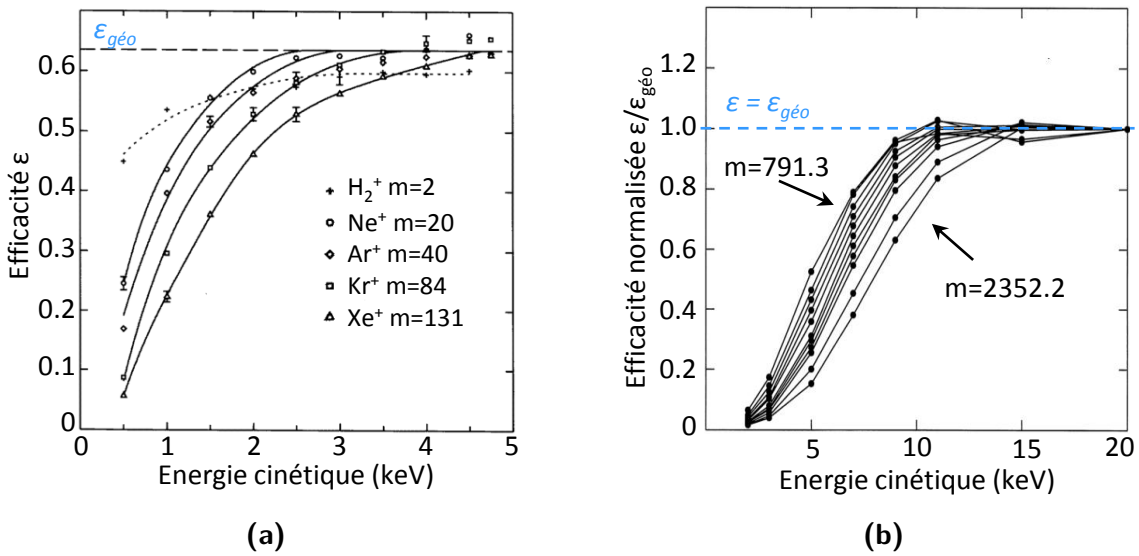


Figure 3.4.2 : ***(a)*** *: Efficacité de détection pour des ions de gaz rares en fonction de l'énergie de post-accélération [138].* ***(b)*** *: Efficacité de détection normalisée pour des oligomères de polystyrène de masses comprises entre 791,3 et 2352,2 u.m.a en fonction de l'énergie de post-accélération [137].*

Outre l'aspect géométrique, l'efficacité des galettes est une fonction complexe dépendant, entre autres, de la masse, de la charge, de l'énergie et de l'angle d'incidence des ions. La mesure de l'efficacité de galettes à micro-canaux a été le fruit de nombreuses études dans les années 1990 et 2000 [136]. Cette dépendance est liée au rendement de la production des électrons secondaires par l'impact des ions. Les travaux de Gilmore [137] sur des oligomères de polystyrène ou ceux d'Oberheide [138] sur des ions de gaz rares, présentés en figure 3.4.2, montrent notamment que l'efficacité de détection des galettes à micro-canaux diminue rapidement lorsque la masse des ions augmente ou lorsque leur énergie cinétique au moment de l'impact diminue. L'application d'un champ électrique de post-accélération $\vec{E_a}$ devant les galettes permet d'augmenter l'énergie cinétique des ions avant leur impact et donc d'assurer une efficacité maximale

des galettes ($\varepsilon_{géo}$) sur une large gamme de masse. On peut alors noter que dans notre cas, pour l'étude d'ions de rapport m/q = 100-500 u.m.a l'énergie cinétique des ions doit être de 4 à 7 keV. On montrera dans la partie 4.1.2 une mesure expérimentale de l'efficacité de détection d'un détecteur utilisé sur PIBALE, pour des ions de différentes masses. Nous verrons que $\varepsilon < \varepsilon_{géo}$ pour des ions de masse m > 150 u.m.a et d'énergie cinétique E_c = 2500 eV.

On notera que l'efficacité de détection diminue aussi avec le vieillissement des galettes [137], mais que ceci peut être compensé par une augmentation du gain, c'est-à-dire de la polarisation entre la face avant et la face arrière des galettes.

3.4.2 Fonctionnement d'une anode à lignes à retard

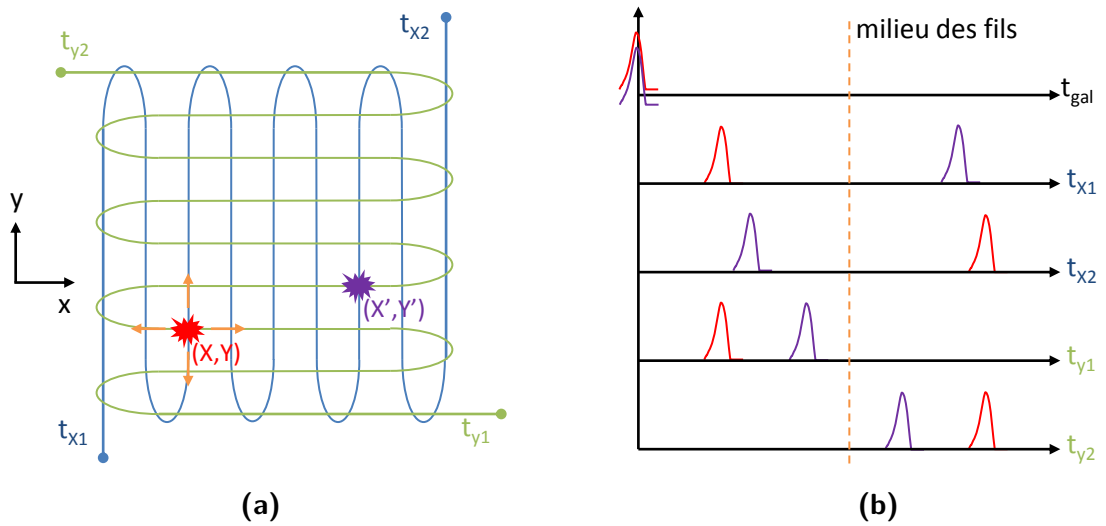


Figure 3.4.3 : ***(a)*** *: Exemple de mesure des temps t_{x1}, t_{x2}, t_{y1} et t_{y2} sur les plans de l'anode à lignes à retard après la détection simultanée de deux ions aux positions (X,Y) et (X',Y') sur les galettes à micro-canaux.* ***(b)*** *: Schéma montrant les temps d'arrivée des différents signaux suivant la détection simultanée sur les galettes aux temps $t_{gal} = t'_{gal}$ et aux positions (X,Y) et (X',Y').*

Après l'impact d'un ion et la multiplication des électrons dans les micro-canaux, la gerbe d'électrons est dirigée vers l'anode à lignes à retard par l'application d'une différence de potentiel de quelques centaines de volts. Ce type d'anode est constitué de deux plans de fils conducteurs orthogonaux enroulés en spires, permettant de mesurer la position d'une particule dans chacun des deux axes du plan du détecteur, comme illustré en figure 3.4.1a. Lorsque la gerbe d'électrons atteint les fils d'anodes, une impulsion électrique est créée et se propage jusqu'à chaque extrémité du fil où l'on peut alors mesurer les temps t_{x1}, t_{x2}, t_{y1} et t_{y2} d'arrivée de l'impulsion, présentés en figure 3.4.3. Ces différents signaux sont tous référencés par rapport au temps t_{gal} auquel l'ion impacte les galettes et classés chronologiquement par le système d'acquisition. La différence t_2-t_1 de ces temps d'arrivée multipliée par une constante de calibration C correspond alors à la différence de longueur de fil parcourue par l'impulsion. La constante C est fonction de

la vitesse de propagation des signaux dans les fils (résistivité des fils) ainsi que de la géométrie du détecteur. On remonte alors aux positions X et Y grâce aux relations :

$$X = C \times (t_{x2} - t_{x1}) \tag{3.4.2}$$

$$Y = C \times (t_{y2} - t_{y1}) \tag{3.4.3}$$

La longueur L des fils étant fixée, la somme des temps d'arrivée $t_{x,y1}+t_{x,y2} = C\times L$ est alors nécessairement constante. Cette valeur dépend de la taille du détecteur et est de l'ordre de la centaine de nanoseconde pour un détecteur de 80 mm de diamètre [135]. Cette caractéristique peut alors conditionner le choix des couples (t_{x1},t_{x2}) et (t_{y1},t_{y2}) lors de la détection *proche* de plusieurs ions. On entend par *proche* le fait qu'une seconde particule soit détectée avant que les signaux t_{x1}, t_{x2}, t_{y1} et t_{y2} de la précédente particule soient mesurés. Ainsi, prenons par exemple le cas de la figure 3.4.3 de deux particules impactant à $t_{gal}=t'_{gal}$ et à des positions (X,Y) et (X',Y') différentes. Celles-ci génèrent des signaux en temps [t_{x1}, t_{x2}, t_{y1}, t_{y2}] et [t'_{x1}, t'_{x2}, t'_{y1}, t'_{y2}].

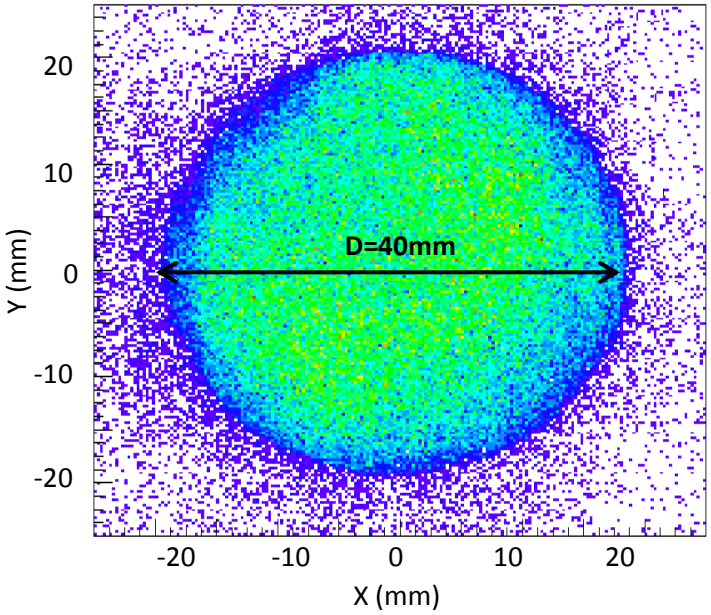


Figure 3.4.4 : *Image calibrée de la surface active d'un détecteur sensible en position de 40 mm de diamètre.*

En considérant le chronogramme de la figure 3.4.3b et en prenant en compte le classement chronologique de l'acquisition, on reconstruirait les couples erronés :

— (t_{x1},t'_{x2}) avec $t_{x1} + t'_{x2} < C\times L$
— (t'_{x1},t_{x2}) avec $t'_{x1} + t_{x2} > C\times L$
— (t_{y1},t'_{y2}) avec $t_{x1} + t'_{y2} < C\times L$
— (t'_{y1},t_{y2}) avec $t'_{y1} + t_{y2} > C\times L$

On voit alors que la somme des valeurs de ces couples n'est pas constante et induit nécessairement une erreur dans la reconstitution des positions d'impact des particules. Ainsi, en

conditionnant l'association des couples (t_{x1},t_{x2}) et (t_{y1},t_{y2}) tel que leur somme soit égale à C×L, il est possible de reconstruire sans erreur la position de toutes les particules.

La détermination de la constante de calibration C peut se faire par exemple en utilisant un masque devant le détecteur de dimensions connues, ou bien en estimant la surface visible active du détecteur et d'en déduire la constante de calibration à partir de ses dimensions réelles, comme présenté en figure 3.4.4. Par exemple, dans le cas de ce détecteur, le facteur de calibration C à été évalué à C = 0,44 mm/ns.

La résolution en position est essentiellement limitée par la prise de temps des différents signaux temporels : δt $\simeq$ 0,5 ns. Celle-ci peut alors être déduite par $\delta X = \delta Y \simeq 2.C.\Delta t \simeq$ 440 μm. Dans notre cas cette résolution est bien inférieure aux grandeurs que l'on pourrait mesurer (nuage d'ions de plusieurs millimètre). La résolution en position n'est donc pas un facteur limitant et pourra être négligée par la suite.

Développement du dispositif expérimental PIBALE | 4

Sommaire

4.1 Description générale 56
4.1.1 Production des ions moléculaires cibles 58
4.1.2 Formation des paquets d'ions cibles 60
4.1.3 Détecteur diagnostic 62
4.1.4 Zone d'interaction et analyse par spectrométrie de masse à temps de vol 66
4.1.5 Source d'ions projectiles 69
4.2 Développement et caractérisation du dispositif 74
4.2.1 Développement et mise en place d'un nouveau funnel 74
4.2.1.1 Conception du funnel 75
4.2.1.2 Caractérisation du funnel 78
4.2.1.3 Perspective : augmentation de l'intensité du faisceau de molécules 80
4.2.2 Piégeage et mise en forme du paquet d'ions cibles 80
4.2.2.1 Capacité maximum du piège 81
4.2.2.2 Élargissement du nuage d'ions par la charge d'espace 83
4.2.2.3 Déconfinement du nuage d'ions avant l'extraction 86
4.2.2.4 Effet des collisions avec le gaz tampon lors de l'extraction . . 89
4.2.2.5 Caractéristiques d'un paquet d'ions dans la zone d'interaction 94
4.2.2.6 Perspective : amélioration des caractéristiques d'un paquet d'ions 96
4.2.3 Synchronisation des faisceaux 99
4.2.3.1 Synchronisation en temps 99
4.2.3.2 Effet du champ électrique créé par le faisceau projectile . . . 101
4.2.4 Spectromètre de masse à temps de vol 104
4.2.4.1 Différenciation en vitesse et gamme de fonctionnement . . . 104
4.2.4.2 Exemple d'imagerie du paquet d'ions cibles 110
4.3 Bilan et premières expériences en faisceaux croisés 112
4.3.1 Bilan 112
4.3.2 Calcul du taux d'événement attendu 113
4.3.3 Résultats 115
4.3.3.1 Cycle d'acquisition 116
4.3.3.2 Collision entre un faisceau d'He^+ à 7 keV et une cible de kanamycine protonée 117
4.4 Conclusion 127

Le développement et la caractérisation du dispositif PIBALE représentent une grande partie du travail de cette thèse. Au début de cette thèse en novembre 2013, le spectromètre de masse à temps de vol et la ligne de production et de transport des ions moléculaires venaient d'être raccordés, tandis que la source d'ions projectiles monochargés avait été testée mais n'était pas encore couplée au reste du montage. Dans ce chapitre, le dispositif sera présenté dans son état actuel et nous y détaillerons ses caractéristiques et son fonctionnement. Dans une seconde partie sera présenté le développement d'un nouveau funnel pour la production d'ions moléculaires ainsi que la caractérisation du piège à ions et du spectromètre de temps de vol, points clefs du dispositif. Nous discuterons ensuite de la synchronisation en temps et de l'alignement spatial des deux faisceaux nécessaires pour réaliser les expériences de faisceaux croisés non continus. Une estimation du nombre d'évènements attendus pourra être déduite des caractéristiques complètes du dispositif PIBALE. Enfin certains résultats de ces expériences seront présentés et les différentes sources de bruits de fond et de pollutions auxquelles nous devons faire face seront mis en évidence. En conclusion, nous discuterons des limitations du dispositif actuel et des améliorations pouvant être encore entreprises.

4.1 Description générale

Le dispositif expérimental PIBALE doit permettre d'étudier les processus de relaxation de systèmes moléculaires d'intérêt biologique après interaction avec des ions atomiques de quelques keV d'énergie cinétique. L'étude de systèmes tels que des protéines, des brins d'ADN ou des complexes non-covalents (agrégats, molécules nanosolvatées) sélectionnés en masse nécessite l'emploi de sources d'ionisation douce telles que les sources à électronébulisation.

L'utilisation de ce type de source moléculaire produit généralement une faible intensité d'ions. La majorité des dispositifs utilisés pour l'étude de l'irradiation de molécules ainsi produites sont composés d'un piège à ions dans lequel les molécules cibles sont accumulées pour y être irradiées pendant un temps généralement long (quelques centaines de millisecondes) [100, 139, 140]. Cette technique peut être couplée à différentes méthodes de spectrométrie de masse mais ne permet pas une analyse de la cinématique de fragmentation des molécules, comme la mesure du KER ou la détection en coïncidence des fragments.

Pour obtenir ces informations, il est nécessaire de détecter les produits d'une collision unique rapidement après l'interaction entre la particule projectile et la molécule cible. La technique expérimentale des faisceaux croisés couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol permettent ce type d'étude [95, 108, 141]. Elles requièrent une densité importante de molécule cible que les techniques de jets moléculaires neutres sont capables de produire.

Dans le but d'obtenir des informations sur les mécanismes de relaxation de systèmes moléculaires complexes sélectionnés en masse, après excitation et/ou ionisation, le dispositif PIBALE doit permettre la détection en coïncidence des fragments et la mesure de leurs impulsions pour l'analyse de la cinématique de fragmentation. Pour ce dispositif, il a été donc été choisi de

coupler les techniques de production d'ions moléculaires par électronébulisation, d'interaction en faisceaux croisés et de spectrométrie de masse à temps de vol avec une détection en position des fragments. Cependant, dans notre cas, l'utilisation de ce type de source moléculaire associé à ce type de spectromètre nécessite une cible dense d'ions de très basse énergie (de l'ordre de la dizaine d'eV). De plus le spectromètre devra fonctionner dans un mode "pulsé" du champ électrique d'extraction. Un tel dispositif n'a, à notre connaissance, jamais été réalisé et constitue un véritable défi instrumental.

Le dispositif PIBALE représenté sur la figure4.1.1 peut-être séparé en trois parties :

1. la source d'ions moléculaires et la préparation de paquets d'ions cibles denses,
2. la source d'ions atomiques et la mise en forme du faisceau projectile pulsé,
3. la zone d'interaction (ZI) et l'analyse des produits de l'interaction par spectrométrie de masse à temps de vol.

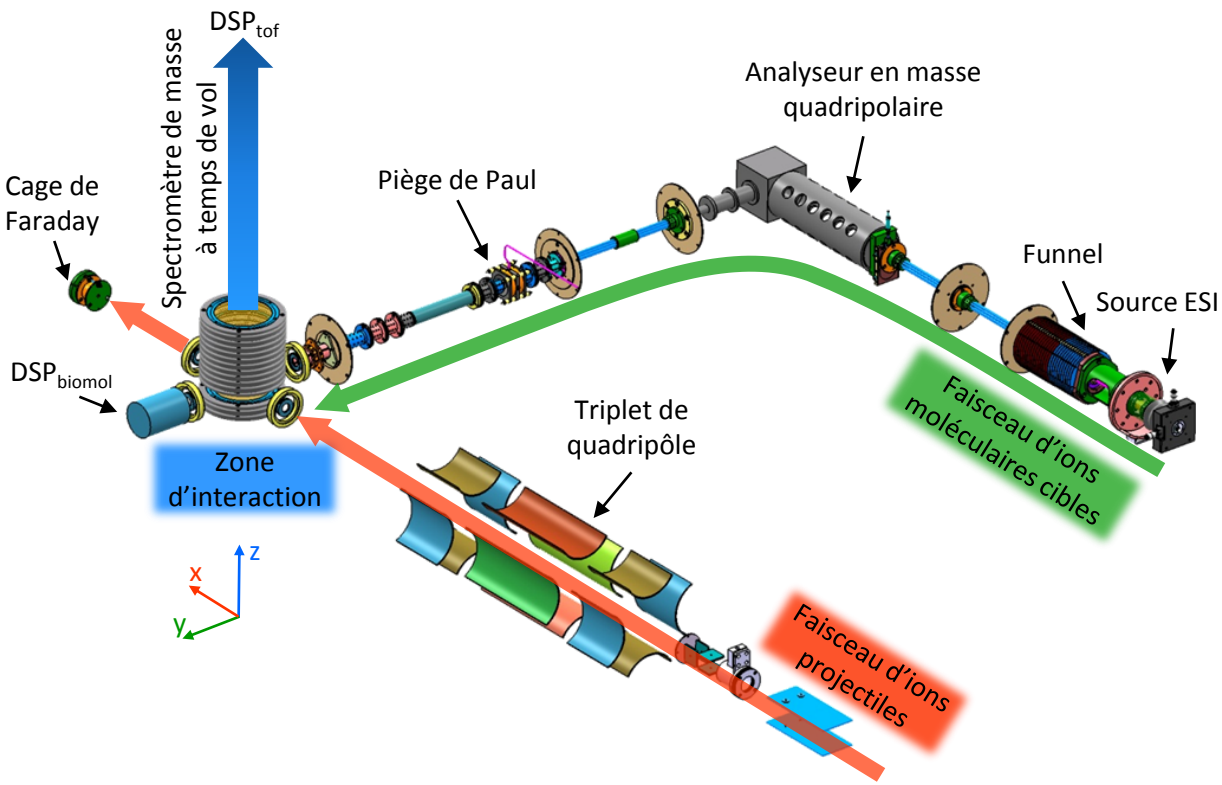


Figure 4.1.1 : *Schéma général du dispositif PIBALE.*

En quelques mots, les ions moléculaires cibles sont produits par une source d'ionisation à électronébulisation. Ils sont sélectionnés selon leur rapport m/q dans un analyseur en masse quadripolaire, puis accumulés dans un piège à ions tridimensionnel. Les paquets d'ions denses ainsi formés sont ensuite extraits puis guidés vers la zone d'interaction. Le faisceau d'ions atomiques projectiles de quelques keV d'énergie cinétique est produit par une source ECR (Electron Cyclotron Resonance) de type *Mono1000* [142]. Ce faisceau est mis en forme pour maximiser le

recouvrement avec les paquets d'ions cibles dans la zone d'interaction (ZI). Enfin, les fragments chargés positivement issus de l'interaction sont alors analysés dans un spectromètre de masse à temps de vol de type Wiley-McLaren couplé à un détecteur sensible en position.

4.1.1 Production des ions moléculaires cibles

La première partie de ce dispositif expérimental consiste à produire à l'aide d'une source d'ionisation à électronébulisation des molécules d'intérêt biologique en phase gazeuse selon le principe décrit précédemment dans la section 3.1 puis de les sélectionner selon leur rapport masse sur charge m/q. La figure 4.1.2 présente cette première partie ainsi que les pressions dans chaque chambre.

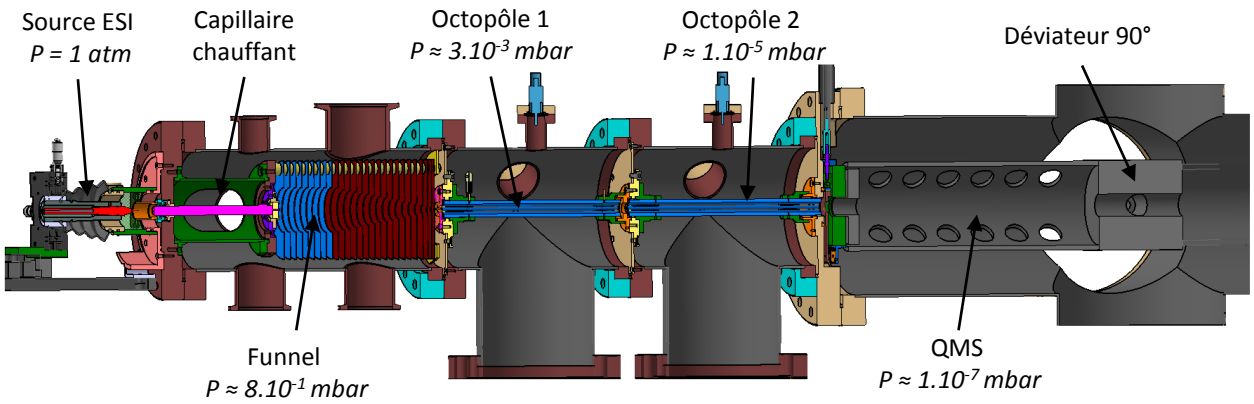


Figure 4.1.2 : *Schéma technique détaillé de la source ESI jusqu'à l'entrée de la chambre du QMS commercial (Extrel).*

Différentes molécules d'intérêt biologique ont été utilisées pendant cette thèse pour les tests et la caractérisation du dispositif PIBALE. Ces systèmes de tests ont été choisis pour leur fragmentation connue et rapportée dans la littérature, lors de dissociation induite par collisions (CID), car, comme nous le verrons dans la suite, ce processus de fragmentation peut se produire en plusieurs points du dispositif. On peut citer, notamment, l'adénine [143] et l'adénosine [144], présentées dans la section 2.1, et la molécule de kanamycine (figure 4.1.3) [145]. Les résultats présentés dans la suite ont été obtenus avec ces molécules.

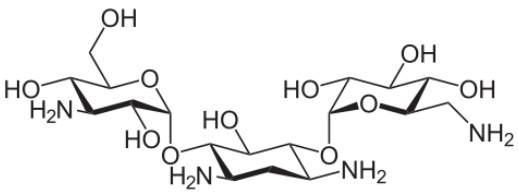


Figure 4.1.3 : *Structure chimique de la kanamycine (m = 484 u.m.a.).*

Source ESI

Pendant cette thèse, le dispositif PIBALE a été optimisé pour des ions chargés positifs et nous avons donc travaillé uniquement avec des molécules protonées. La source d'ionisation à électronébulisation utilisée sur PIBALE a, jusqu'à maintenant, permis de mettre en phase gazeuse des molécules d'intérêt biologique de une à plusieurs fois protonées sur une gamme de rapport m/q de 100 à 1600. Les molécules sont préparées en solution à des concentrations micromolaires (μM) dans un mélange d'eau et de méthanol en proportion équivalente (50 % / 50 %). L'ajout d'acide acétique assure la protonation de la molécule étudiée en solution. La solution est transférée depuis une seringue jusqu'à l'aiguille métallique de la source le long d'un fin capillaire en silice (75 μm de diamètre) à un flux de 0,1 à 0,5 μL/min.

L'aiguille de la source ESI est montée sur un support à trois degrés de liberté x, y, z permettant d'optimiser l'intensité du faisceau de molécules en fonction de la position de l'aiguille. En pratique, l'aiguille est positionnée à 4 mm de l'entrée du capillaire et légèrement désaxée pour limiter le flux de particules neutres y entrant. Une différence de potentiel d'environ 3 kV est appliquée entre l'aiguille et le capillaire chauffant. Les micro-gouttelettes chargées traversent ce capillaire chauffant (T $\sim$ 40 à 100 °C) où le processus d'évaporation se poursuit. La géométrie du capillaire (10 cm de long et 500 μm de diamètre) permet de limiter la conductance depuis la pression atmosphérique jusqu'à la première chambre à une pression de quelques 8.10^{-1} mbar. Un faisceau de molécules protonées et d'espèces neutres est ainsi produit.

Guidage et sélection en masse/charge

En sortie du capillaire chauffant de la source ESI, les ions sont focalisés et guidés le long d'un funnel et de deux octopôles jusqu'à un analyseur en masse quadripolaire commercial (Extrel). Les caractéristiques du funnel sont développées en section 4.2.1. Dans la chambre du premier octopôle qui est à une pression de quelques 10^{-3} mbar, le libre parcours moyen des ions est de l'ordre de la longueur de l'octopôle (une dizaine de centimètres). Le nombre de collisions avec le gaz résiduel devient donc négligeable et l'énergie potentielle des ions correspond à $q.U_{oct1}$, la valeur du potentiel de polarisation appliquée à cet octopôle. Dans le fonctionnement normal, l'énergie des ions est fixée entre 15 et 25 eV.

Le pompage différentiel entre les différentes chambres permet d'atteindre un vide de l'ordre de 10^{-7} mbar dans la chambre du QMS. La tension de polarisation U_{QMS} appliquée sur le quadripôle permet aux ions de traverser l'analyseur avec une énergie de quelques eV (typiquement 1 à 2 eV pour une bonne résolution et transmission).

Après sélection selon leur rapport m/q, les ions traversent un déviateur électrostatique à 90° composé de quatre quarts de cylindre. Les ions peuvent être guidés d'un côté vers un détecteur (plaque de conversion + channeltron) ou de l'autre côté vers le piège de Paul. On peut noter que ce déviateur permet d'éviter le transfert des espèces neutres produites par l'ESI vers le piège et la ZI. L'intensité du signal mesurée avec le channeltron est calibrée pour obtenir l'intensité absolue du faisceau d'ions moléculaires en pico-Ampères ou particules

par seconde. Cette mesure d'intensité absolue en sortie du QMS, que l'on notera I_{ESI} par la suite, est essentielle et nous permet d'estimer l'efficacité de piégeage et de transport des ions jusqu'à la ZI et de s'assurer de la stabilité de la source d'ions moléculaires à tout moment. Ce QMS commercial a une résolution en masse maximale m/Δm de l'ordre de 10000 selon le constructeur. En pratique, lorsque la molécule cible est isolée de toute pollution, la résolution en masse est volontairement réduite pour améliorer la transmission des ions dans le QMS et donc augmenter l'intensité du faisceau. Des intensités I_{ESI} de l'ordre de 5 à 30 pA (10^7-10^8 particules/seconde) sont généralement atteintes avec la plupart des molécules utilisées pendant cette thèse pour la caractérisation du dispositif.

4.1.2 Formation des paquets d'ions cibles

Après sélection dans le QMS, le faisceau continu d'ions moléculaires est guidé vers la deuxième partie du dispositif jusqu'au piège de Paul. Les ions traversent un troisième octopôle dans une chambre définissant un étage de pompage différentiel pour le QMS lorsque le piège est rempli de gaz d'hélium. L'efficacité de transmission du faisceau d'ions depuis le QMS jusqu'à la sortie de cet octopôle a été mesurée et est de l'ordre de 70 à 90 $\%$. Les ions sont ensuite focalisés par des électrodes adaptées pour optimiser l'injection des ions au travers de l'orifice de 4 mm de diamètre de l'électrode chapeau d'entrée du piège. Après accumulation, ces derniers sont extraits du piège vers la zone d'interaction. Cette seconde section du dispositif est présentée en figure 4.1.4. Les pressions dans les différentes chambres lorsque le gaz tampon est injecté dans le piège sont notées sur ce schéma.

Piégeage

Le piège de Paul utilisé sur PIBALE est un piège commercial (*Jordan TOF Products, Inc.*, piège à ions *C-1251* et alimentation RF *D-1203*) caractérisé par les dimensions $r_0 = 10$ mm et $z_0 = 7$ mm respectant la condition $r_0^2 = 2z_0^2$. Ce piège fonctionne à une fréquence RF de piégeage de 1 MHz et une amplitude V_0 ajustable (0 à 2500 V). Les trois électrodes du piège sont portées au potentiel U_{bias}. Le piégeage des ions fonctionne par cycle de période T_{cycle} décrit par le chronogramme de la figure 4.1.5. Ce cycle est divisé en deux parties : l'injection/accumulation des ions puis leur extraction du piège sous forme de paquet.

Le piège est rempli d'un gaz tampon d'hélium à une pression P(He) de l'ordre 0,1 mbar pendant la moitié du cycle de façon à dissiper l'énergie cinétique des ions et les thermaliser à 300 K. Les ions sont injectés en continu dans le piège lorsqu'il est rempli par l'hélium, pendant une durée Δ_{inj}. Dans le fonctionnement normal, Δ_{inj} est également fixée à la moitié du cycle, mais peut être ajustée pour réaliser certaines mesures nécessitant un nombre limité d'ions par paquets.

L'énergie cinétique initiale des ions est ajustée à environ 1 eV, grâce au potentiel commun U_{bias}, pour limiter l'énergie de collision avec le gaz pouvant entrainer leur fragmentation (pro-

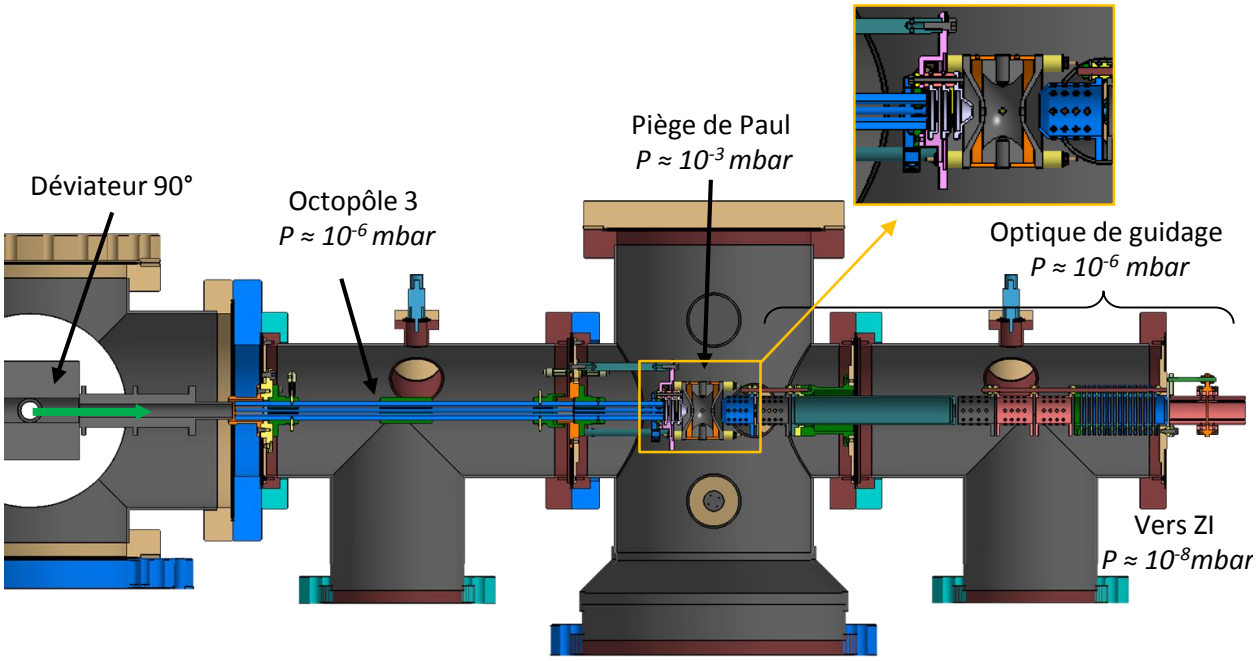


Figure 4.1.4 : *Schéma technique détaillé de l'assemblage du piège de Paul et des électrodes pour l'optique d'injection et d'extraction du piège jusqu'à la zone d'interaction.*

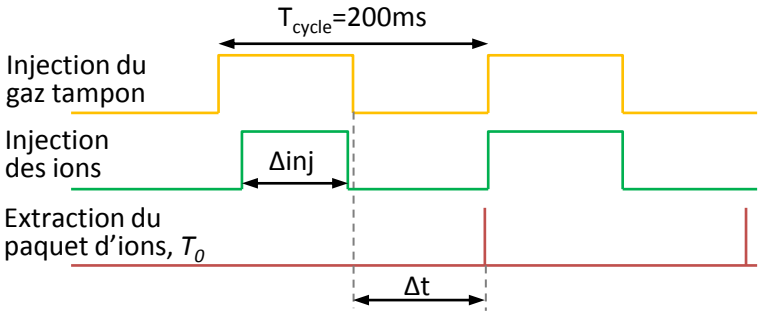


Figure 4.1.5 : *Chronogramme d'un cycle de fonctionnement de piégeage.*

cessus de dissociation induite par collision, CID). La quantité d'ions accumulés dans le piège est limitée par la charge d'espace et s'élève à $\sim$ 1,5.10^5 ions (section 4.2.2.1). Pour une intensité I_{ESI} d'environ 10 pA, le piège est rempli à son maximum pour une durée d'injection Δ_{inj} de 100 ms.

Avant l'extraction d'un paquet d'ions du piège, il est nécessaire de pomper le gaz tampon pour limiter les collisions avec l'hélium résiduel. Ces collisions entraînent une augmentation de la dispersion en énergie du paquet d'ions et peuvent conduire à la fragmentation des ions moléculaires (CID). Ainsi un délai de pompage du gaz tampon, Δt, d'une centaine de millisecondes est nécessaire avant l'extraction d'un paquet d'ions (section 4.2.2.4).

Enfin l'extraction des ions intervient après l'arrêt du potentiel RF (section 4.2.2.3) et se fait avec un champ électrique $\overrightarrow{E_{ext}}$ de quelques V/cm en appliquant les potentiels $+V_{ext}$ et

-V_{ext} respectivement sur les électrodes chapeaux d'entrée et de sortie du piège. En pratique, le début de l'application du champ d'extraction du piège est le signal déclencheur du cycle de fonctionnement complet de l'expérience. On le notera *temps zéro* T_0 par la suite.

Ainsi la période d'un cycle de piégeage T_{cycle} typique est de 200 ms et contient 100 ms pour accumuler un nombre maximum d'ions dans le piège, puis 100 ms pour pomper le gaz tampon avant d'extraire un paquet d'ions du piège. Des mesures du temps de vie des ions dans le piège ont été réalisées et ont montré que ce temps est long devant la durée de piégeage des ions. La description détaillée des limitations du piégeage et des caractéristiques des paquets d'ions fait l'objet de la section 4.2.2.

Transfert vers la zone d'interaction

Le paquet d'ions est guidé après extraction par plusieurs électrodes vers la zone d'interaction dont le centre est à une distance de 529 mm du centre du piège. L'optique de guidage est contenue dans deux chambres supplémentaires disposées entre la chambre du piège et celle de la zone d'interaction. Des diaphragmes de faibles conductances permettent d'assurer un pompage différentiel entre le piège et la ZI lors de l'injection du gaz tampon. Une lentille déviatrice divisée en quatre quarts de cylindre pouvant être polarisés à des tensions indépendantes les unes des autres permet de corriger les défauts d'alignement pour centrer la trajectoire du paquet d'ions dans la ZI. Après cette dernière lentille, les ions évoluent en vol libre dans la zone d'interaction avec une énergie cinétique de l'ordre de 15 eV à 20 eV, définie par la tension de polarisation du piège au moment de l'extraction, soit $\langle E_c \rangle = q.U_{bias}$.

4.1.3 Détecteur diagnostic

Un détecteur sensible en position de 40 mm de diamètre (que l'on notera DSP_{biomol}) est placé à 295 mm du centre de la zone d'interaction dans la continuité de la trajectoire des ions (axe y). Celui-ci fonctionne tel que décrit dans la section 3.4. Ce détecteur est un élément essentiel du dispositif car il est notre principal outil de mesure des caractéristiques des paquets d'ions extraits du piège et nous permet notamment d'optimiser toute l'optique de guidage des ions. Ce détecteur nous permet de mesurer :

— le nombre d'ions par paquet,
— le temps de vol des ions entre leur extraction du piège T_0 et l'instant t de leur détection,
— la forme du paquet d'ions dans le plan (xOz) orthogonal à leur direction de propagation.
— la distribution en énergie des paquet d'ions (méthode indirecte).

Comme présentées sur la figure 4.1.6, plusieurs grilles atténuatrices de transmissions G_{tr} sont placées devant le détecteur. Elles permettent de réduire le nombre d'ions impactant le détecteur (transmission totale $G_{tr} = 4\ \%$), de séparer la zone du champ de post-accélération $\overrightarrow{E_a}$ de la zone d'interaction où les ions évoluent en l'absence de champ électrique et de mesurer l'énergie des ions. Deux grilles escamotables supplémentaires de transmissions 10 % et 1 % et

de surface 2,5x2,5 cm sont placées devant le détecteur, comme le montre la photographie de la figure 4.1.7. Celles-ci servent à réduire le nombre d'ions impactant le détecteur lorsque celui-ci devient trop grand.

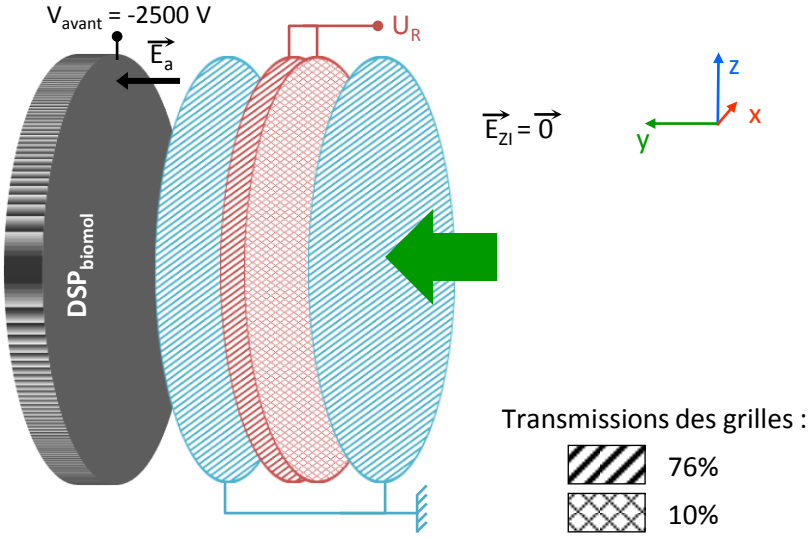


Figure 4.1.6 : *Schéma du montage des grilles devant le DSP_{biomol}. Un champ de post-accélération $\vec{E_a}$ est appliqué entre le détecteur et la première grille. Les grilles externes, en bleu, sont connectées à la masse et permettent de séparer les champs électriques de chaque région. Les grilles internes, en rouge, peuvent être polarisées à la tension $U_{grilles}$. Elles permettent de mesurer la distribution en énergie des ions moléculaires.*

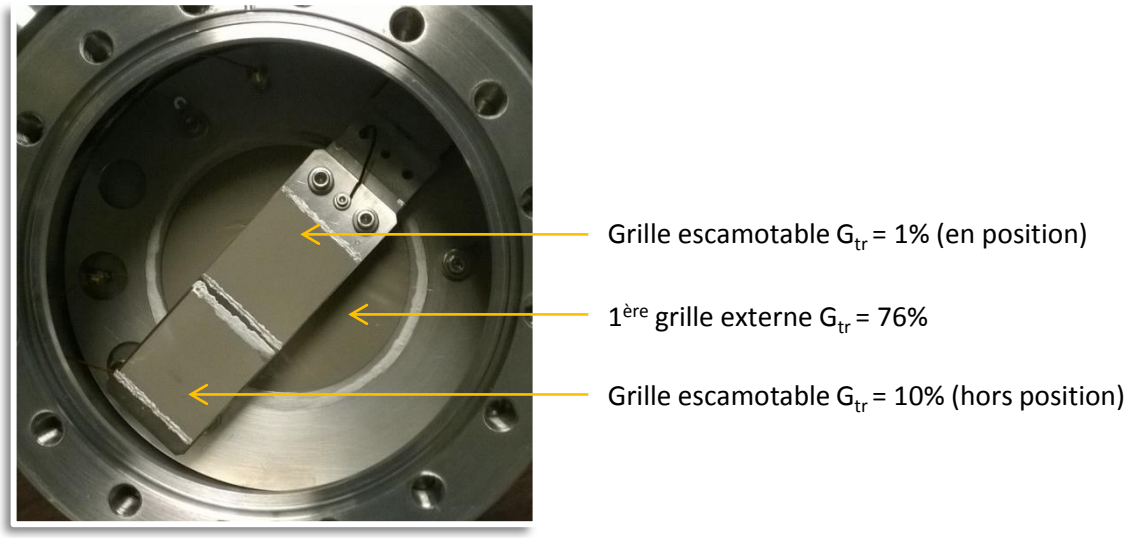


Figure 4.1.7 : *Photographie du montage des grilles escamotables de transmissions 10 % et 1 % devant les grilles du DSP_{biomol}. Ici, la grille de transmission 1 % est en place face au centre du détecteur. Les grilles peuvent être escamotées complètement loin du passage des ions.*

Efficacité de détection

Les ions ne possédant que quelques eV d'énergie cinétique, la face avant de la galette de ce détecteur est polarisée à une tension V_{avant} de -2500 V pour post-accélérer les ions avant l'impact et améliorer l'efficacité de détection. L'efficacité du détecteur ε a été mesurée pour des ions de rapport m/q = 161, 321 et 486 dans ces conditions. La méthode de mesure consiste à comparer le comptage des ions sur le détecteur et l'intensité, en pA, lue sur la grille escamotable de transmission 1 % au passage d'un faisceau cible continu (non piégé). L'intensité lue sur la grille est de l'ordre de 1 pA. Les résultats sont donnés dans la figure 4.1.8. L'incertitude sur la mesure est ici dominée par les fluctuations de l'intensité lue sur le pico-ampèremètre utilisé et par l'incertitude sur la valeur de transmission de la grille escamotable ($\sim$ 10 %). On observe bien une diminution de l'efficacité avec l'augmentation de la masse des ions (et donc diminution de la vitesse initiale). Ces valeurs sont cohérentes avec les résultats de la littérature [137, 138] présentée en figure 3.4.2. Ces valeurs seront utilisées par la suite pour déterminer le nombre d'ions arrivant sur le DSP_{biomol}.

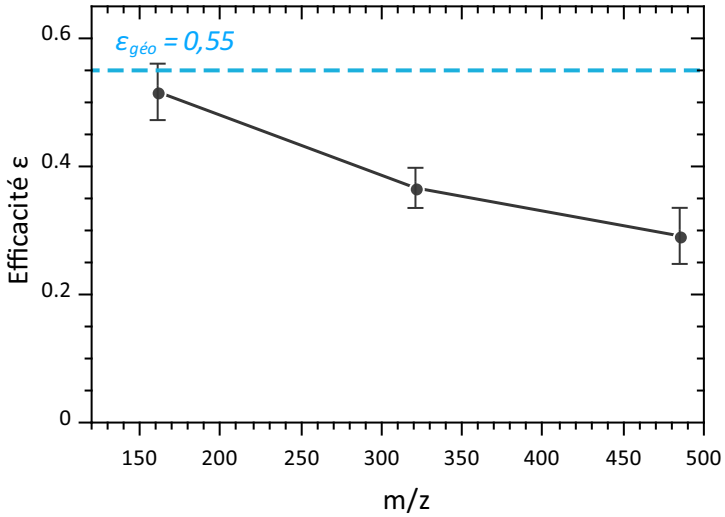


Figure 4.1.8 : *Mesures de l'efficacité de détection ε du DSP_{biomol} pour des ions de m/z = 161, 321 et 485 de $\sim$ 2500 eV d'énergie cinétique. L'efficacité maximale $\varepsilon_{géo}$ a été calculée selon l'équation 3.4.1 d'après les caractéristiques géométriques de ces galettes à micro-canaux.*

Efficacité de transmission des ions

Nous définissons l'efficacité globale de piégeage et de transmission du dispositif, ξ_{trans}, comme étant le rapport entre le nombre d'ions injectés à l'entrée du piège, N_{inj}, et le nombre d'ions par paquet présents dans la zone d'interaction, N_{ZI}. N_{inj} est le produit de l'intensité du faisceau de molécule en sortie du QMS, I_{ESI}, et de la durée d'injection des ions dans le piège, Δ_{inj}. N_{ZI} est déterminé par le nombre d'ions par paquet mesuré sur le détecteur, N_{det}, corrigé de l'efficacité de détection ε et de l'atténuation des grilles G_{tr}.

$$\xi_{trans} = \frac{N_{ZI}}{N_{inj}} \tag{4.1.1}$$

$$= \frac{N_{det}}{\varepsilon.G_{tr}} \times \frac{1}{I_{ESI}.\Delta_{inj}}. \tag{4.1.2}$$

L'efficacité globale de piégeage et de transmission des ions depuis le QMS jusqu'au DSP_{biomol} est de l'ordre de 1 à 2 %.

Mesure du temps de vol et forme 2D d'un paquet d'ions

Ce détecteur sensible en position nous permet de mesurer le temps de parcours d'un paquet d'ions depuis le piège. Nous utilisons le signal d'application du champ d'extraction du piège comme T_0 pour ces mesures de temps de vol. En addition, l'image du paquet d'ions est reconstruite selon le principe décrit précédemment en section 3.4.

La figure 4.1.9 présente un exemple de mesure de temps de vol et d'image dans le plan du détecteur pour un paquet d'ions de kanamycine de 15 eV d'énergie cinétique. On peut ainsi déterminer les différentes caractéristiques du paquet d'ions, ici :

— temps de vol : $\langle \text{tof} \rangle = 293$ μs et Δtof $= 20$ μs (largeur à mi hauteur)

— dimensions du paquet dans le plan xOz : Δx $= 15$ mm et Δz $= 12$ mm.

On notera que ce détecteur affiche une zone morte en son centre qui affecte la reconstruction de l'image. Cependant il a été vérifié, en positionnant le faisceau sur une zone active, que cette zone morte n'a pas d'influence sur le comptage du nombre d'ions impactant le détecteur.

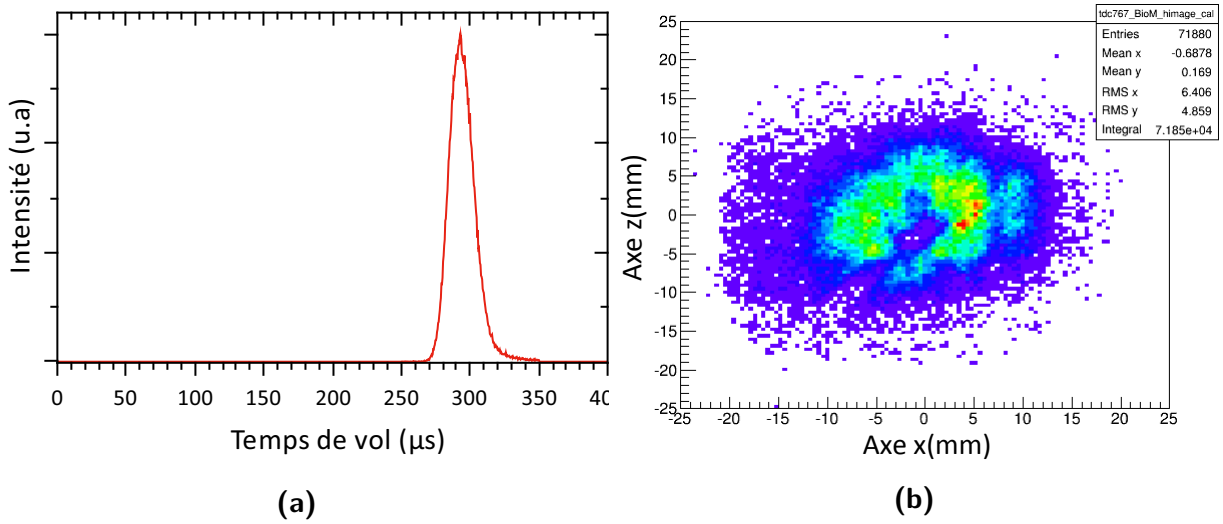


Figure 4.1.9 : ***(a)*** *: temps de vol et* ***(b)*** *: image dans le plan du détecteur d'un paquet de kanamycines protonées (m/q = 485) de 15 eV d'énergie cinétique.*

Mesure de l'énergie des ions

La mesure de la distribution en énergie des ions repose sur le principe du « champ retardeur » (*retarding field analyser*) grâce à l'ensemble de grilles montées devant le détecteur. Cette méthode consiste à mesurer la variation du nombre d'ions détectés en fonction d'un potentiel électrique U agissant comme une barrière pour tous les ions d'énergie cinétique inférieure à qxU.

Ici, les deux grilles intérieures rapprochées peuvent être polarisées à une tension U_R tandis que les deux grilles extérieures connectées à la masse permettent de séparer les différentes zones de champs électriques. Cette tension U_R sert de barrière de potentiel pour les ions. La variation du nombre d'ions détectés en fonction de la valeur de cette tension permet de retracer alors la distribution en énergie des paquets d'ions extraits du piège. Un exemple de mesure de l'énergie cinétique des ions avec cette méthode est présenté dans la section 4.2.2.2.

4.1.4 Zone d'interaction et analyse par spectrométrie de masse à temps de vol

Au centre de la zone d'interaction (ZI), le paquet d'ions cibles dirigé suivant l'axe y croise un pulse de quelques μs du faisceau d'ions projectiles dirigé suivant l'axe x. Ici le faisceau projectile doit être mis en forme de façon à optimiser la superposition du faisceau avec la forme des paquets d'ions cibles dans la zone d'interaction (voir section 4.2.2.5). Comme présenté dans le schéma de la figure 4.1.10, l'interaction entre les deux faisceaux se fait au sein de la zone de champ d'extraction d'un spectromètre de masse à temps de vol de type Wiley-McLaren (voir section 3.3), orienté dans l'axe z. Dans l'axe du faisceau projectile, deux iris (diaphragmes de diamètre variable) sont placés à l'entrée et à la sortie de la zone d'interaction, à équidistance du centre de la ZI. Ces iris, composés de lames métalliques, peuvent être utilisés pour limiter le diamètre du faisceau projectile entrant dans la ZI.

La pression dans la zone d'interaction est de l'ordre de 1-2.10^{-8} mbar. Un écran froid autour de la zone d'interaction peut être refroidi à la température de l'azote liquide, permettant ainsi de piéger les molécules d'eau sur les parois et de diminuer d'un facteur $\sim$ 3 la pression du gaz résiduel au sein de cette zone. Une pompe à sublimation de titane vient s'additionner au système de pompage et permet de piéger efficacement certaines molécules du gaz résiduel, tel que H_2, H_2O, N_2, CO et CO_2. Une pression de quelques 10^{-9} mbar peut être atteinte en utilisant ces deux techniques. Á cette pression, la densité du gaz résiduel est de quelques 10^8 molécules/cm^3.

Descriptif du spectromètre de masse à temps de vol

La géométrie particulière de ce spectromètre de masse à temps de vol, associé à une détection sensible en position, permet la différenciation des ions selon leur vitesse initiale et

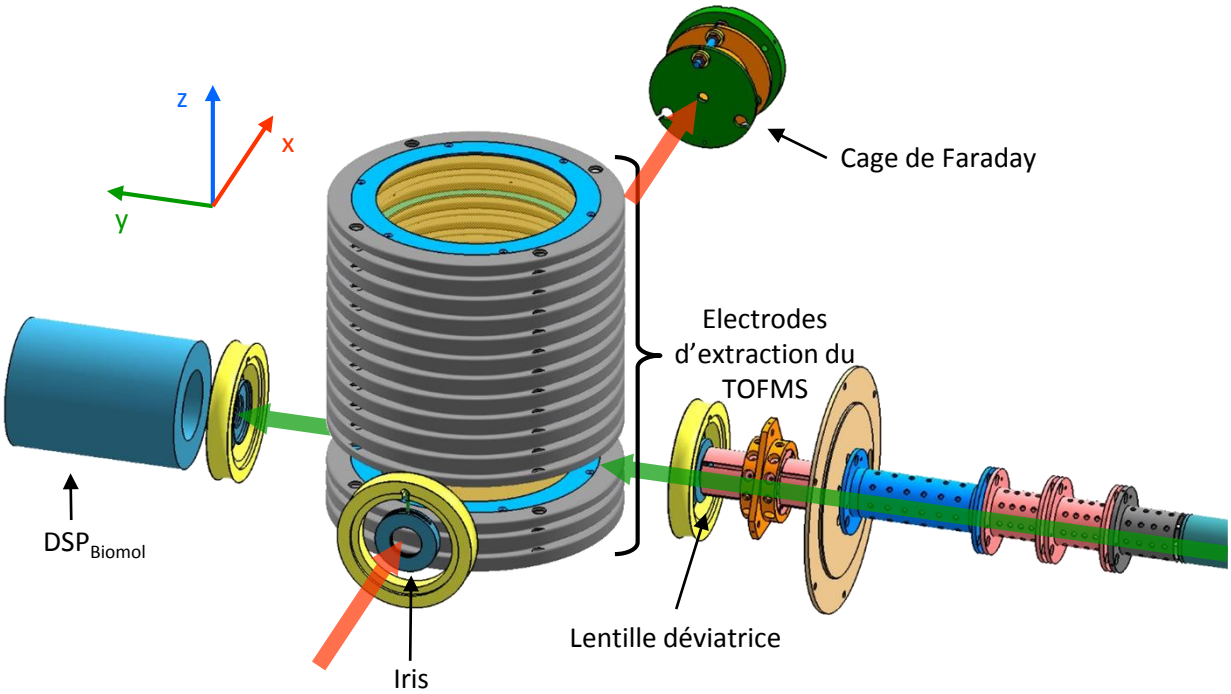


Figure 4.1.10 : *Schéma technique détaillé de la zone d'interaction. Les faisceaux cible et projectile se croisent dans la zone de champ d'extraction du spectromètre de masse à temps de vol de type Wiley-McLaren. Une cage de Faraday escamotable devant un profileur à fils permet de mesurer l'intensité du faisceau projectile traversant la zone d'interaction.*

donc la séparation entre les ions cibles et le gaz résiduel ionisé par le faisceau projectile. Ses performances seront détaillées en section 4.2.4.

Nous allons ici garder les notations de la section 3.3 pour décrire la géométrie du spectromètre. La zone d'extraction/interaction est composée d'un total de 15 électrodes de 90 mm de diamètre intérieur et espacées de 10 mm dans l'axe z. Le champ d'extraction $\vec{E_1}$ est créé entre la 1ère et la 12e électrode sur une distance $d_1 = 12$ cm. L'espacement entre la troisième et la quatrième électrode fait exception et est de 20 mm pour permettre le passage des deux faisceaux : cette région constitue la zone d'interaction. Le centre de la zone d'interaction est à une distance z' $= 9$ cm de la seconde région du spectromètre. Cette seconde région d'accélération et de champ électrique $\vec{E_2}$ est formée des électrodes 12 à 15 sur une longueur $d_2 = 3$ cm. La longueur de la zone de vol libre est de L $= 126$ cm. Des grilles de 76 $\%$ de transmission séparent les zones d'extraction/accélération et accélération/vol libre.

Comme présenté en figure 4.1.11, l'ensemble des électrodes d'extraction peut pivoter autour d'une sphère en céramique dont le centre est situé 50 mm en dessous du centre de la ZI. Deux mécanismes indépendants permettent de faire pivoter le système suivant les plans yOz et xOz respectivement selon des angles $\theta = \pm 2°$ et $\phi = \pm 2°$. En pratique ϕ est fixée à $0°$ pour orienter θ uniquement dans le plan yOz. De cette manière, il est possible de compenser la vitesse initiale des ions et de modifier leur trajectoire et leur point d'impact sur le détecteur.

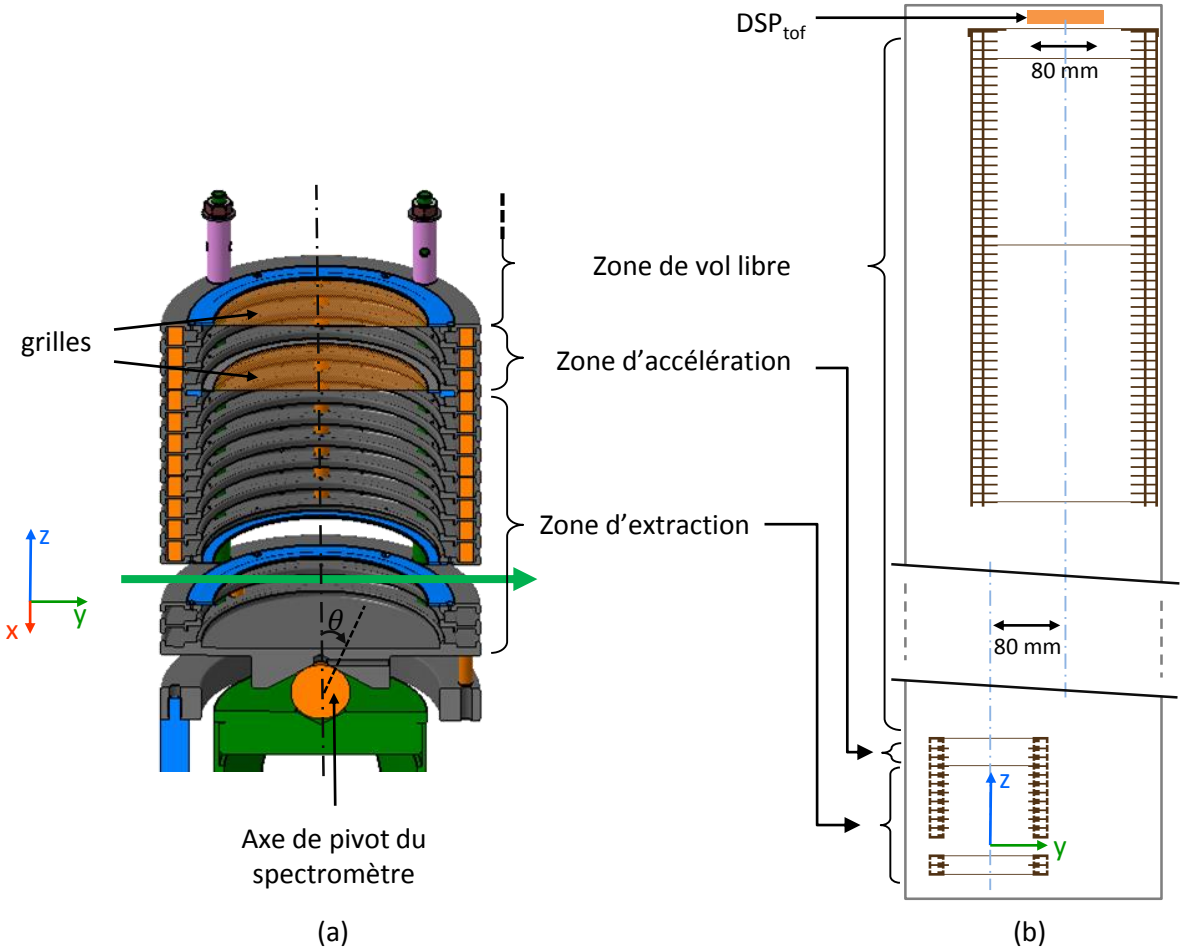


Figure 4.1.11 : ***(a)*** *: Vue en coupe de la zone d'extraction/accélération du spectromètre de masse à temps de vol installé sur PIBALE.* ***(b)*** *: Vue de la géométrie du spectromètre dans SIMION. On notera la présence des électrodes du miroir électrostatique dans la zone de vol libre mais non uilisées (potentiel nul sur ces électrodes).*

Pour cette géométrie, la focalisation en position est obtenue pour $E_2/E_1 \simeq 8{,}4$. En pratique, on applique la haute tension V_1 sur la première électrode du spectromètre et un pont de résistances permet d'appliquer les tensions sur chaque autre électrode avec le bon rapport des champs électriques ($R_{E1} = 1{,}3$ kΩ entre les électrodes 1 à 12 et $R_{E2} = 11$ kΩ entre les électrodes 12 à 15). Ainsi par exemple pour $V_1 = 4$ kV, on a $E_1 = 107{,}3$ V/cm et $E_2 = 904$ V/cm. Par la suite et pour simplifier, nous utiliserons le potentiel V_1 plutôt que les champs électriques $\vec{E_1}$ et $\vec{E_2}$ dans les discussions. Les temps de montées des tensions sur les électrodes ont été mesurés et varient de $\sim$ 200 ns pour la première électrode, où est appliquée la haute tension V_1, à presque 1 μs pour la dernière.

Un détecteur sensible en position de 80 mm de diamètre, noté PSD$_{tof}$ par la suite, est placé au bout de la zone de vol libre dans le plan xOy. Le centre du détecteur est décalé de 80 mm suivant l'axe y par rapport au centre de la zone d'interaction et s'étend donc sur [40 ; 120] mm

dans cet axe. Deux grilles de 76 % de transmission sont placées à 4,7 mm de la face avant de la première galette du détecteur. La grille la plus proche du détecteur est polarisable à la tension U^{tof}_{grille}. Un potentiel de -2800 V est appliqué en face avant du détecteur pour accélérer les ions avant leur impact et ainsi augmenter l'efficacité de détection des galettes. L'énergie totale d'impact sur le détecteur vaut alors q.[V_{ZI}+2800] où V_{ZI} est le potentiel au centre de la zone d'interaction ($V_{ZI} = 0{,}92 \times V_1$).

L'utilisation d'ions de basse énergie (15 - 20 eV) implique un fonctionnement pulsé des champs d'extraction. Ainsi les champs d'extraction sont nuls lorsqu'un paquet d'ions cibles pénètre la zone d'interaction et la tension V_1 est appliquée après l'interaction du faisceau projectile avec le paquet cible. Un retard de quelques centaines de nanosecondes est respecté pour laisser ces derniers sortir de la ZI avant l'application du champ d'extraction. Ceci est nécessaire pour ne pas dévier le faisceau projectile dont l'impact sur une paroi de la zone d'interaction entraînerait une importante pollution des spectres de temps de vol.

On notera la présence d'un miroir électrostatique non utilisé à ce jour, composé de 54 électrodes de 150 mm de diamètre et espacées de 1 cm. Celui-ci, dessiné dans la vue SIMION de la figure 4.1.11, s'entend dans la zone de vol libre et suit le même axe que celui du DSP_{tof}. La dernière électrode se trouve à 9 mm de la face avant du détecteur. Ce miroir électrostatique permettra d'utiliser le spectromètre de masse à temps de vol en mode réflectron. Nous n'en discuterons pas dans cette thèse.

4.1.5 Source d'ions projectiles

Pour la phase de test et de développement du projet PIBALE, une source d'ions monochargés intense développée au GANIL est utilisée pour produire le faisceau d'ions projectiles. Cette source est dédiée à PIBALE et permet un fonctionnement « hors-ligne » indispensable pour la période de test du dispositif complet. Il est cependant envisagé à terme de coupler la source d'ions cibles et le spectromètre de PIBALE aux sources d'ions multichargés de ARIBE/GANIL. La source Mono1000 [142] , présentée en figure 4.1.12, est une source de type ECR permettant d'accélérer des faisceaux d'ions monochargés jusqu'à 7 keV d'énergie cinétique. Une intensité maximale de l'ordre de 100 μA est disponible dans la zone d'interaction. Le faisceau projectile est pulsé puis mis en forme à l'aide d'un triplet de quadripôles avant d'atteindre la zone d'interaction pour les expériences de faisceaux croisés. Une cage de Faraday escamotable et un profileur sont placés à 455 mm après le centre de la zone d'interaction pour mesurer l'intensité et les profils du faisceau. On peut noter que toute la ligne faisceau jusqu'à la zone d'interaction est montée sur le même axe. La propagation de particules neutres de la source vers la zone d'interaction est donc possible.

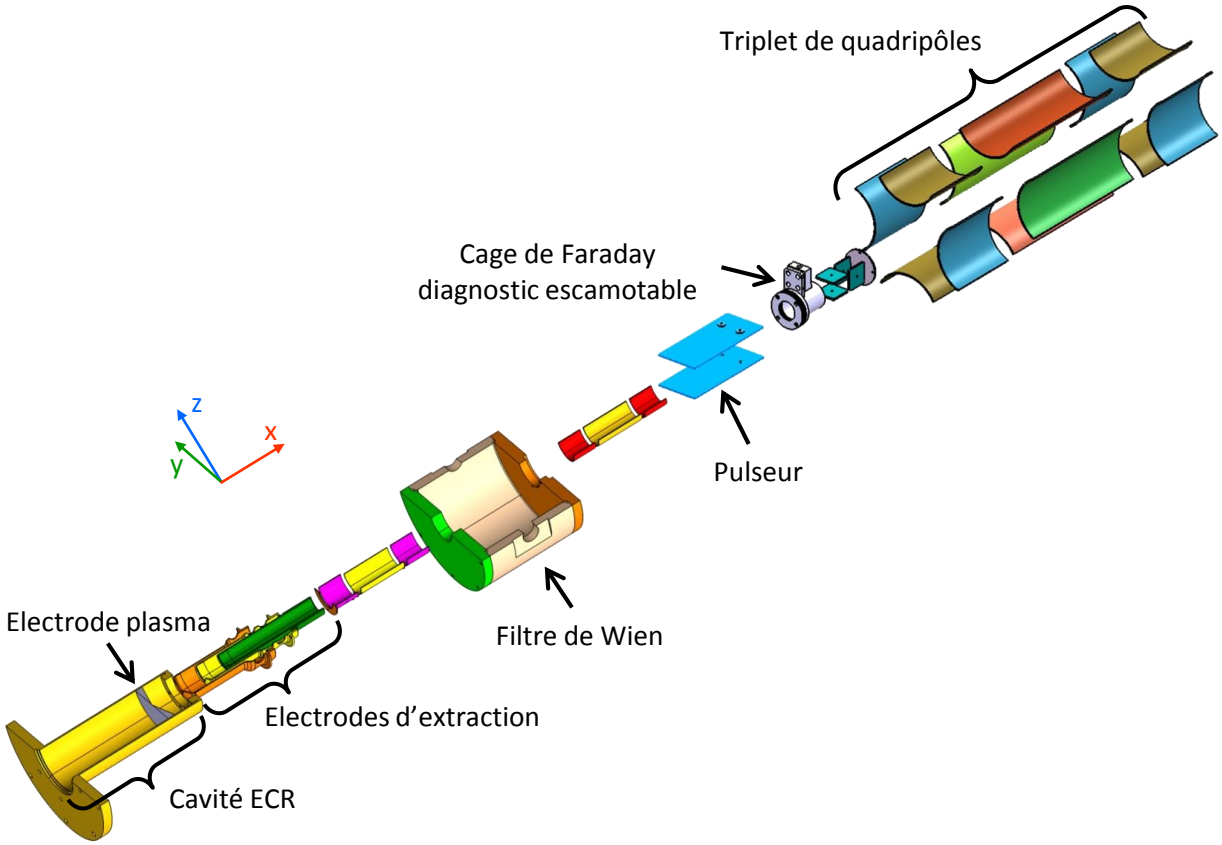


Figure 4.1.12 : *Vue d'ensemble de la source d'ions projectiles Mono1000, de la cavité ECR au triplet de quadripôles.*

Source ECR et extraction

La source ECR fonctionne à une fréquence de 2,45 GHz et une puissance nominale de 300 W. Elle est constituée d'une cavité en cuivre entourée de deux aimants permanents de forme annulaire. La cavité est remplie avec un gaz (hélium ou argon) à basse pression ionisé pour former le faisceau d'ions projectiles. L'extraction des ions se fait au travers d'une électrode plasma en aluminium de 3 mm de diamètre intérieur pour limiter l'émittance du faisceau. Un système d'extraction à trois électrodes permet d'accélérer les ions en sortie de la chambre plasma.

Filtre en vitesse

Le faisceau d'ions ainsi produit traverse un filtre en vitesse (filtre de Wien, *Peabody Scientific*) pour sélectionner l'ion d'intérêt. Le principe de fonctionnement de ce filtre, schématisé en figure 4.1.13, repose sur la compensation de la force résultant d'un champ magnétique à l'aide d'un champ électrique de manière à laisser passer les ions d'une vitesse donnée. Un champ magnétique vertical permanent $\vec{B}_z$ et un champ électrique $\vec{E}_y$ ajustable créent une force de

Lorentz $\vec{F}_{Lorentz}$ qui s'exprime pour des ions de charge q et de vitesse initiale v_{x0} à l'entrée du filtre :

$$\vec{F}_{Lorentz} = q(\vec{E} + \vec{v} \wedge \vec{B}) \tag{4.1.3}$$

$$= q(E_y - v_{x0}B_z).\vec{y} \tag{4.1.4}$$

Les ions peuvent traverser le filtre de Wien si la force de Lorentz exercée est nulle et donc lorsque leur vitesse remplit la condition :

$$v_{x0} = \frac{E_y}{B_z} \tag{4.1.5}$$

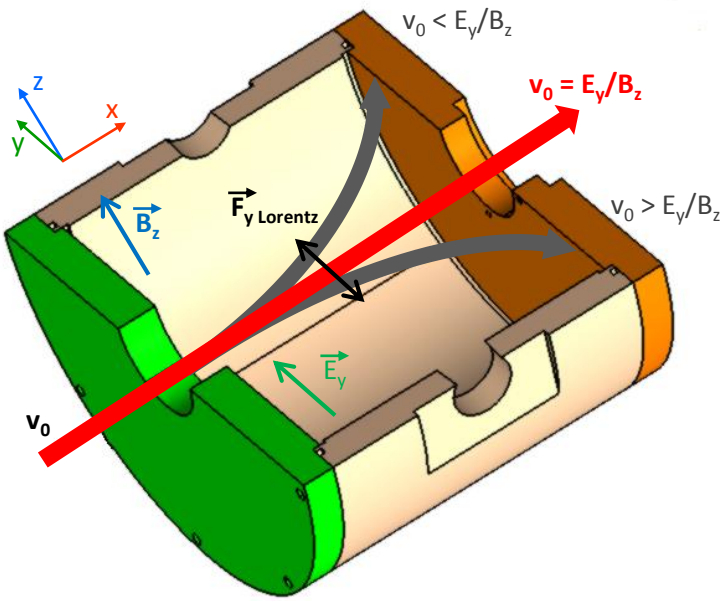


Figure 4.1.13 : *Schématisation du principe du filtre de vitesse de Wien.*

En pratique, la valeur du champ électrique est ajustée avec la valeur du potentiel électrique appliqué, noté U_{Wien}, de manière à sélectionner les ions d'une vitesse donnée. La résolution du filtre dépend alors du diamètre intérieur du diaphragme de sortie du filtre avec un compromis entre résolution et transmission. Plus celui-ci est grand plus le filtre laisse passer des ions de dispersion en vitesse Δv élevée. Dans notre cas le diaphragme de sortie du filtre a un diamètre intérieur de 20 mm pour favoriser l'intensité du faisceau.

La figure 4.1.14 présente l'intensité de faisceaux d'ions He^+ et Ar^+ de 3, 5 et 7 keV d'énergie cinétique, mesurée sur la cage de Faraday diagnostic intermédiaire, en fonction du potentiel de compensation U_{Wien}. On pourra noter que de plus hautes intensités peuvent être atteintes pour des faisceaux d'hélium dues aux caractéristiques de la source plasma [142].

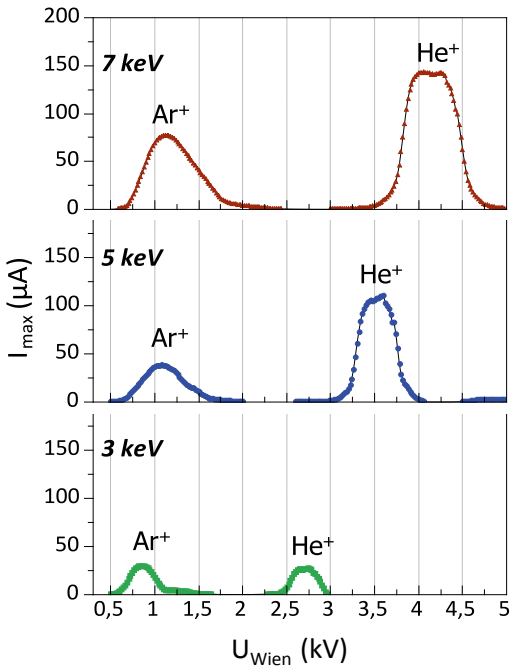


Figure 4.1.14 : *Intensité de faisceaux d'ions He^+ et Ar^+ mesurée en sortie du filtre de Wien en fonction du potentiel U_{Wien} de compensation de la force de Lorentz exercée par le champ magnétique du filtre pour trois énergies des ions (3, 5 et 7 keV).*

Pulsation du faisceau

Un déviateur électrostatique (ou *pulseur*) composé de deux plaques parallèles de 140 mm est placé devant la cage de faraday escamotable, comme indiqué sur la figure 4.1.12. Il permet de couper le faisceau continu en pulses courts de quelques μs en déviant le faisceau par intermittence à l'aide d'une haute tension appliquée sur l'une des plaques (V $\sim$ 1000 V, la seconde restant connectée à la masse). Cette tension est portée à 0 V pendant une durée Δ_{pulse} pour laisser passer un pulse de faisceau vers la zone d'interaction.

De cette manière le nombre d'ions attendus dans un pulse vaut $N = I \times \Delta_{\text{pulse}}$ où I est l'intensité du faisceau d'ions continu, en nombre de particules par seconde. Cependant, les ions les plus en avant et en arrière du pulse d'ions ressentent le changement de tension du déviateur entre la haute tension et zéro. La trajectoire de ces ions s'en trouve déviée et ils sont alors perdus, diminuant le nombre réel d'ions dans le pulse. Cet effet apparait d'autant plus important que la durée du pulse est courte et que la vitesse des ions est basse. On peut noter que les temps de montée et de descente de la haute tension ne sont plus négligeables lorsque la durée du pulse devient court, entrainant aussi une diminution du nombre d'ions dans le pulse.

Cet effet peut aussi être interprété comme un raccourcissement de la durée réelle du pulse projectile Δ_{proj} par rapport à la durée de la pulsation du déviateur Δ_{pulse}. La figure 4.1.15 montre ainsi l'évolution du $\Delta_{\text{proj}}/\Delta_{\text{pulse}}$ en fonction Δ_{pulse} pour des faisceaux d'He^+ et d'Ar^+ de 7 keV d'énergie cinétique (v = 581 mm/μs et 184 mm/μs respectivement). C'est cette durée

réelle qui doit être prise en compte pour la synchronisation des faisceaux (voir section 4.2.3). En pratique, on travaille avec des durées de pulses Δ_{pulse} de 1 à 5 μs.

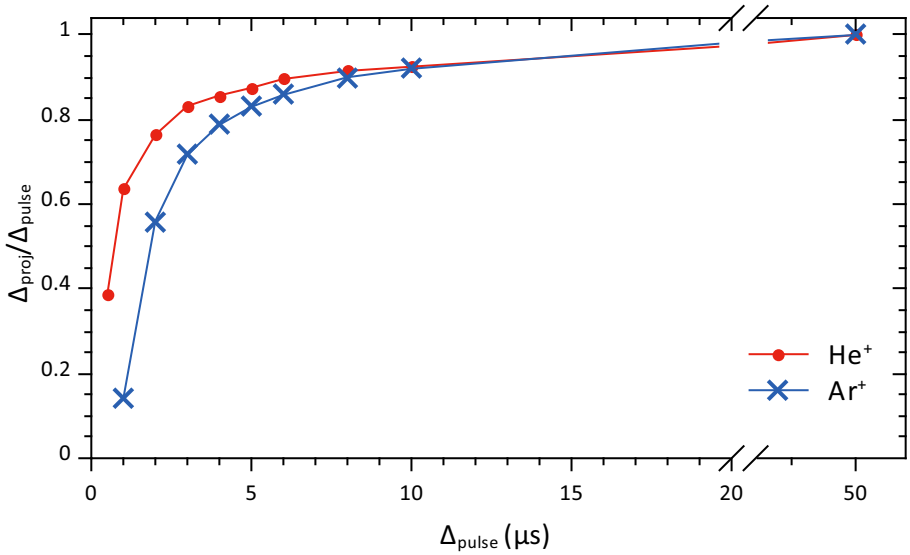


Figure 4.1.15 : *Rapport $\Delta_{proj}/\Delta_{pulse}$ en fonction Δ_{pulse} pour des faisceaux d'ions He^+ et Ar^+ de 7 keV d'énergie cinétique sur une cage de Faraday après la zone d'interaction. Les valeurs sont normalisées par rapport à celles obtenues pour $\Delta_{pulse} = 50$ μs.*

Mise en forme du faisceau

Un triplet de quadripôles, présenté sur la figure 4.1.12, vient terminer la ligne d'optique du faisceau d'ions de la Mono1000. Il permet la mise en forme du faisceau dans le plan transverse (yOz) dans le but de maximiser le recouvrement avec les paquets d'ions cibles. Le paquet d'ions cibles ayant une forme allongée dans l'axe y (voir section 4.2.2.5), le faisceau projectile doit être mis en forme de « bâtonnet horizontal ». Des mesures de profil du faisceau peuvent être réalisées à l'aide d'un profileur constitué de 47 fils verticaux et horizontaux espacés de 0,5 mm. Les mesures de profil présentées en figure 4.1.16 ont été réalisées pour faisceau d'He^+ de 7 keV d'énergie cinétique. Ces mesures montrent qu'il est possible de mettre le faisceau en forme d'ellipsoïde horizontale de $\Delta y \sim 15$ mm et $\Delta z \sim 4$ mm, proche des dimensions d'un paquet d'ions cibles dans la ZI. La fome du faisceau au niveau de la zone d'interaction est déduite de la mesure sur le profileur et de simulations grâce au logiciel SIMION.

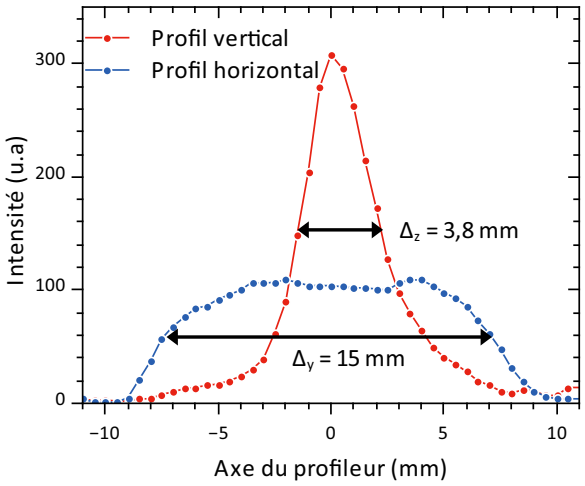


Figure 4.1.16 : *Profil horizontal et profil vertical dans le plan (yOz) d'un faisceau d'He$^+$ de 7 keV d'énergie cinétique mesurés à 445 mm du centre de la zone d'interaction par le profileur.*

4.2 Développement et caractérisation du dispositif

Dans cette partie, nous allons aborder plus en détails des points et aspects clefs du dispositif PIBALE qui conditionnent la densité d'ions cibles dans la zone d'interaction et notre capacité à obtenir un bon recouvrement entre les faisceaux cibles et projectiles. Dans un premier temps sera présenté le développement d'un nouveau funnel destiné à augmenter l'intensité des ions cibles en amont du piège de Paul. Les limitations de ce piège de Paul et leurs influences sur le fonctionnement cyclique du dispositif et sur les caractéristiques d'un paquet d'ions au centre de la zone d'interaction seront ensuite détaillées, puis nous parlerons de la méthode utilisée pour synchroniser les faisceaux et présenterons un aspect physique observable nous permettant d'assurer le bon recouvrement spatial des faisceaux. Enfin, nous expliquerons en quoi le spectromètre de masse à temps de vol de PIBALE implique l'utilisation d'ions de basse énergie et comment la géométrie particulière de celui-ci nous permet de discriminer les ions selon leurs vitesses initiales.

4.2.1 Développement et mise en place d'un nouveau funnel

L'objectif de ce travail aura été d'améliorer le funnel existant de manière à augmenter la production d'ions moléculaires cibles. Les solutions envisagées ne devaient pas nécessiter de modification ni de la chambre du funnel ni de de l'alimentation RF, conçue pour fonctionner en résonance avec la capacité du précédent montage ($\sim$ 200 pF). Nous verrons ici les différents points du développement et la caractérisation du nouveau funnel. La figure 4.2.1 présente des photographies de ce montage avant son installation sur le dispositif PIBALE.

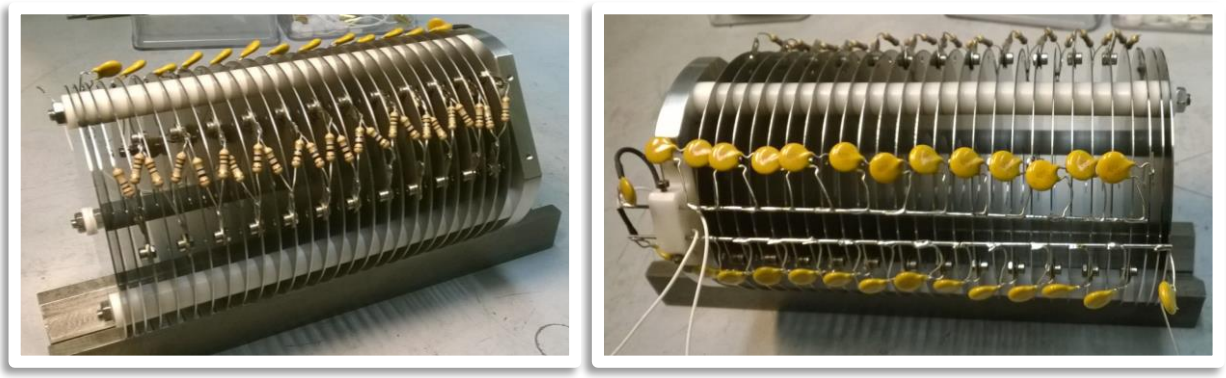


Figure 4.2.1 : *Photographies du montage du funnel (certaines distances inter-électrodes ont été modifées après la prise).*

4.2.1.1 Conception du funnel

Le montage d'un funnel couplé à une source ESI permet d'améliorer la transmission des ions en sortie d'un capillaire dans des régions de pression élevée (de 0,1 à quelques mbar). Comme expliqué précédemment dans la section 3.2.1, un champ électrique radio-fréquence (RF) permet de confiner les ions le long de l'axe du funnel. Cela permet de compenser les déviations des trajectoires des ions par collisions avec les molécules du gaz résiduel. Un champ électrique axial supplémentaire permet de guider les ions vers la sortie du funnel.

Un funnel a été précédemment conçu pour PIBALE [110] en suivant la géométrie simplifiée proposée par R.R. Julian [119]. Ce funnel est composé de 26 électrodes espacées de 5 mm dont 11 électrodes de rayon intérieur $\rho = 19$ mm constant, suivies de 15 électrodes de rayons intérieurs décroissants de 18 à 4 mm. Un gradient de potentiel est appliqué entre la 1ère et la 24e électrode, tandis que les électrodes 25 et 26 peuvent être polarisées à des tensions indépendantes. Un potentiel radiofréquence est appliqué sur les 26 électrodes, avec des phases opposées entre électrodes adjacentes. Un diaphragme de 2 mm de diamètre intérieur permet un pompage différentiel entre les chambres du funnel et du premier octopôle. Cependant le large diamètre de la dernière électrode de ce funnel ne permet pas une focalisation du faisceau suffisamment importante pour transmettre les ions au travers du diaphragme de sortie. Pour cette raison l'efficacité de transmission de ce funnel est très faible dans notre cas.

Des modifications de la géométrie de ce funnel ont été entreprises pour améliorer cette transmission, appuyées par des simulations à l'aide du logiciel SIMION. Les simulations ont été réalisées pour des ions de rapport m/q = 136, correspondant à une molécule d'adénine protonée. Les collisions des ions avec le gaz résiduel ont été prises en compte en utilisant un modèle simple de collisions de sphères dures sur des molécules de diazote à une température de 300. Knapman *et co.* [146] ayant montré que les sections efficaces de collisions entre des petites molécules (m/q $<$ 200) et un gaz d'hélium ou de diazote sont comparables, la section efficace de collision pour l'adénine a été déterminée dans le cas d'un gaz d'hélium. Le calcul

réalisé avec le programme *Mobcal* [147, 148] nous donne une section efficace $\sigma = 54.10^{-20}$ m^2.

On notera que la vitesse d'écoulement du gaz le long du funnel est un paramètre critique dans la simulation pouvant modifier jusqu'à 20 % l'efficacité de transmission du funnel. La différence de pression entre l'atmosphère et la chambre du funnel génère une vitesse d'écoulement du gaz dans l'axe du funnel de l'ordre de 100 m/s pour une pression de 1 mbar dans la chambre du funnel [123]. L'écoulement du gaz joue un rôle évident dans le transport des ions le long du funnel et agit comme une force supplémentaire entraînant les ions vers la sortie. Expérimentalement, on observe que les ions traversent le funnel même lorsque le gradient de potentiel appliqué est négatif de plusieurs V/cm. Page *et co.* [123] proposent que cette vitesse d'écoulement v_{gaz} peut s'exprimer comme un champ électrique E_{gaz} en fonction du coefficient de mobilité ionique K, tel que $K.E_{gaz} = v_{gaz}$. Ils concluent, pour une vitesse d'écoulement de 100 m/s et un coefficient $K \sim 10^3$ cm^2.V^{-1}.s^{-1} avec une pression de 1,3 mbar de diazote, que le champ électrique équivalent vaut $E_{gaz} \sim 10$ V/cm. Comme la vitesse d'écoulement n'a pas été déterminée expérimentalement, nous avons systématiquement comparé les résultats des simulations SIMION sans et avec écoulement (100 m/s) lors de la recherche d'une nouvelle géométrie de funnuel. Les simulations SIMION présentées dans la suite ne prennent pas en compte cet écoulement.

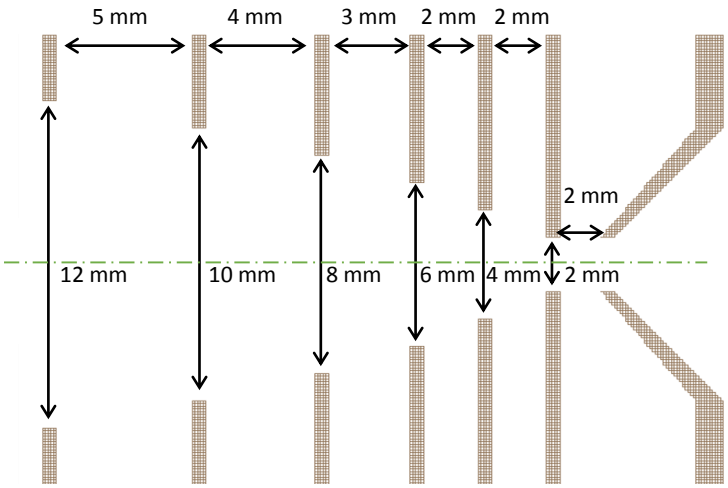


Figure 4.2.2 : *Schéma des électrodes 23 à 28 et du diaphragme de sortie du funnel. Les distances inter-électrodes et le diamètre intérieur des électrodes sont indiqués en millimètres.*

La principale modification de la géométrie du funnel envisagée fût d'ajouter trois électrodes de diamètre intérieur ϕ de 6, 4 et 2 mm pour focaliser le faisceau d'ions à proximité du diaphragme de 2 mm de diamètre. Cependant, comme présenté précédemment en section 3.2.1, l'espacement entre deux électrodes voisines doit être inférieur à la moitié de leur rayon intérieur pour que le pseudo-potentiel créé par le champ RF ne soit pas à l'origine de confinement localisé des ions. Ainsi, les distances entres les électrodes de diamètres intérieurs de 10 à 2 mm ont été réduites selon le schéma de la figure 4.2.2.

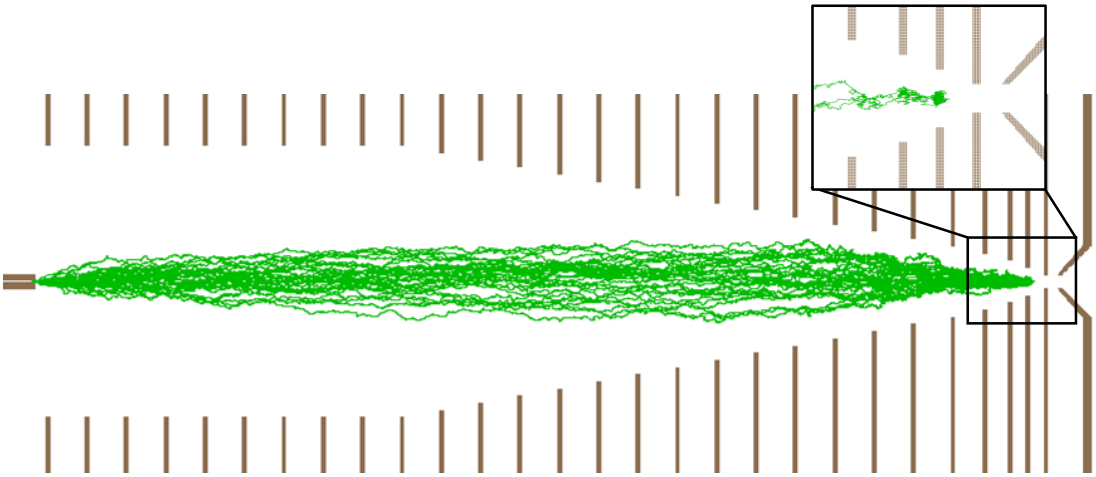


Figure 4.2.3 : *Simulation SIMION du funnel dans le cas où le potentiel RF est appliqué à toutes les électrodes. L'amplitude RF est de $V_0 = 100$ V et le gradient de potentiel est de ~ 6 V/cm. La vitesse d'écoulement du gaz tampon n'est pas inclue dans cette simulation. On observe le piégeage des ions au niveau de l'avant dernière électrode de rayon $\rho = 2$ mm.*

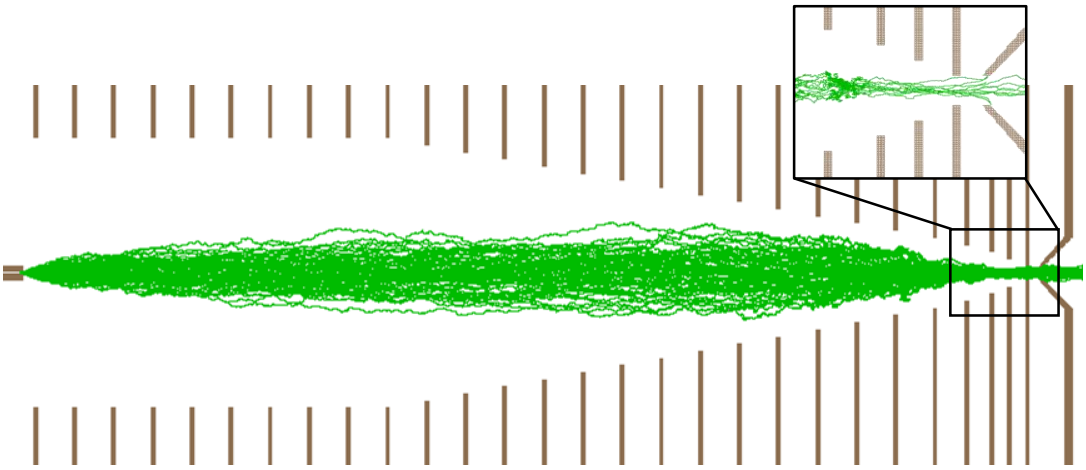


Figure 4.2.4 : *Simulation SIMION du funnel dans le cas où le potentiel RF est appliqué à toutes les électrodes excepté les deux dernières. L'amplitude RF est de $V_0 = 100$ V et le gradient de potentiel est de ~ 6 V/cm. La vitesse d'écoulement du gaz tampon n'est pas inclue dans cette simulation. Les ions sont transmis au travers du diaphragme de 4 mm de diamètre intérieur avec une efficacité de l'ordre de 70 %.*

Comme le montrent les simulations SIMION de la figure 4.2.3 cette modification n'est pas suffisante et des effets de confinement des ions apparaissent entre les dernières électrodes du funnel. En découplant les deux dernières électrodes du potentiel RF, le pseudo-potentiel est donc nul localement et le confinement peut être évité. L'intérêt de cette modification supplémentaire simple est confirmée par les simulations, comme présenté en figure 4.2.4 où les ions traversent le diaphragme de sortie sans être piégé. Cependant en l'absence de ce potentiel RF, il est aussi plus délicat de conserver une trajectoire des ions proches de l'axe à proximité du diaphragme

de sortie. Ainsi l'optimum de transmission est très sensible aux potentiels continus appliqués sur les deux dernières électrodes. L'efficacité de transmission des ions au travers du funnel à la sortie du diaphragme est estimée de l'ordre de 70 % selon ces simulations, contre moins de 10 % avec la précédente géométrie.

Le montage final de cette version modifiée du funnel suit le schéma électrique de la figure 4.2.5. Des capacités de 1 nF permettent de découpler la tension RF de confinement radiale et la tension continue de guidage axial. Des résistances de 10 MΩ permettent d'appliquer un gradient de potentiel sur les électrodes 1 à 26 à partir des tensions U_i et Uf. Les deux dernières électrodes sont uniquement polarisées à une tension continue, respectivement U_{27} et U_{28}. Les électrodes 1 à 26 sont reliées au potentiel RF avec une phase opposée entre électrodes paires et impaires.

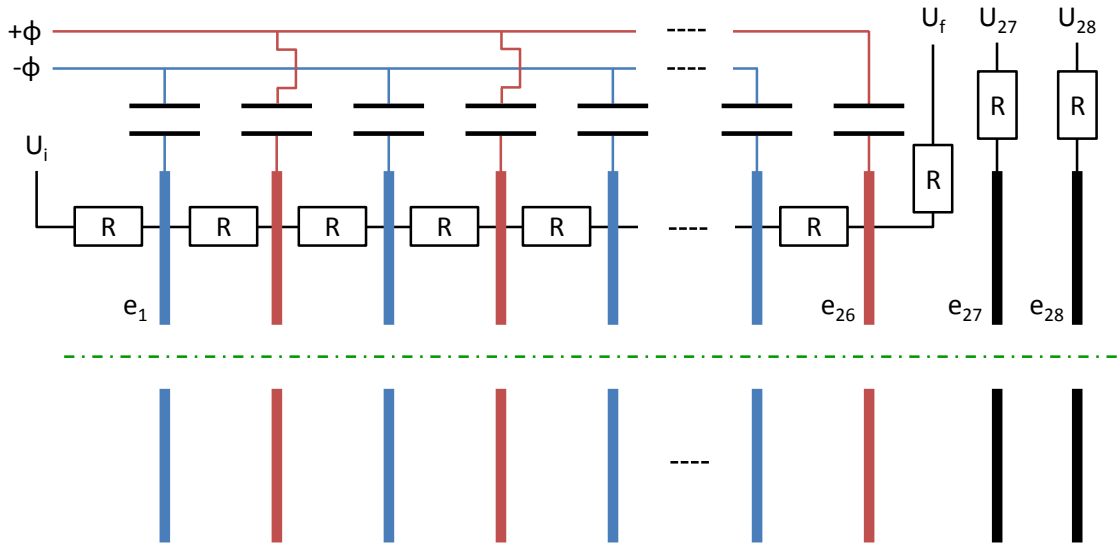


Figure 4.2.5 : *Schéma du montage électrique du funnel actuellement monté sur PIBALE. Un pont de résistance R permet d'appliquer un gradient de potentiel continu entre les électrodes 1 et 26. Ces électrodes sont connectées à une tension RF de phase opposée entre électrodes paires et impaires. Les électrodes 27 et 28 sont uniquement polarisées par des tensions continues indépendantes.*

4.2.1.2 Caractérisation du funnel

Une alimentation de tension radio-fréquence permet d'appliquer le potentiel RF sur le funnel. La fréquence de l'oscillation délivrée (1,37 MHz) correspond à la fréquence de résonance de l'alimentation connectée à la capacité du funnel (∼ 200 pF). Il a été mesuré que la tension réellement appliquée sur les électrodes du funnel est de 75 % de la valeur de consigne de l'alimentation RF. Pour définir expérimentalement les paramètres de fréquence et de pression optimaux pour un faisceau d'adénine protonée, nous avons mesuré l'intensité du signal en sortie du QMS en fonction de l'amplitude V_{RF} du potentiel RF, pour différentes valeurs de pression

dans la chambre du funnel. Les variations de pression ont pu être réalisées en régulant la capacité de pompage à l'aide d'une vanne manuelle entre la chambre du funnel et la pompe primaire de cette chambre. Les résultats de ces mesures sont présentés en figure 4.2.6. On observe qu'à une pression donnée, il existe une valeur de V_{RF} qui maximise la transmission des ions au travers du funnel. L'augmentation de la pression fait apparaître un décalage de ce maximum vers de plus hautes valeurs de V_{RF}. De la même façon il existe un optimum de pression pour laquelle la transmission des ions est maximale. Pour notre montage, cette pression optimale se trouve autour de 0,8 mbar. La diminution de la transmission à plus basse pression peut s'expliquer par le fait que le libre parcours moyen des ions augmente, donc que la vitesse acquise entre deux chocs avec le gaz résiduel est plus importante. Ainsi l'énergie interne des ions après une collision est plus élevée et peut plus facilement conduire à la dissociation de l'ion parent. On peut enfin noter que de manière générale la valeur de V_{RF} doit augmenter pour le guidage d'ions plus lourds.

De plus, les collisions dans le gaz au sein du funnel participent au processus de désolvatation des micro-gouttelettes produites par la source ESI. Dès lors, on observe que l'augmentation de la température du capillaire chauffant entraîne une diminution de l'intensité du faisceau et une augmentation des fragments sur les spectres de masses observés en sortie du QMS.

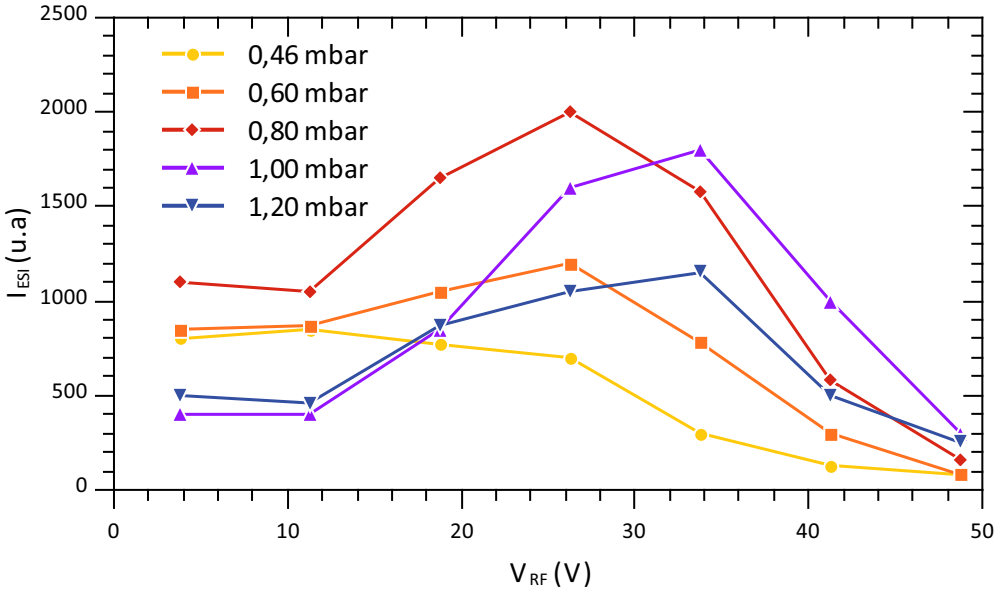


Figure 4.2.6 : *Intensité d'un faisceau d'adénine protonée mesurée en sortie du QMS en fonction de l'amplitude de la tension RF du funnel V_{RF}, pour différentes pressions dans la chambre du funnel.*

Pour résumer, le montage de ce nouveau funnel a permis d'augmenter d'un facteur 3 l'intensité du faisceau de molécules par rapport à un montage sans funnel. La transmission devrait pouvoir être encore améliorée en diminuant la distance entre les électrodes. Ceci est en partie dû au fait que le pseudo potentiel V^* varie en $1/d^2$ (voir éq.3.2.7) permettant un meilleur confinement le long de l'axe du funnel.

4.2.1.3 Perspective : augmentation de l'intensité du faisceau de molécules

Plusieurs modifications de la source d'ions moléculaires peuvent être considérées pour augmenter l'intensité de molécules en amont du piège.

Une des modifications possibles consisterait à modifier complètement la géométrie du funnel. Le montage du funnel développé par l'équipe de Richard D. Smith [118, 121] apparaît comme une bonne alternative puisque cette équipe a obtenu des intensités de faisceau de plusieurs nA en sortie de ce funnel.

Une autre modification de la source d'ions est d'augmenter le diamètre intérieur du capillaire d'entrée du dispositif devant la source ESI pour obtenir un flux de molécules plus important. Cependant pour garder une pression optimale pour le fonctionnement de notre funnel (8.10^{-1} mbar) il est nécessaire de remplacer la pompe primaire en place par une de plus grande capacité de type *Roots*. Ce nouveau capillaire et cette pompe devraient être installés au second semestre de cette année 2016. Nous espérons pouvoir augmenter l'intensité de molécule cible en amont du piège d'un facteur deux au minimum grâce à ces modifications.

4.2.2 Piégeage et mise en forme du paquet d'ions cibles

L'accumulation des ions dans le piège de Paul et la formation de paquets d'ions cibles denses représentent une étape clef pour la réalisation d'expériences de collisions sur le dispositif PIBALE car la densité des paquets d'ions au sein de la zone d'interaction en dépend. Il est donc indispensable de maximiser le nombre d'ions par paquets et d'en minimiser le volume. De plus, la mise en forme du faisceau projectile pour optimiser le recouvrement avec un paquet d'ions cibles requiert la connaissance des caractéristiques de ce paquet dans la zone d'interaction. On peut aussi noter qu'un petit volume d'interaction permet de garantir une meilleure résolution en masse et en KER dans le TOFMS.

Expérimentalement, plusieurs paramètres influencent les caractéristiques d'un paquet d'ions dans la zone d'interaction. Ils se divisent en trois parties : les caractéristiques du nuage d'ions dans le piège, les paramètres d'extraction et le transport du paquets d'ions du piège jusqu'à la zone d'interaction.

Ainsi, dans le piège, la densité maximale d'un paquet d'ions est limitée par la charge d'espace dont les principaux effets sont d'augmenter le volume et la température du nuage d'ions au fur et à mesure que celui-ci se remplit. Un second effet dont nous discuterons est l'augmentation du volume du nuage entre l'arrêt du potentiel RF de piégeage et l'application du champ d'extraction du piège.

Dans la zone d'interaction, il est important de noter que la dimension axiale du paquet est directement reliée à la distribution en énergie des ions. Cette distribution dépend principalement du volume du nuage dans le piège et de la valeur du champ d'extraction $\overrightarrow{E_{ext}}$. De plus, comme nous le verrons, des collisions dans le gaz tampon (hélium) au moment de l'extraction peuvent entraîner un élargissement de la distribution en énergie du paquet d'ions. Les dimensions radiales

du faisceau sont principalement fixées par l'optique de guidage des ions et de leur focalisation dans la zone d'interaction.

Le DSP_{biomol}, détaillé plus tôt en section 4.1.2, constitue le principal point de mesure expérimental pour caractériser les paquets d'ions cibles. Le logiciel SIMION, qui nous permet de simuler les trajectoires des ions dans cette partie du dispositif, est un outil nécessaire pour caractériser les dimensions du paquet d'ions dans le piège et au centre de la ZI, ainsi que pour déterminer certains optima de fonctionnement du dispositif.

4.2.2.1 Capacité maximum du piège

La charge d'espace constitue la principale source de limitation du nombre d'ions que peut contenir le piège. La répulsion coulombienne créée par l'accumulation de charges positives dans le piège mène à l'augmentation de la taille du nuage d'ions. Le temps de vie des ions évoluant alors sur des trajectoires loin du centre du piège entraînent une baisse de l'efficacité de piégeage.

Pour mettre en avant ce phénomène dans notre piège et estimer expérimentalement le nombre d'ions maximum pouvant être piégés, nous avons étudié l'évolution du nombre d'ions par paquets détectés sur le DSP_{biomol}, N_p, en fonction du nombre d'ions guidés à l'entrée du piège, N_{inj}. Les grilles escamotables de transmissions 10 % et 1 % ont été utilisées pour ne pas saturer le détecteur lors des mesures et permettre d'explorer une grande gamme de nombre d'ions par paquets.

Nous avons réalisé des mesures pour un faisceau d'adénosine protonée (m/q = 268) avec une intensité $I_{ESI} \sim$ 10-15 pA. Les ions sont extraits du piège avec $U_{bias} = 20$ V et $V_{ext} = 30$ V. Pour ces mesures, la durée du cycle est de 200 ms avec $\Delta t = 95$ ms pour le pompage de l'hélium résiduel.

N_{inj} est le produit de l'intensité mesurée en sortie du QMS, I_{ESI} (en ions/seconde) et de la durée d'injection des ions dans le piège Δ_{inj} :

$$N_{inj} = I_{ESI} \times \Delta_{inj} \tag{4.2.1}$$

Pour tenir compte des variations d'intensités délivrées par la source ESI, I_{ESI} est moyenné sur deux mesures effectuées avant et après chaque acquisition, respectivement I_1 et I_2. L'erreur sur N_{inj} liée à cette mesure est alors :

$$\sigma_{N_{inj}} = \sqrt{\frac{(I_1 - I_2)^2}{2}} \times \Delta_{inj} \tag{4.2.2}$$

Pour chaque mesure de comptage sur le DSP_{biomol}, la durée d'acquisition t_{acq} est de 300 s pour obtenir une statistique suffisante. Le nombre d'ions par paquet N_p est déterminé à partir du nombre d'ions N_{det} détectés pendant un temps t_{acq}, corrigé de l'efficacité de détection ε et de la transmission des grilles G_{tr}, et rapporté à la durée d'un cycle. Ainsi :

$$N_p = \frac{T_{cycle}}{t_{acq}} \times \frac{N_{det}}{\varepsilon . G_{tr}} \tag{4.2.3}$$

L'incertitude statistique sur la mesure de N_{det} entraine l'erreur sur N_p :

$$\Delta N_p = N_p \times \frac{\Delta N_{det}}{N_{det}} = N_p \times \frac{\sqrt{N_{det}}}{N_{det}} = \frac{N_p}{\sqrt{N_{det}}} \tag{4.2.4}$$

La figure 4.2.7 présente l'évolution de N_p en fonction N_{inj} pour une gamme de durée d'injection s'étendant de 0,5 à 80 ms. On observe clairement un effet de la charge d'espace lors de l'accumulation de charge dans le piège se traduisant par une diminution de l'efficacité de piégeage N_p/N_{inj}. Á titre de comparaison, la flèche pointillée bleue indique l'évolution de N_p suivant les premiers points de la courbe pour $N_p < N_p^{lin}$, où N_p^{lin} correspond au nombre d'ions limite tel que l'efficacité d'accumulation est constante. Cette efficacité est de 10 %. Avec la charge d'espace, le nombre d'ions que peut contenir le piège s'écarte de cette droite et sature vers une valeur N_p^{max}. Les ions injectés dans le piège compensent la perte des ions les plus chauds et un équilibre dynamique se crée. L'efficacité ainsi mesurée tend vers 0 % lorsque le piège est rempli à son maximum.

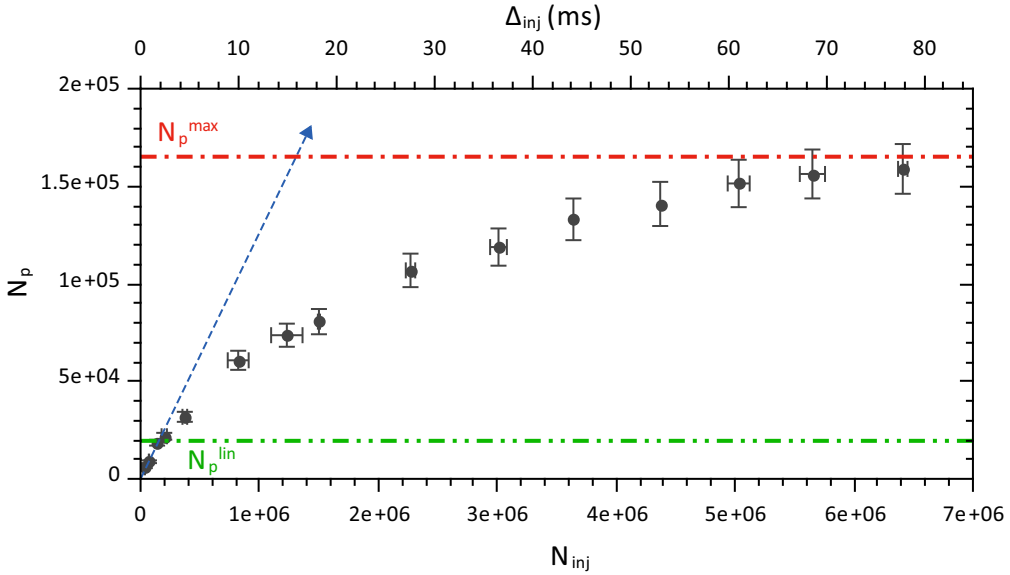


Figure 4.2.7 : *Nombre d'ions par paquet N_p mesuré sur le DSP_{biomol} en fonction du nombre d'ions injectés à l'entrée du piège, N_{inj}, pour un faisceau d'adénosine protonée d'intensité $I_{ESI} \sim$ 10-15 pA. La flèche pointillée représente l'évolution de N_p avec une efficacité constante de 10 % considérant la charge d'espace négligeable.*

Cette baisse de l'efficacité s'accompagne par une augmentation de la taille du nuage (déconfinement des ions) causé par la charge d'espace, ce qui peut se traduire par une diminution du temps de vie des ions. De plus, comme nous allons le voir, cette augmentation des dimensions du nuage affecte significativement l'efficacité de transport des ions depuis le piège jusqu'au détecteur. Il ne nous est cependant pas possible de découpler ces deux causes pour déterminer le nombre d'ions dans le piège avant extraction.

Finalement, de ces résultats nous pouvons déduire que les effets de la charge d'espace entraînent la diminution de l'efficacité globale de piégeage et de transmission à partir de la valeur de N_p^{lin}, soit environ 20000 ions dans un paquet. Ainsi, le nombre d'ions maximum, N_p^{max}, que peut contenir un paquet dans la zone d'interaction est estimé de l'ordre de 150000 ions.

Il est aussi important de noter ici que pour une intensité initiale de $\sim$ 10-15 pA, une centaine de millisecondes est nécessaire pour remplir le piège à saturation. Ceci nous impose donc une partie de la durée du cycle de fonctionnement de PIBALE, T_{cycle}. Ainsi, en fonction de l'intensité I_{ESI} disponible, 50 à 100 ms doivent être allouées à l'accumulation des ions dans le piège.

4.2.2.2 Élargissement du nuage d'ions par la charge d'espace

Comme évoqué précédemment, lors de l'accumulation des ions dans le piège, la charge d'espace provoque une augmentation de la taille et de la température du nuage, se répercutant notamment sur les dimensions et la distribution en énergie du paquet extrait du piège. Cet effet peut donc être mesuré à partir des caractéristiques d'un paquet d'ions sur le DSP_{biomol}.

Augmentation de la dispersion en énergie

Comme évoqué précédemment dans la section 3.2.4.2, lorsque les vitesses initiales des ions dans le piège sont négligeables, la distribution en énergie d'un paquet d'ions extrait est directement reliée à la taille du nuage dans le piège et à la valeur du champ d'extraction $\overrightarrow{E_{ext}}$ selon l'équation 3.2.36. Ainsi, il est possible d'estimer la taille du nuage dans le piège à partir de la distribution en énergie des paquets d'ions dans la ZI. On a donc :

$$\Delta y = \frac{\Delta E_p}{q\|\overrightarrow{E_{ext}}\|} \tag{4.2.5}$$

Les mesures ont été réalisées pour un faisceau de molécules de kanamycine protonée (m/q = 485) avec les paramètres d'extraction du piège : U_{bias} = 17 V et V_{ext} = 20 V. La durée du cycle T_{cycle} a été fixée à 300 ms pour allonger le temps de pompage à Δt = 200 ms afin de limiter au maximum l'effet des collisions sur l'hélium résiduel à l'extraction. Le champ électrique d'extraction au centre du piège sur l'axe y, $\|\overrightarrow{E_{ext}}\|$, est de 2,21 V/mm (déterminer par SIMION).

Les mesures de dispersions en énergie ont été réalisées avec le détecteur diagnostic selon la méthode présentée dans la section 4.1.3. Nous considérerons ici deux cas différents pour mettre en avant l'effet de la charge d'espace :

— Injection courte des ions dans le piège : $N_p = 2800 < N_p^{lin}$

— Injection longue des ions dans le piège : $N_p = 35200 > N_p^{lin}$

Les résultats des mesures de distributions en énergie sont présentés en figure 4.2.8 et résumés dans le tableau 4.2.1 où ΔE_c correspond à la largeur à mi-hauteur de la distribution déterminée par un ajustement gaussien. Malgré le nombre d'ions peu élevé dans le cas de

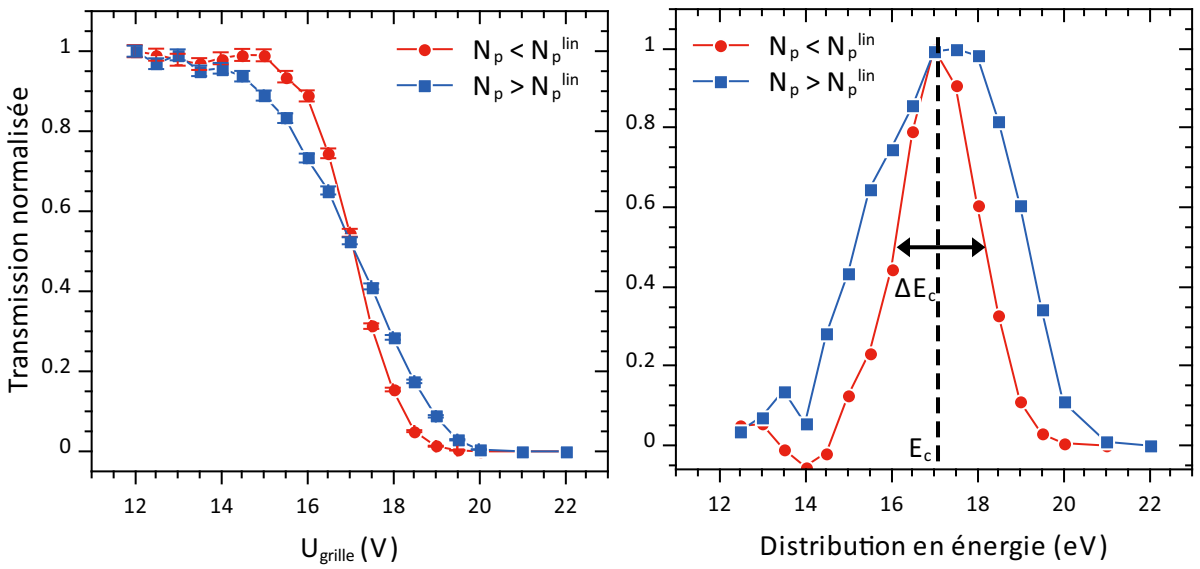


Figure 4.2.8 : *Mesures de dispersions en énergie réalisées pour des paquets d'ions de kanamycine protonée avec U_{bias} = 17 V et V_{ext} = 20 V ($\|E_{ext}\|$ = 2,21 V/mm). A droite, les courbes de transmissions (fonction de répartition) des ions en fonction la tension U_{grille} sont normalisées au comptage lorsque U_{grille} = 0 V. A gauche, les distributions en énergie sont dérivées des courbes de transmission, inversées et normalisées.*

l'injection longue, nous observons déjà un effet de l'accumulation des ions dans le piège, et donc de la charge d'espace, qui se traduit par une augmentation de la largeur de la distribution en énergie du paquet d'ions. Celle-ci est ici doublée lorsque le nombre d'ions dans le piège augmente d'un facteur dix. À partir de ce résultat nous pouvons supposer que la dimension axiale du nuage d'ions évolue de la même façon. Enfin on peut noter que cette dispersion en énergie est bien supérieure à la distribution en énergie due à la température du nuage, ce qui nous permet de confirmer que la distribution en énergie d'un paquet d'ions dans la ZI est bien dominée par la taille du nuage au moment de l'extraction.

Avec cette dernière considération nous pouvons donc déterminer, d'après l'équation 4.2.5, la largeur à mi hauteur du nuage Δy en fonction de la largeur de la distribution en énergie. Les résultats, résumés dans le tableau 4.2.1, nous montrent que la largeur axiale du nuage passe de $\sim$1 à $\sim$2 mm sous l'effet de la charge d'espace. Pour vérifier la cohérence de ces mesures, nous pouvons les comparer aux calculs des dimensions du nuage donnés par l'équation 3.2.33, dans le cas où les effets de la charge d'espace sont négligeables. En considérant les paramètres expérimentaux de piégeage suivant : $\Omega = 2\ \pi\times$ 1 MHz, V_0 = 500 V et T = 300 K, pour la kanamycine de rapport m/q = 485, on obtient les valeurs des puits de potentiel axial V_y = 6,31 V et radial $V_r = V_y/2$ = 3,16 V. On trouve ainsi Δy = 0,74 mm ce qui est cohérent avec la mesure pour le nuage sans charge d'espace

On peut alors estimer une densité moyenne ϱ du nuage d'ions dans le piège, en la considérant homogène dans un volume défini par les projections dans les trois dimensions des largeurs des

Mesures		
N_p	2800 ± 420	35200 ± 5300
$\langle E_c \rangle$ (eV)	17,11 ± 0,02	17,21 ± 0,05
ΔE_c (eV)	2,15 ± 0,08	4,35 ± 0,36
Calculs		
Δy (mm)	0,97 ± 0,04	1,97 ± 0,16
Vol (mm^3)	1,18 ± 0,06	9,87 ± 0,48
ϱ_{moyen} (ions/cm^3)	(4,7 ± 0,2).10^5	(7,1 ± 0,6).10^5

Table 4.2.1 : *Résultats des mesures de dispersions en énergie réalisées pour des paquets d'ions de kanamycine protonée avec U_{bias} = 17 V et V_{ext} = 20 V ($\|E_{ext}\|$ = 2,21 V/mm). $\langle E_c \rangle$, ΔE_c et leurs incertitudes sont déterminés par un ajustement gaussien de la distribution en énergie. Pour le calcul, ΔE_c est déterminé à partir de l'équation 4.2.5 et de la valeur de Δy. Les incertitudes sont données à 1 σ.*

distributions gaussiennes σ_y et $\sigma_x = \sigma_z = 2\sigma_y$. Comme 74 % d'une distribution gaussienne est contenu dans 2σ, on peut considérer que 20 % des ions sont contenus dans un nuage en forme d'ellipsoïde de rayon σ_x, σ_y et σ_z. Ce volume vaut :

$$Vol = \frac{4}{3}\pi\sigma_x \times \sigma_y \times \sigma_z = \frac{16}{3}\pi\sigma_y^3 \tag{4.2.6}$$

Ainsi dans le cas présent, la densité d'ions passe de 4,7.10^5 à 7,1.10^5 ions/cm^3, soit une augmentation de $\sim$ 70 %, lorsque le nombre d'ions dans le piège est décuplé. On peut noter que ce calcul approximatif de densité donne un ordre de grandeur comparable avec la valeur de 10^6 ions/cm^3 donné dans la littérature [127]. Il est important de garder en mémoire que la densité du nuage d'ions dans le piège calculée ici est très supérieure à la densité dans la zone d'interaction à cause de l'élargissement spatial du paquet et de la perte d'ions pendant le transport jusqu'à la ZI.

Augmentation de la dispersion en temps de vol

La dispersion en énergie d'un paquet se traduisant par une distribution en temps de vol des ions, il est aussi possible d'observer l'effet de la charge d'espace avec des mesures de temps de vol sur le détecteur diagnostic DSP_{biomol}.

À partir des expériences présentées dans la section 4.2.2.1 précédente sur la capacité maximale du piège, nous avons relevé l'évolution de la largeur à mi-hauteur (Δ_{tof}) des pics de temps de vol mesurés sur le DSP_{biomol}. Ces résultats sont présentés sur la figure 4.2.9 en fonction du nombre d'ions par paquet N_p. Le temps de vol moyen d'arrivée des ions sur le détecteur est de $\sim$ 215 μs. L'erreur sur Δ_{tof} correspond à l'erreur lors de l'ajustement des pics de temps de vol par une gaussienne (Fityk [149]).

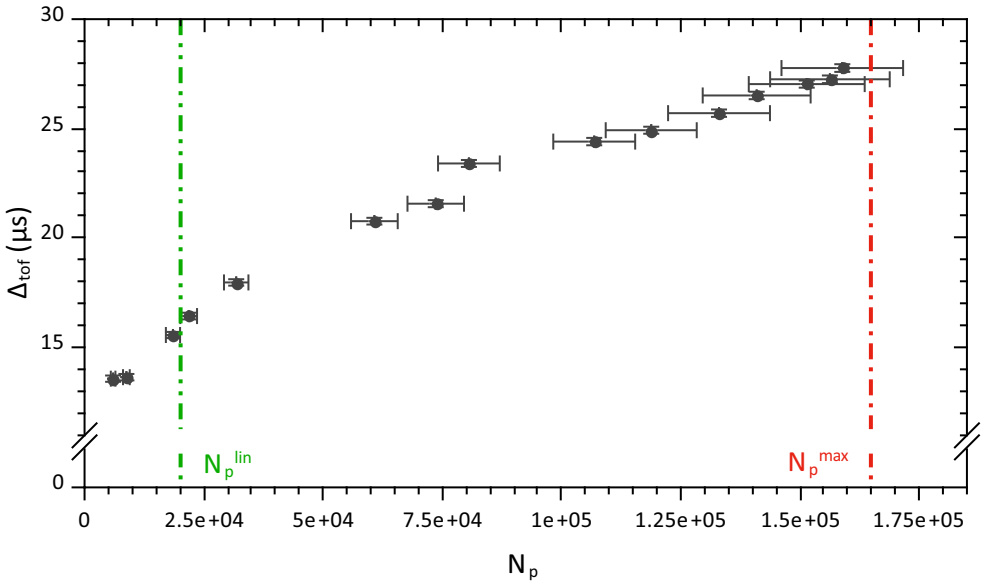


Figure 4.2.9 : *Largeur à mi hauteur Δ_{tof} des spectres en temps de vol en fonction du nombre d'ions par paquet N_p détectés sur le DSP_{biomol}, pour un faisceau d'adénosine protonée d'intensité $I_{ESI} \sim$ 10-15 pA. L'erreur sur la mesure de Δ_{tof} est comprise dans l'épaisseur des points.*

Ici encore il apparaît clairement un effet de la charge d'espace sur les caractéristiques du nuage d'ions. En effet la largeur à mi-hauteur des pics de temps de vol s'accroît avec l'accumulation des ions dans le piège avec une tendance quasi-linéaire. La largeur en temps de vol augmente jusqu'à un facteur 2 sur la gamme étudiée. Il est intéressant de noter que la taille du nuage augmente même pour $N_p < N_p^{lin}$, gamme dans laquelle la charge d'espace n'a pas d'effet sur l'efficacité de remplissage du piège. On peut ajouter que cet élargissement en temps de vol est synonyme d'une élongation de la taille du paquet dans la direction de propagation des ions y et limite la densité du paquet d'ions dans la ZI.

4.2.2.3 Déconfinement du nuage d'ions avant l'extraction

La seconde source de l'augmentation des dimensions du nuage d'ions avant l'extraction du piège provient du fonctionnement de l'alimentation RF du piège qui requiert une certaine durée pour faire chuter le potentiel RF avant l'application du champ d'extraction. Pendant ce court délai le confinement des ions n'est plus assuré par le champ quadripolaire et la taille du nuage augmente. Cependant bien que cet effet existe nous allons montrer que la taille du nuage est surtout dominée par les effets de la charge d'espace.

L'alimentation RF implique le fonctionnement suivant, illustré par la figure 4.2.10 :

1. réception du signal logique de commande d'extraction à t_0,
2. arrêt tension RF à partir de la prochaine phase négative : t_1. On peut alors approximer l'évolution du potentiel RF par : $V_0(t) = \cos(\Omega t+\pi).\exp(-t/\tau)$, où $\tau \sim 0{,}7$ μs a été déterminé expérimentalement,

3. application du champ d'extraction après un délai Δt_{ext}, réglable de 0,5 μs à 4 μs, après t_1.

En pratique, le délai Δt_{ext} est fixé à la valeur minimale permise par l'alimentation RF, soit 0,5 μs (cas différent de la figure 4.2.10). On peut ajouter que la durée de l'application du champ d'extraction est réglable de 2 à 5 μs et doit être grand devant le temps nécessaire aux ions pour sortir du piège.

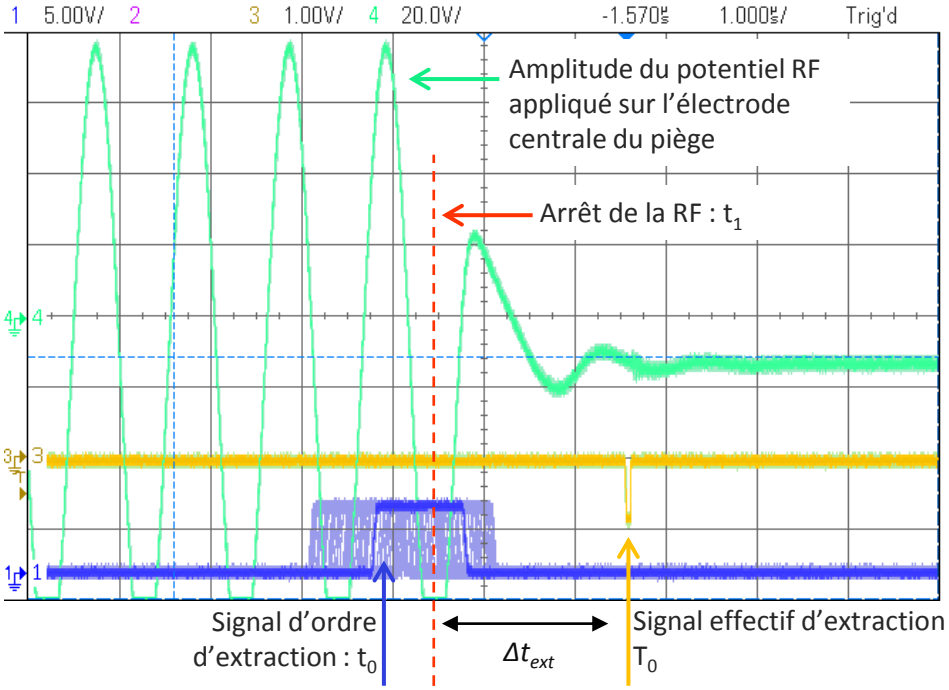


Figure 4.2.10 : *Vue à l'oscilloscope de trois signaux différents : en vert, amplitude du potentiel RF généré par l'alimentation en haute tension du piège ; en bleu, signal de commande de l'extraction des ions du piège ; en jaune, début de l'application de champ d'extraction du piège. Ce signal, noté T_0, sert de référence pour toute la séquence en temps du dispositif PIBALE. L'arrêt du potentiel RF débute sur une phase d'amplitude négative. Δt_{ext} est le délai entre le début de l'arrêt de la RF et T_0. Sur cette vue, Δt_{ext} est réglé à 3,5 μs et ne correspond pas à notre mode normal de fonctionnement.*

Pour observer l'effet de ce déconfinement sur les dimensions du nuage d'ions il serait possible de mesurer l'évolution de la distribution en énergie ou temps de vol des paquets d'ions en fonction du délai Δt_{ext}. Cependant nous allons présenter ici des résultats de simulations SIMION nous permettant d'observer plus en détail ce phénomène.

La figure 4.2.11 présente les résultats de ces simulations. De manière à ce que les caractéristiques du nuage d'ions soient réalistes au moment de l'arrêt de la RF, nous choisissons arbitrairement les conditions initiales puis laissons évoluer les ions dans une phase de thermalisation et de piégeage.

Des ions de rapport m/q = 485 (équivalent de la kanamycine protonée) sont créés au centre du piège avec des distributions arbitraires en position (σ_u = 0,8 mm, avec u = x, y ou z)

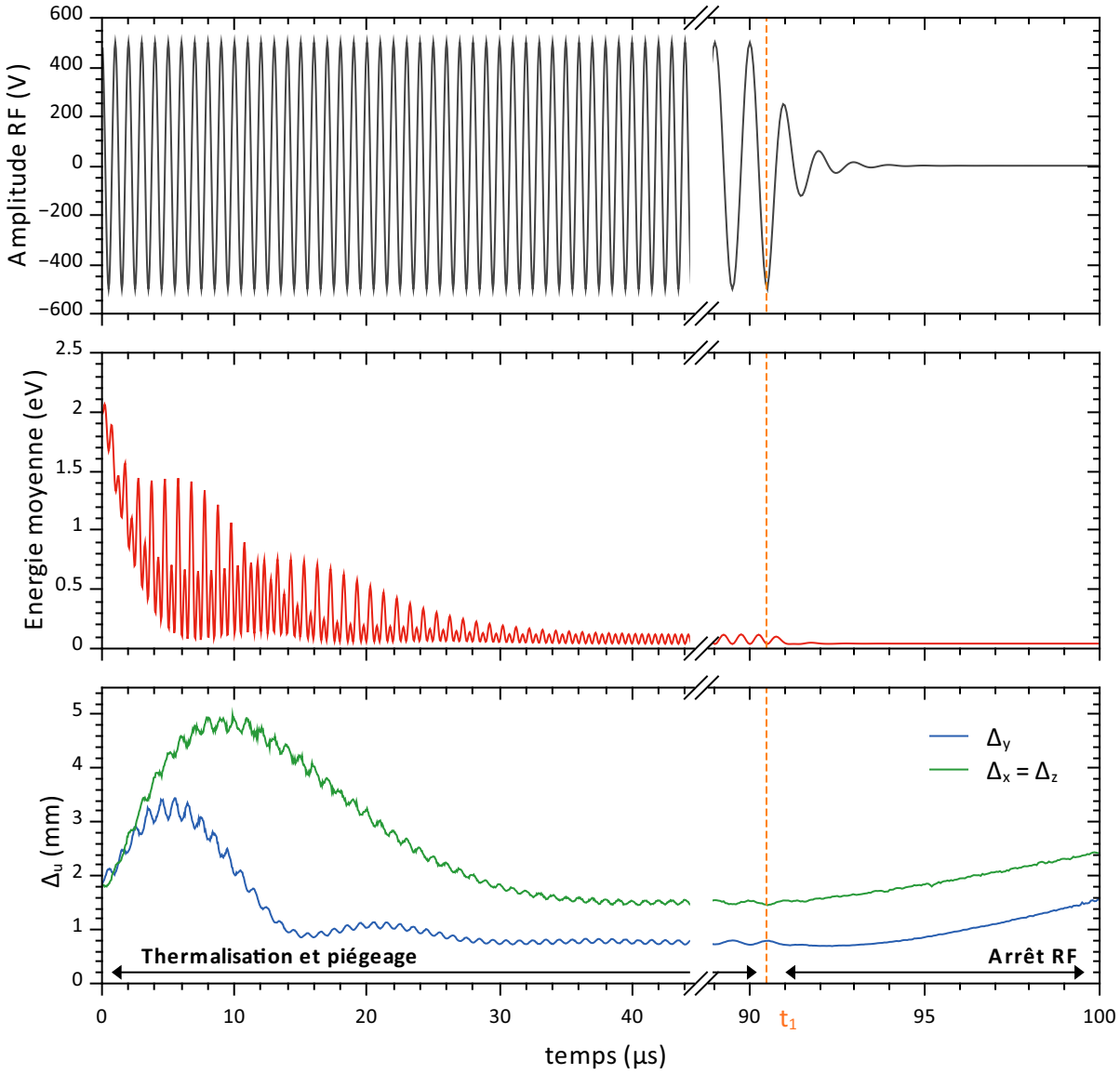


Figure 4.2.11 : *Résultats de simulations SIMION réalisées avec les paramètres initiaux suivants : ions de rapport $m/q = 485$, de distributions gaussiennes en positions $x,y,z = 0 \pm 0{,}8$ mm, où (0,0,0) correspond au centre du piège, et en énergie $E_c = 2 \pm 0{,}42$ eV (1 eV à mi-hauteur). L'anneau central du piège est polarisé à un potentiel RF d'amplitude $V_0 = 500$ V et de fréquence 1 MHz. Le piège est initialement rempli d'un gaz d'hélium à une pression de 0,1 mbar pour permettre la thermalisation des ions à 300 K. Le gaz tampon est supprimé après 70 μs pour ne pas altérer le mouvement des ions dans le piège. À t_1, le potentiel RF commence à décroître avec une constante de temps $\tau = 0{,}7$ μs. La figure du haut présente l'évolution du potentiel RF en fonction du temps. La figure du milieu et celle du bas représentent, respectivement, l'évolution de l'énergie moyenne et des largeurs à mi-hauteur des distributions en position radiales (Δ_x, Δ_z) et axiales (Δ_y) des ions.*

et une énergie moyenne de 2 eV. Pour thermaliser les ions à 300 K le piège est rempli d'un gaz d'hélium à une pression de 0,1 mbar pendant 70 μs. Le potentiel RF d'amplitude $V_0 = 500$ V et

de fréquence 1 MHz appliqué sur l'anneau central du piège commence arbitrairement par une phase positive. À $t_1 = 90{,}5$ μs, l'amplitude RF se trouve à une phase négative et commence à diminuer avec la constante de temps $\tau = 0{,}7$ μs.

Les trajectoires indépendantes de 5000 ions (pas d'effet de la charge d'espace) sont enregistrées par pas de 0,05 μs. À chaque pas, les distributions en énergie, position et vitesse sont déterminées à partir des caractéristiques des 5000 ions. Les valeurs moyennes et largeurs à mi -hauteur Δ sont données par ajustement gaussien des différentes distributions.

Les résultats de ces simulations nous montrent que 30 à 40 μs sont nécessaires pour thermaliser les ions à une énergie moyenne de $\sim$ 0,1 eV, ce qui est cohérent avec les estimations présentées dans la section 3.2.4.2. Dans la même période les largeurs axiales (Δ_y) et radiales (Δ_x et Δ_z) du nuage se stabilisent respectivement à $\sim$ 0,77 mm et $\sim$ 1,55 mm, respectant le rapport $\Delta_r = 2\Delta_y$ pour ce type de piège. De plus la valeur de Δ_y est en accord avec les mesures et le calcul de la taille du nuage dans le piège en l'absence de charge d'espace présentés dans la section 4.2.2.2 précédente. Une fois le potentiel RF à zéro, les ions évoluent en l'absence de champ électrique jusqu'à l'application du champ d'extraction. Naturellement, l'énergie des ions reste constante après l'arrêt de la RF. En revanche, on observe une augmentation des dimensions du nuage de $\sim$ 0,12 mm/μs dans les deux directions pendant cette période.

Cela signifie que lorsque le champ d'extraction est appliqué 0,5 μs après l'arrêt de la RF, la dimension axiale du nuage, et donc la distribution en énergie du paquet, augmente de $\sim$ 10%. Si cet effet ne semble pas affecter grandement les caractéristiques du nuage d'ions dans le cas où la charge d'espace est négligeable, il est certain que cet effet est amplifié dans le cas contraire où la charge d'espace induit une augmentation de la température des ions dans le nuage. Des mesures expérimentales permettraient de mettre cet effet en avant. Cependant, même s'il apparait clair que Δt_{ext} doit être le plus court possible, nous sommes en pratique contraints par le fonctionnement de l'alimentation RF du piège.

4.2.2.4 Effet des collisions avec le gaz tampon lors de l'extraction

Comme expliqué précédemment, l'utilisation d'un gaz tampon est indispensable pour le fonctionnement de notre piège. Cependant lors de l'extraction, les collisions avec le gaz tampon résiduel conduisent à un élargissement de la distribution en énergie du nuage entraînant une augmentation de la taille du paquet d'ions dans la ZI. Il est donc nécessaire de fonctionner avec une injection d'hélium pulsée pour laisser un temps de pompage avant l'extraction. Ainsi l'extraction des ions est retardée par rapport à la fin de l'injection du gaz tampon d'une durée Δt. Ce délai dépend de la capacité de pompage dans la chambre du piège et du volume de gaz à pomper (volume de gaz contenu dans le piège et dans le conduit d'injection). En particulier, le conduit de notre système d'injection est de 150 mm de long sur une section de 1,5 mm de diamètre, soit un volume de 265 mm^3. La photographie de la figure 4.2.12 montre la partie de ce conduit dans la chambre du piège. Nous allons voir ici par des expériences et des simulations comment ces collisions affectent les caractéristiques du paquet d'ions dans la zone d'interaction

et justifient l'utilisation d'un délai Δt d'au moins 90 ms.

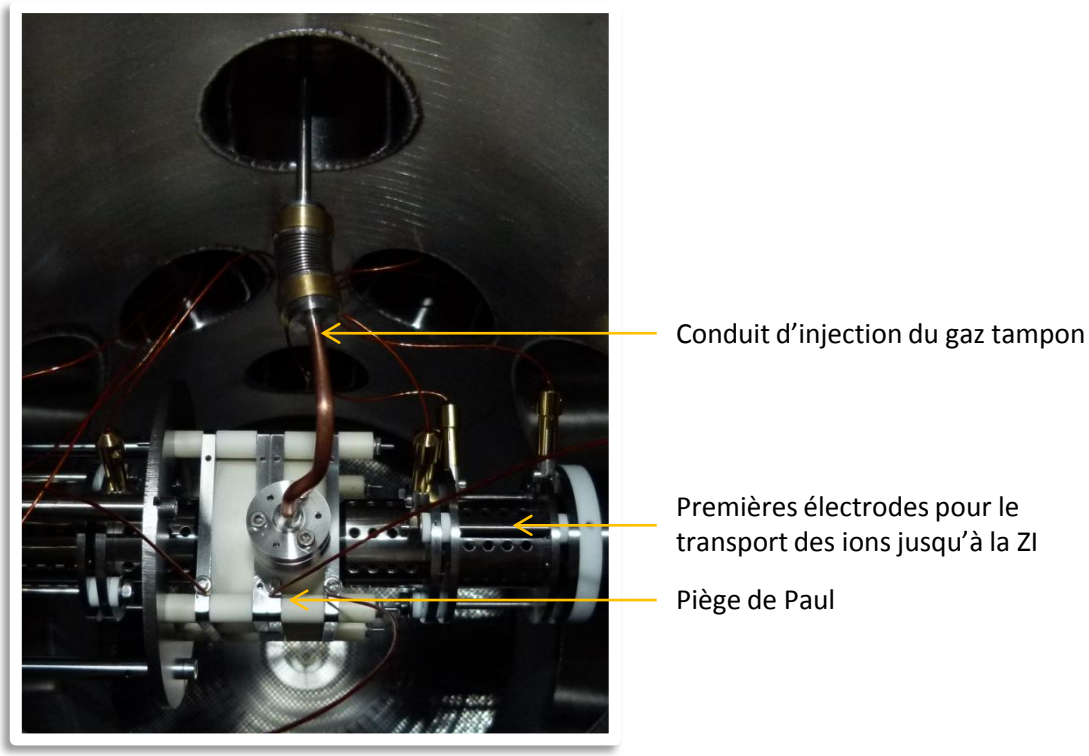


Figure 4.2.12 : *Photographie de l'intérieur de la chambre du piège vue du dessus.*

L'évolution de la forme des spectres en temps de vol des paquets d'ions sur le DSP_{biomol} en fonction du retard Δt est un bon moyen d'évaluer la vitesse de pompage du gaz tampon. Plus ce retard est court plus la pression est grande dans le piège au moment de l'extraction. L'augmentation du nombre de collisions avec la pression entraîne l'augmentation de la dispersion en temps de vol via celle de l'énergie cinétique des ions. La figure 4.2.13 présente ces résultats pour des paquets d'adénine protonée ($m/q = 136$), avec $U_{bias} = 17$ V et $V_{ext} = 30$ V.

Sur ces spectres, l'effet des collisions sur le gaz apparaît clairement. Ces collisions entraînent notamment une augmentation du temps de vol moyen et de la largeur des pics, due à la perte d'énergie des ions, ainsi qu'une diminution de l'efficacité d'extraction et de transport, traduite par l'aire des pics. Ces résultats sont résumés dans le tableau 4.2.2. L'efficacité de transmission est normalisée par rapport à l'intégrale du spectre réalisé pour $\Delta t = 90$ ms.

Les simulations SIMION de la ligne de faisceau du piège jusqu'au détecteur apparaissent comme un bon outil pour observer plus en détail l'effet de ces collisions. Les simulations sont réalisées en appliquant sur chaque électrode le même potentiel que celui utilisé expérimentalement. L'amplitude du potentiel RF appliqué sur l'anneau central est de $V_0 = 350$ V, commence à décroître à une phase négative (voir section précédente) suivie de l'application du champ d'extraction avec un délai de 0,5 μs. Des ions de rapport $m/q = 136$ sont créés au centre du piège et thermalisés dans du gaz à pression de 1 mbar pour créer des conditions initiales

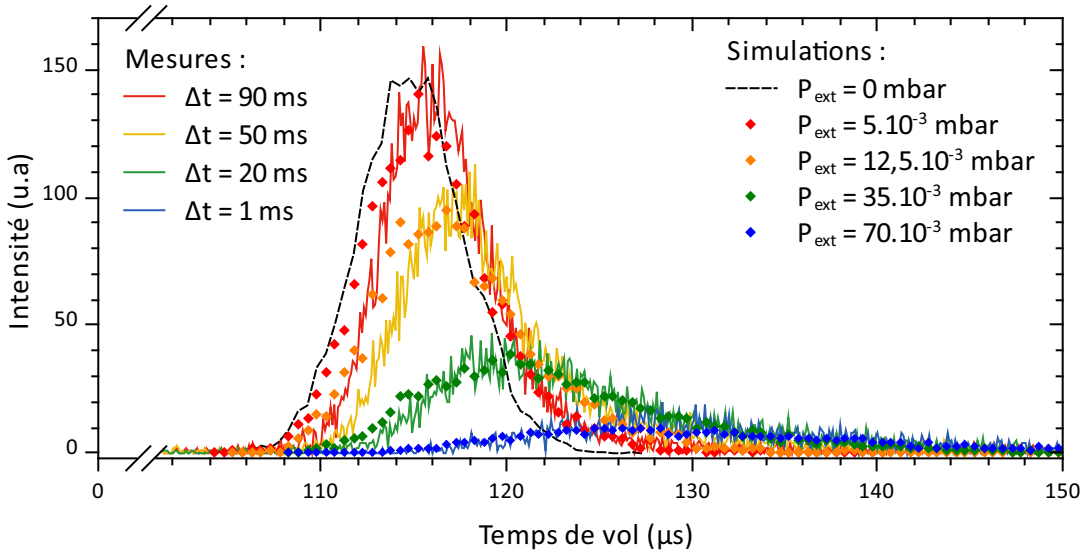


Figure 4.2.13 : *Spectre de temps de vol sur le DSP_{biomol} de paquets d'adénine protonée (m/q = 136), avec U_{bias} = 17 V et V_{ext} = 30 V. Les lignes pleines représentent les données expérimentales pour différentes valeurs du retard Δt entre la fin de l'injection d'hélium dans le piège et l'application du champ d'extraction. Les spectres sont normalisés sur le temps d'acquisition. Les points de couleurs correspondent aux données issues des simulations SIMION où P_{ext} est la pression dans le piège au moment de l'extraction et est ajustée pour coïncider avec les données expérimentales. La ligne pointillée noire représente le résultat de la simulation dans le cas où P_{ext} est nul.*

Mesures				Simulations					
Δt (ms)	$\langle$ tof $\rangle$ (μs)	Δ_{tof} (μs)	eff_{tr} (%)	P_{ext} (mbar)	$\langle$ tof $\rangle$ (μs)	Δ_{tof} (μs)	$\langle E_c \rangle$ (eV)	ΔE_c (eV)	eff_{tr} (%)
90	116,0	6,5	100	5.10^{-3}	115,4	7,4	16,2	3,0	99
50	117,4	7,9	84	$12,5.10^{-3}$	116,5	8,4	15,7	3,5	97
20	120,3	12,6	50	35.10^{-3}	120,4	12,3	14,1	4,7	93
1	128,0	18,2	21	70.10^{-3}	128,6	20,6	11,7	6,0	88

Table 4.2.2 : *Résultats issus des spectres de temps vol présentés en figure 4.2.13. P_{ext}, $\langle E_c \rangle$ et ΔE_c sont déterminés à partir des simulations SIMION.*

réalistes avant l'extraction.

En ajustant uniquement la pression dans le piège au moment de l'extraction, P_{ext}, il est alors possible de reproduire correctement les spectres expérimentaux, comme le montre la figure 4.2.13. De cette manière il est possible d'estimer la pression dans le piège en fonction du temps du délai d'extraction Δt.

Les distributions en énergie des ions pour les différentes valeurs de P_{ext} sont déterminées pour chaque simulation et reportées dans le tableau 4.2.2. On observe bien la diminution de l'énergie moyenne $\langle E_c \rangle$ des ions ainsi que l'augmentation de la dispersion en énergie ΔE_c avec

l'augmentation de la pression dans le piège. On remarque que lorsque Δt est réduit de 90 à 1 ms l'augmentation de la dispersion en énergie d'un facteur 2 entraîne ici une augmentation de la dispersion en temps de vol d'un facteur 3.

Cependant, comme présenté dans le tableau 4.2.2, l'efficacité de transmission expérimentale n'est pas du tout reproduite avec SIMION. On notera que les spectres SIMION sont normalisés aux intégrales des spectres expérimentaux sur la figure 4.2.13. En effet dans le cas des simulations, la transmission des ions du piège jusqu'au détecteur diminue de 10 % lorsque P_{ext} passe de 0 mbar à 70.10^{-3} mbar, tandis qu'une baisse de 80 % est observée expérimentalement. Dans les simulations SIMION, la diminution de la transmission est uniquement due à la perte des ions au passage de certains diaphragmes, ce qui est illustré par la figure 4.2.14. Ceci résulte de la déviation des trajectoires des ions induite par les collisions dans l'hélium, provoquant un élargissement de la section du faisceau.

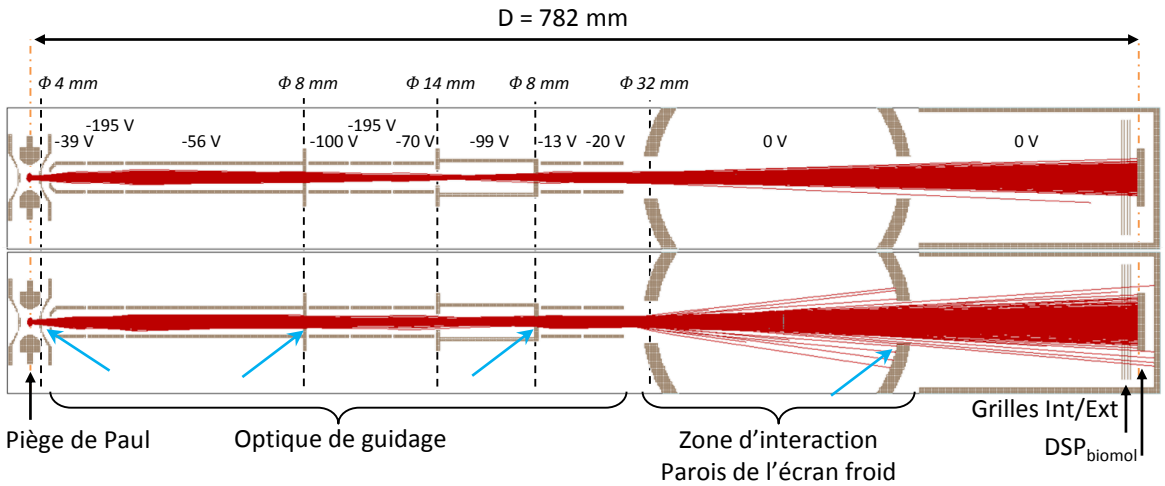


Figure 4.2.14 : *Trajectoires d'ions issus des simulations SIMION pour, en haut : P_{ext} = 0 mbar et en bas : P_{ext} = 70.10^{-3} mbar. Les tensions appliquées sur les différentes électrodes sont notées sur la figure et correspondent à celles utilisées expérimentalement. L'ensemble du piège est polarisé à une tension U_{bias} = 17 V et un potentiel RF de 350 V d'amplitude est appliqué sur l'anneau RF du piège. La tension V_{ext} = ± 30 V est ajoutée, respectivement, aux électrodes chapeaux d'entrée et de sortie du piège pour extraire les ions du piège. Les différents diaphragmes sont indiqués par les lignes pointillées noires. Les flèches bleues indiquent les zones où les ions sont perdus.*

Un autre phénomène qui pourrait être à l'origine de la diminution observée expérimentalement est la fragmentation des ions dans des processus de dissociations induites par collisions (CID). Cet effet ne peut être pris en compte dans ces simulations. Deux cas pourraient se produire. Dans un premier cas où la fragmentation des ions interviendrait dans le piège au moment de l'extraction, les fragments cationiques auraient une énergie proche de U_{bias} et pourraient atteindre le détecteur. Dans le second cas où la fragmentation aurait lieu en sortie du piège, dans une région où le potentiel électrique est négatif, les fragments auraient alors une énergie potentielle initiale négative et ne pourraient pénétrer dans la zone d'interaction où le potentiel

est nul. Le fait que nous n'observions pas de fragments sur le détecteur est cohérent avec le second cas et pourrait être expliqué par le fait que, dans la région des premières électrodes après le piège, la densité de gaz résiduel est plus faible entraînant un libre parcours moyen et donc une vitesse plus grande entre deux chocs, pouvant plus facilement provoquer la fragmentation des molécules.

À partir des différents temps Δt et des valeurs de pressions P_{ext} déterminées grâce aux simulations, il est possible d'estimer la cinétique de pompage du gaz tampon du piège. La figure 4.2.15 présente l'évolution P_{ext} en fonction de Δt. Le modèle de sphère dure et la section efficace de collision utilisés pour ces simulations peuvent causer un biais sur les valeurs de P_{ext}, cependant la tendance de cette courbe nous donne un ordre de grandeur cohérent pouvant nous servir de référence. La constante de décroissance $\tau_{pompage}$ ainsi déterminée est de $\sim$ 30 ms. Ainsi, un délai de 3 $\times\tau$ = 90 ms est nécessaire pour diminuer d'un facteur vingt la pression dans le piège. En pratique, un retard plus grand n'améliore pas sensiblement la dispersion en temps de vol.

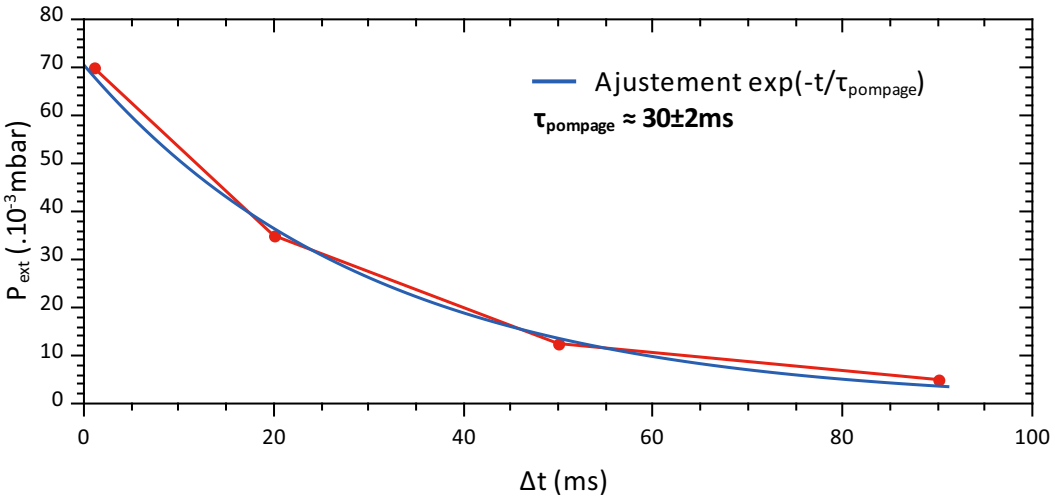


Figure 4.2.15 : *Évolution de P_{ext} avec Δt, déterminé à l'aide des simulations SIMION. L'ajustement par une exponentielle décroissance A.exp(-t/τ) réalisé avec Fityk donne les valeurs des paramètres A et τ et leur écart type : A = (70,5 $\pm$ 4,3).10^{-3}mbar, τ = 30,4 $\pm$ 2,3 ms.*

Enfin, on peut noter que le spectre acquis lorsque Δt = 90 ms se rapproche de la simulation dans le cas idéal où P_{ext} = 0 mbar suggérant que ce délai de pompage est suffisant dans notre cas (voir figure 4.2.13). Ces résultats conditionnent donc la durée du cycle de fonctionnement de PIBALE en imposant un temps de pompage de 90 à 100 ms. En considérant les résultats de la section 4.2.2.1, nous devons donc travailler avec une injection d'hélium pulsée et un cycle d'une durée minimum de 200 ms. Ainsi 100 ms sont nécessaires pour remplir le piège à son maximum puis 100 ms supplémentaires de retard Δt permettent de pomper le gaz tampon avant l'application du champ d'extraction. Un moyen de diminuer ce temps de pompage serait de modifier la ligne d'injection de gaz tampon en rapprochant au maximum la vanne pulsée

du piège, réduisant ainsi le volume supplémentaire à pomper. La mise en place d'un telle modification sera abordée en section 4.4.

4.2.2.5 Caractéristiques d'un paquet d'ions dans la zone d'interaction

Comme il a été montré avec les différentes études présentées précédemment, le DSP_{biomol} nous permet de caractériser les paquets d'ions au niveau de ce détecteur, plusieurs dizaines de centimètres après la zone d'interaction. Il est cependant très important de connaitre les caractéristiques des paquets d'ions au centre de la zone d'interaction pour au moins deux raisons :

— pouvoir adapter la forme du faisceau projectile à celle du paquet d'ions avec le triplet de quadripoles.

— pouvoir synchroniser en temps le faisceau projectile avec un paquet d'ions au centre de la ZI.

Compte tenu de la fidélité des résultats obtenus par les simulations SIMION par rapport aux expériences présentées précédemment en section 4.2.2.4, nous pouvons considérer que ces simulations sont un bon outil pour obtenir les caractéristiques du paquet d'ions au centre de la zone d'interaction, et a *fortiori* en tout point de la ligne transport. Ces simulations nous permettent notamment d'estimer la densité du paquet d'ions dans la zone d'interaction.

Pour considérer un paquet d'ions dans les conditions d'expériences de faisceaux croisés, nous devons prendre en compte l'effet de la charge d'espace sur les dimensions du nuage dans le piège. Nous avons choisi ici d'utiliser comme conditions initiales des simulations les dimensions du nuage de kanamycine mesurées expérimentalement ($\Delta y = 1{,}97 \pm 0{,}16$ mm) dans le cas ou $N_p > N_p^{lin}$ comme présenté dans la section 4.2.2.2. Ces paramètres ne prennent pas en compte la corrélation position/vitesse des ions dans le piège, cependant nous pouvons faire cette approximation car, comme nous l'avons vu précédemment, la dispersion en énergie des ions est majoritairement due à la taille du nuage et au champ d'extraction. Ces simulations sont validées par des comparaisons expériences/simulations des mesures de temps de vol. Lorsque le paquet d'ions atteint le centre de la zone d'interaction, à $t = 116$ μs après l'extraction du piège, on enregistre les positions (x, y, z), les vitesses (v_x,v_y,v_z) et l'énergie cinétique E_c de chaque ion.

La figure 4.2.16 présente les dispersions en position et en vitesse des ions dans leur direction de propagation y et dans le plan transverse (xOz). Les résultats sont résumés dans le tableau 4.2.3. On note que la symétrie cylindrique de la ligne de transport induit des dispersions en position et en vitesse identiques selon les coordonnées x et z. Sur cette figure est aussi représentée la corrélation temps de vol/énergie des ions du paquet. Il apparaît clairement que la dispersion en énergie se traduit par une dispersion en temps de vol. Ceci représente un bon exemple de l'importance d'avoir une dispersion en énergie cinétique faible pour minimiser la taille du paquet. Ceci implique donc un champ d'extraction du piège $\overrightarrow{E_{ext}}$ faible et une pression résiduelle $< 5.10^{-3}$ mbar dans le piège au moment de l'extraction. La corrélation entre l'éner-

gie et le temps de vol, et donc la position des ions, est en revanche intéressante car on peut dès lors imaginer qu'il soit possible de réduire cette dispersion en énergie en appliquant à un instant donné un champ électrique de compensation $\propto \Delta E_c/\Delta y$ pour regrouper les ions. Cette technique sera présentée dans la section suivante.

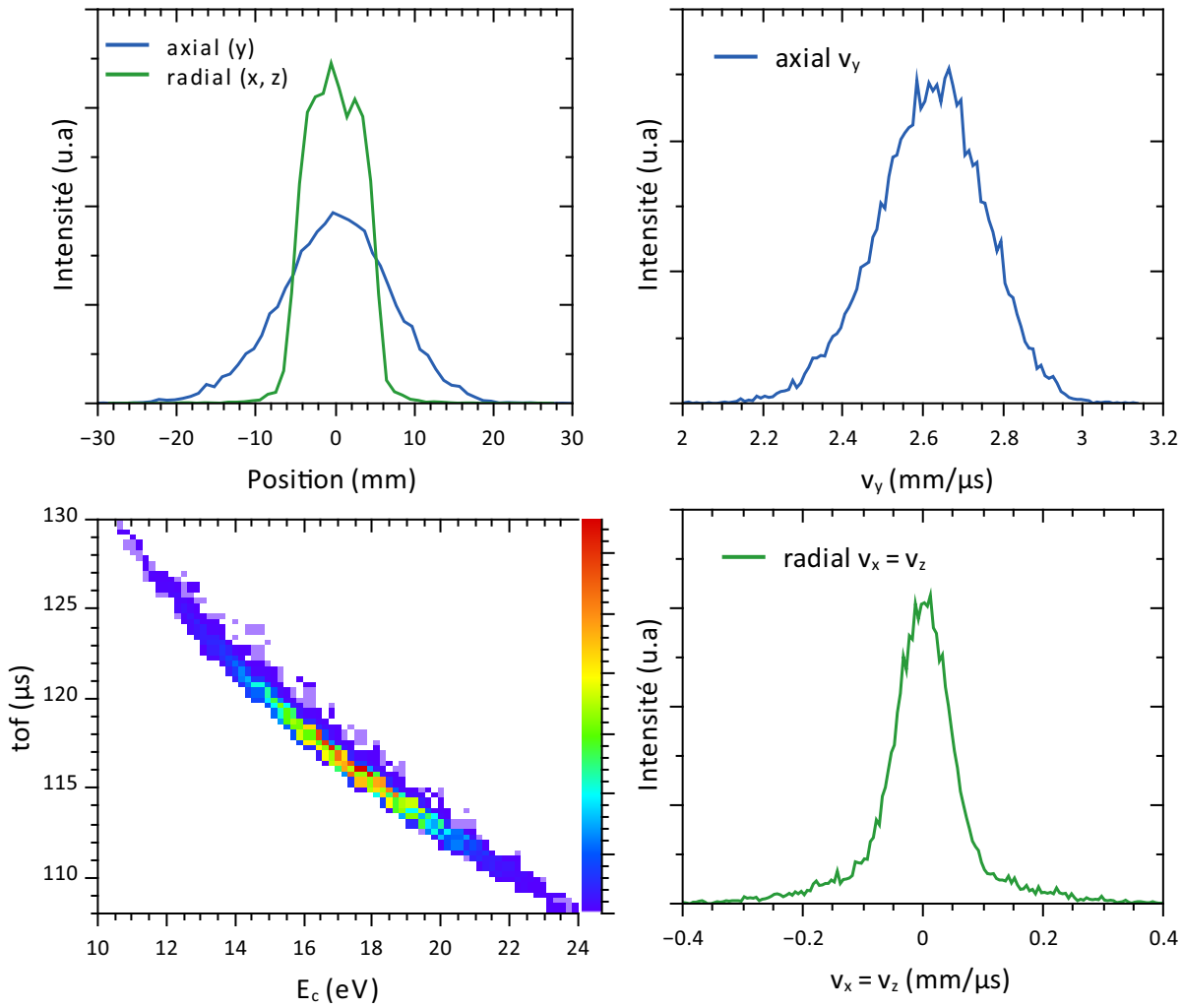


Figure 4.2.16 : *Distribution gaussienne en positions et en vitesses au centre de la zone d'interaction d'un paquet d'ions de rapport $m/q = 485$ déterminés par des simulations SIMION.*

À partir des distributions en position, on observe que la forme du paquet d'ions est très allongée selon la direction de propagation des ions et que la distribution radiale du paquet est presque homogène sur $\sim$ 10 mm. Si la dispersion axiale est principalement la traduction de la dispersion en énergie du paquet, la dispersion radiale dépend fortement de l'optique de guidage.

Pour estimer la densité du paquet d'ions dans la zone d'interaction, nous allons considérer une densité homogène dans une ellipsoïde de rayon σ_x σ_z et σ_y. Ainsi 20 $\%$ des ions sont contenus dans ce volume en choisissant une longueur de $2\sigma_y = 13{,}6$ mm dans la direction

	y (mm)	x, z (mm)	v_y (mm/μs)	v_x, v_z (mm/μs)	E_c (eV)
valeur moyenne	0	0	2,6	0	17,3
$\Delta = 2{,}35\sigma$	16,0	10,0	0,3	0,1	4,2

Table 4.2.3 : *Valeurs moyennes et largeurs à mi-hauteur des distributions gaussiennes en position, vitesse et énergie au centre de la zone d'interaction d'un paquet d'ions de rapport m/q = 485 déterminés par des simulations SIMION.*

axiale. Ainsi, on a pour ces simulations :

$$\frac{4}{3}\pi\sigma_x \times \sigma_y \times \sigma_z \simeq 514 \quad mm^3 \tag{4.2.7}$$

Ce volume est grand et est notamment 50 fois plus grand que le volume du nuage dans le piège au moment de l'extraction (9,9 mm^3). En considérant les 35200 ions par paquets détectés lors des expériences reproduites par ces simulations, la densité d'ions dans la zone d'interaction est de l'ordre de 1,4.10^4 ions/cm^3/paquet. Une valeur haute de cette densité peut être donnée en prenant en compte le nombre maximum d'ions pouvant être accumulés dans le piège N_p^{max} = 160000. Pour un même volume cette densité s'élèverait alors à 6,2.10^4 ions/cm^3/paquet. Ces valeur sont très faibles et montrent à quel point il est important de parvenir à minimiser le volume du paquet d'ions dans la zone d'interaction au travers de la distribution en énergie des ions et de leur focalisation dans la ZI grâce à l'optique de guidage. De plus, en comparaison de la densité du gaz résiduel dans la ZI, de environ 10^8 molécules/cm^3 à 10^{-9} mbar, la densité cible est quatre ordres de grandeur plus faible, ce qui devrait se traduire par un rapport signal/bruit très faible. Cependant, comme nous le verrons dans la section 4.2.4, les propriétés du spectromètre de masse nous permettent de réduire la détection du gaz résiduel ionisé par le faisceau projectile.

4.2.2.6 Perspective : amélioration des caractéristiques d'un paquet d'ions

Comme nous venons de le voir, la densité du paquet d'ions dans la zone d'interaction est très basse et est un point faible de ce dispositif. Il est donc important de trouver des solutions dans le but d'en améliorer les caractéristiques. Augmenter la densité du paquet consiste à augmenter le nombre d'ions contenu et à en réduire le volume.

Comme nous l'avons vu, le piège de Paul peut contenir un nombre d'ions limité ce qui ne nous permet pas d'augmenter la densité du nuage par ce biais. Nous devons cependant porter une attention particulière au transport des ions jusqu'à la ZI pour maximiser l'efficacité de transmission. De plus, améliorer la capacité de pompage de l'hélium du piège permettrait de diminuer les collisions à l'extraction. Ceci aurait de plus un effet bénéfique sur la pureté du paquet d'ions cibles en diminuant la fragmentation des molécules avec l'hélium.

Diminuer le volume du nuage dans la zone d'interaction se traduit essentiellement par une diminution de la dispersion en énergie du paquet d'ions. Cependant l'alimentation RF du piège ne nous permet pas l'application d'un champ d'extraction plus faible que celui que nous

utilisons actuellement. Cette diminution de la dispersion peut toutefois être obtenue à l'aide d'un *regroupeur*.

Capacité de pompage de l'hélium du piège

Un moyen de raccourcir le délai du pompage du gaz tampon du piège est de réduire la distance entre la vanne pulsée et le piège et ainsi de réduire le volume de gaz à pomper.

La figure 4.2.17 présente la modification du système d'injection pulsée du gaz tampon dans le piège. Un puits permet de rapprocher la vanne pulsée du piège sans avoir à la placer dans la chambre sous vide. Ce montage permet de réduire la longueur du conduit d'injection à $\sim$ 35 mm contre 150 mm avec l'ancien montage, présenté précédemment par la figure 4.2.12 (section 4.2.2.4).

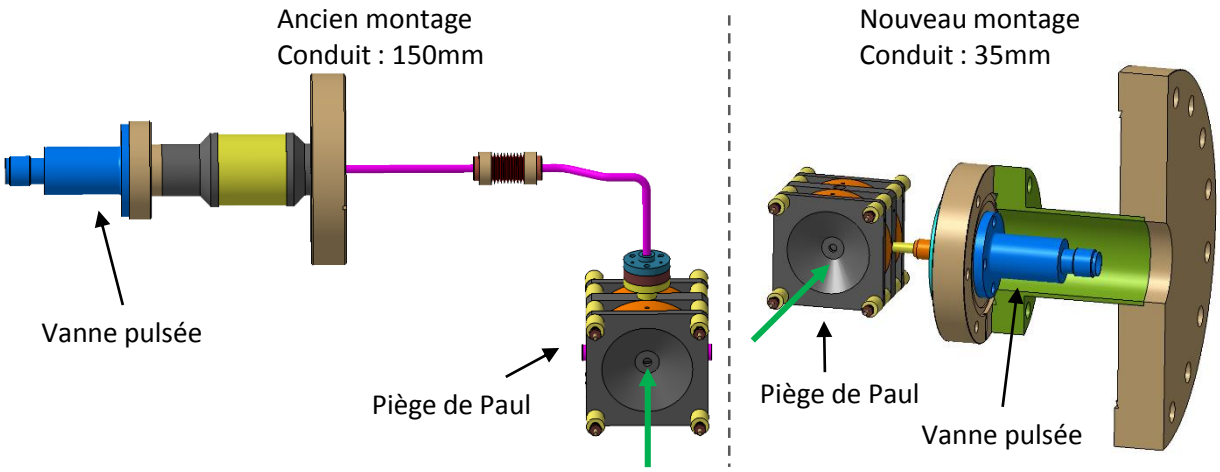


Figure 4.2.17 : *Schémas techniques de l'ancien et nouveau montage du système d'injection de gaz tampon dans le piège. La vanne pulsée est représentée en bleu. Les flèches vertes indiquent la direction de propagation des ions moléculaires cibles. Les pièces beiges sont des brides séparant la chambre du piège de l'extérieur du dispositif.*

Les premiers tests de ce nouveau montage semblent indiquer qu'une amélioration de temps de pompage d'un facteur 2 peut être obtenu. Cette amélioration peut être mise à profit pour atteindre une pression plus basse qu'actuellement au moment de l'extraction des ions et ainsi limiter les collisions avec le gaz, ou pour réduire le délai avant l'extraction du piège qui pourrait ainsi passer de 100 ms à 50 ms réduisant ainsi la durée du cycle.

Augmentation de la densité d'ions : développement d'un regroupeur

Comme le nombre d'ions contenus dans un paquet ne peut être amélioré du fait des limitations imposées par la charge d'espace dans le piège, augmenter la densité d'ions dans la zone d'interaction doit se faire par la réduction du volume du paquet d'ions. Nous avons vu que la dimension axiale du paquet Δy dans la zone d'interaction est particulièrement grande

($\sim$ 16 mm) et est dépendante de la dispersion en énergie du paquet d'ions. Cette dispersion est proportionnelle au champ électrique d'extraction, cependant en pratique l'alimentation en haute tension du piège ne nous permet pas de diminuer ce champ électrique d'avantage pour diminuer la dispersion en énergie.

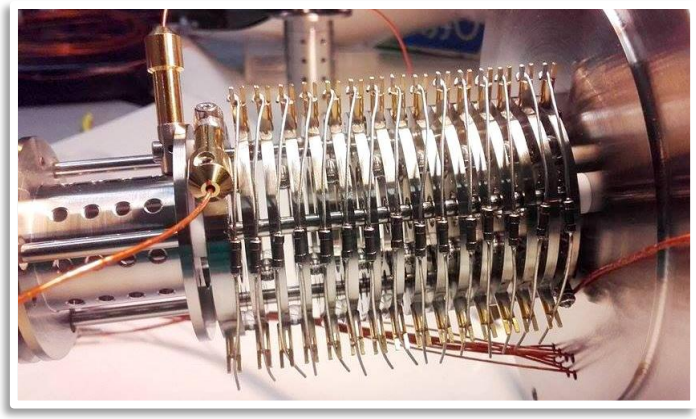


Figure 4.2.18 : *Photographie du montage du regroupeur.*

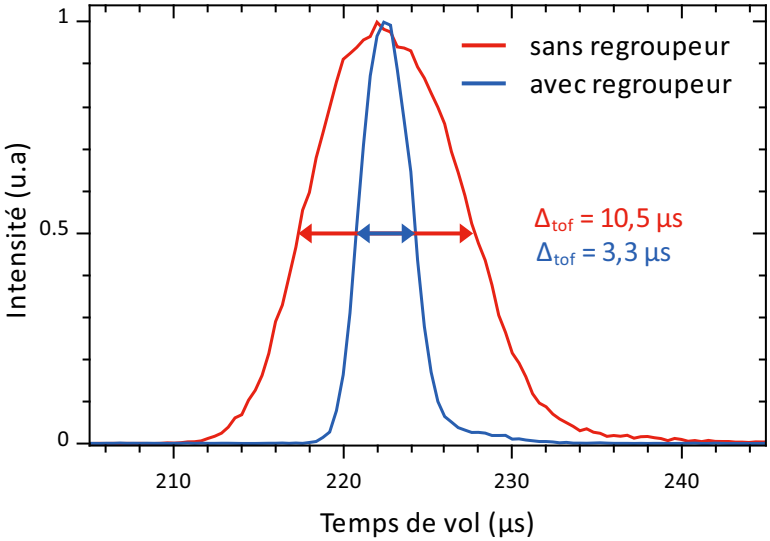


Figure 4.2.19 : *Spectres de temps de vol sur le PSD_{biomol} d'un paquet d'ions de kanamycine protonée de 20 eV d'énergie cinétique moyenne. Le spectre rouge est acquis dans les conditions standard de fonctionnement et la largeur à mi-hauteur du pic de temps de vol est $\Delta_{tof} = 10{,}5\ \mu s$. Le spectre bleu présente un résultat préliminaire obtenu grâce au regroupeur. La largeur en temps de vol est réduite d'un facteur 3 grâce à ce dispositif.*

L'idée du *regroupeur* vient de l'observation que la dispersion en position des ions dans un paquet est proportionnelle à la dispersion en énergie des ions, les plus énergétiques se trouvant à l'avant et vice versa. L'objectif de ce *regroupeur* est donc de ralentir les ions les plus rapides et accélérer les plus lents de manière à re-condenser le paquet d'ions. Ceci peut être obtenu en

appliquant à un instant donné un champ électrique en compensation de la dispersion en énergie des ions.

Des simulations SIMION ont permis de valider la géométrie d'un *regroupeur* composé d'un empilement de 16 électrodes cylindriques, de diamètre $\rho = 8$ mm et d'épaisseur 2 mm, espacées de 2 mm. Un pont de résistance permet d'appliquer un champ électrique homogène dans l'axe du *regroupeur*. Ce dispositif, présenté sur la photographie de la figure 4.2.18, a été installé récemment sur PIBALE et est actuellement en cours de caractérisation et d'optimisation. Les premiers résultats, présentés en figure 4.2.19, sont prometteurs et montrent qu'il est déjà possible de réduire d'un facteur 3 la largeur de la distribution en temps de vol, et donc la taille axiale du paquet d'ions, au niveau du $\mathrm{DSP}_{\mathrm{biomol}}$.

4.2.3 Synchronisation des faisceaux

Pour réaliser les expériences entre faisceaux croisés non continus, il est primordial de synchroniser en temps l'arrivée du paquet d'ions cibles et du pulse de faisceau projectile au centre de la zone d'interaction. Il est pour cela indispensable de connaître le temps nécessaire à chaque faisceau pour rejoindre la zone d'interaction. Il est tout aussi important de s'assurer du bon alignement spatial des deux faisceaux, autrement dit que les faisceaux soient coplanaires. Ceci est défini par l'alignement mécanique des lignes de transports des faisceaux cibles et projectiles et peut être ajusté optiquement à l'aide de certaines électrodes. Nous allons voir ici de quelle manière nous pouvons synchroniser les faisceaux et quel phénomène physique observé expérimentalement nous permet de nous assurer de cette synchronisation en temps et de l'alignement spatial des faisceaux.

4.2.3.1 Synchronisation en temps

Faisceau cible

L'instant $\mathrm{T_c}$ où le paquet d'ions cibles est au centre de la zone d'interaction est déduit des valeurs moyennes de temps de vol $\langle \mathrm{tof} \rangle$ et d'énergie cinétique $\langle \mathrm{E_c} \rangle$ mesurées sur le détecteur diagnostic $\mathrm{DSP}_{\mathrm{biomol}}$. Les ions évoluant en vol libre de la zone d'interaction jusqu'au détecteur, leur énergie et donc leur vitesse sont constantes. Ainsi, à partir de la distance D et du temps dT entre le centre de la ZI et le détecteur nous pouvons calculer la valeur de $\mathrm{T_c}$ pour des ions de masse m tel que :

$$\langle tof \rangle = T_c + dT \tag{4.2.8}$$

$$T_c = \langle tof \rangle - \frac{D}{v_y} \tag{4.2.9}$$

$$T_c = \langle tof \rangle - D\sqrt{\frac{m}{2\langle E_c \rangle}} \tag{4.2.10}$$

où D = 295 mm et $\langle tof \rangle$ et $\langle E_c \rangle$ sont déterminés expérimentalement. Cette méthode est fiable et nous permet de déterminer rapidement le temps T_c quelles que soient les conditions expérimentales (nature de l'ion, potentiel U_{bias} du piège, pression résiduelle à l'extraction, etc...).

Faisceau projectile

De même que pour le faisceau cible, le faisceau projectile traverse la zone d'interaction en vol libre donc à vitesse constante. Pour déterminer le temps d'arrivée T_p du faisceau projectile au centre de la ZI, nous mesurons, sur les iris placés de part et d'autre de la zone d'interaction, le courant I des ions incidents. Comme le montre la vue d'oscilloscope de la figure 4.2.20, les temps d'arrivée du faisceau T_{iris1} et T_{iris2} sont mesurés par rapport au signal logique T_{pulse} envoyé au déviateur électrostatique. Ainsi, T_p est simplement défini par :

$$T_p = \frac{T_{iris1} + T_{iris2}}{2} \tag{4.2.11}$$

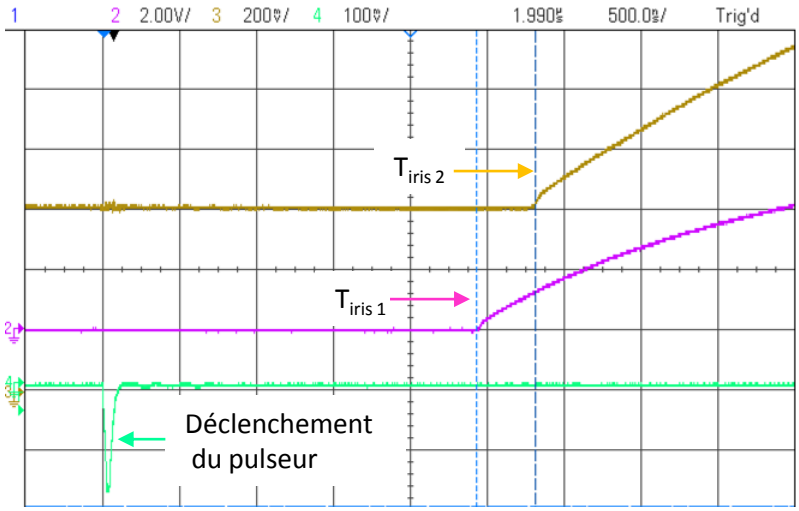


Figure 4.2.20 : *Vue d'oscilloscope des temps d'arrivée des impulsions créées sur les iris 1 et 2 au passage d'un pulse de faisceau projectile d'He$^+$ en fonction du déclenchement de la pulsation du faisceau. Ces mesures ont été réalisées au travers d'une sonde de résistance R = 10 MΩ et de capacité C = 11 pF.*

Nous avons mesuré ces temps pour des faisceaux d'He$^+$ et d'Ar$^+$ de 7 keV d'énergie cinétique. Ces résultats sont résumés dans le tableau 4.2.4. Ces temps sont peu affectés par les paramètres d'optique du faisceau.

Synchronisation entre la cible et le projectile

Synchroniser les faisceaux consiste à régler le temps d'arrivée du faisceau projectile par rapport au faisceau cible. Comme tous les temps (signaux) du cycle de fonctionnement du dispositif PIBALE sont référencés par rapport à l'extraction des paquets d'ions du piège T_0, il

	T_{iris1} (μs)	T_{iris2} (μs)	T_p (μs)
He^+	2,42	2,80	2,61
Ar^+	7,55	8,80	8,17

Table 4.2.4 : *Temps de passage T_p des projectiles au centre de la ZI déduits des temps T_{iris1} et T_{iris2} par rapport au signal logique du pulseur T_{pulse}, mesurés respectivement sur l'iris d'entrée et de sortie de la zone d'interaction, pour des faisceaux d'He^+ et d'Ar^+ de 7 keV d'énergie cinétique.*

en est de même pour le signal logique du pulseur projectile T_{pulse}. Ainsi pour un pulse d'ions projectiles d'une largeur en temps Δ_{proj}, on définit :

$$T_{pulse} = T_c - \left(T_p + \frac{\Delta_{proj}}{2}\right) \tag{4.2.12}$$

De cette manière, le centre du pulse projectile est synchronisé avec le centre du paquet d'ions cibles. Ceci est résumé schématique dans la figure 4.2.21.

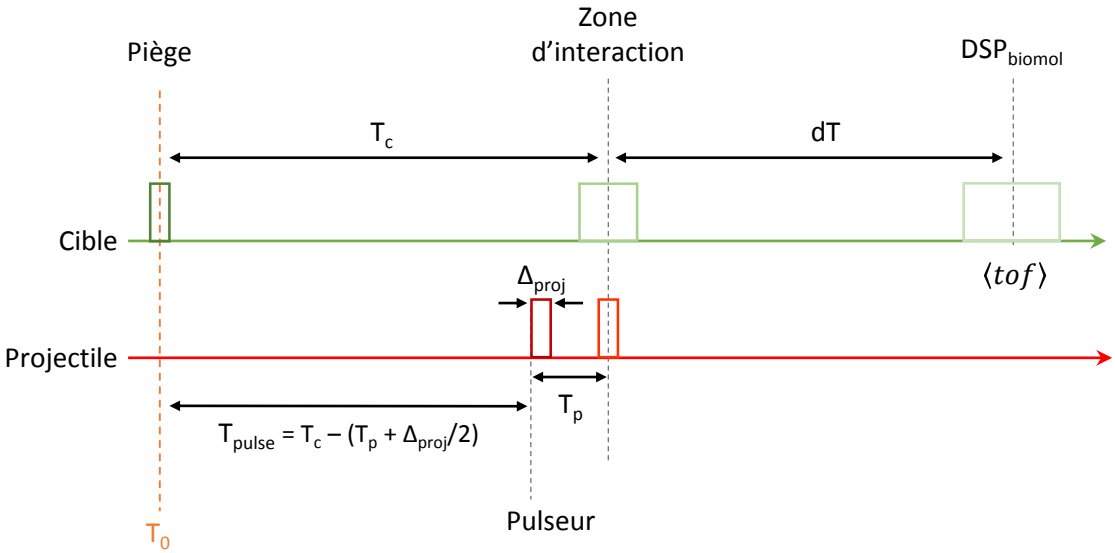


Figure 4.2.21 : *Chronogramme de la synchronisation entre les faisceaux cibles et projectiles.*

4.2.3.2 Effet du champ électrique créé par le faisceau projectile

Dans cette section nous allons parler du phénomène physique observable nous permettant de confirmer les réglages de la synchronisation des faisceaux. Ce phénomène résulte de l'interaction coulombienne entre les deux faisceaux d'ions. En particulier l'effet du champ électrique créé par le faisceau projectile sur le paquet d'ions modifie significativement les caractéristiques de ce dernier, telles que l'énergie, le temps de vol et la dispersion radiale, toutes mesurables sur le détecteur diagnostic DSP_{biomol}.

La haute intensité du faisceau projectile dans la zone d'interaction ($\sim$ 100 μA en faisceau continu) est à l'origine d'un potentiel électrique positif de quelques volts auquel les ions cibles d'une dizaine d'eV sont sensibles. Pour calculer ce potentiel électrique, nous pouvons approximer le faisceau projectile à un cyclindre de longueur infinie et de densité de charge linéique $\lambda = I_{proj}/v_{proj}$. Cette première considération est valide compte de tenu de la vitesse de ces ions : un pulse de 2 μs d'un faisceau d'He^+ à 7 keV aurait une longueur de $\sim$ 1 mètre. Ainsi le potentiel $V_{proj}(r)$ ressenti à une distance r du centre de l'axe du faisceau est défini par :

$$V_{proj}(r) = -\frac{\lambda}{2\pi\varepsilon_0} ln\left(\frac{r}{r_0}\right) \tag{4.2.13}$$

où ε_0 est la permittivité du vide et r_0 est la distance à partir de laquelle le potentiel devient nul $V_{proj}(r_0) = 0$ V. Compte tenu de la géométrie de la zone d'interaction, on peut choisir raisonnablement $r_0 = 10$ cm.

Ainsi par exemple pour un faisceau d'He^+ de 7 keV d'énergie cinétique et d'une intensité de 100 μA, le potentiel ressenti à une distance R = 5 mm est de $V_{proj}(R) \simeq 9{,}3$ V. Ce potentiel n'est clairement pas négligeable compte tenu de la basse énergie des ions cibles (de l'ordre de 15 eV). Le potentiel créé dépend directement de l'intensité et de la forme du faisceau projectile ainsi que de l'énergie des ions cibles. Le potentiel électrique V_{proj} étant proportionnel à l'intensité du faisceau, plus celle-ci sera faible et moins cet effet sera important. De même, plus les ions cibles sont énergétiques et moins ils sont affectés par ce potentiel.

Cet effet a été mis en évidence expérimentalement en observant la déformation du pic de temps de vol des paquets d'ions cibles sur le DSP_{biomol} en présence du faisceau projectile. La figure 4.2.22 présente ces résultats pour un paquet d'ions moléculaires de kanamycine protonée (m/q = 485) de 15 eV d'énergie cinétique et un faisceau projectile d'He^+ à 7 keV et de 100 μA d'intensité en continu et pour différentes largeurs de pulses Δ_{proj}. Ici, le faisceau projectile est synchronisé en temps comme présenté précédemment, tel que le centre du pulse projectile frappe le centre du paquet d'ions cibles. Un faible décalage du temps de vol moyen de environ 3 μs est observé lorsque le faisceau est présent en continu dans la zone d'interaction (courbes « 0 μs » et « ∞ »). Dans le cas d'un faisceau non continu, une déformation des pics de temps vol apparaît lorsque Δ_{proj} est inférieur à la largeur de la distribution en temps de vol du paquet. En effet, l'énergie cinétique finale des ions est modifiée par le potentiel électrique créé au passage du faisceau. Autrement dit, les ions à l'avant du paquet sont accélérés par le potentiel électrique et arrivent plus tôt sur le détecteur, alors que les ions à l'arrière sont ralentis et arrivent à des temps de vol plus longs. Cet effet observé sur le temps de vol est d'autant plus marqué que le point de mesure s'effectue loin de la zone d'interaction, laissant du temps pour que les dispersions en énergie/vitesse des ions entraînent un effet observable sur le temps de vol.

Expérimentalement, la déformation du pic de temps de vol est sensible à la synchronisation des faisceaux. Si le faisceau projectile est en retard par rapport au paquet cible, une plus grande partie des ions du paquet se trouve devant le passage du faisceau et est donc accélérée

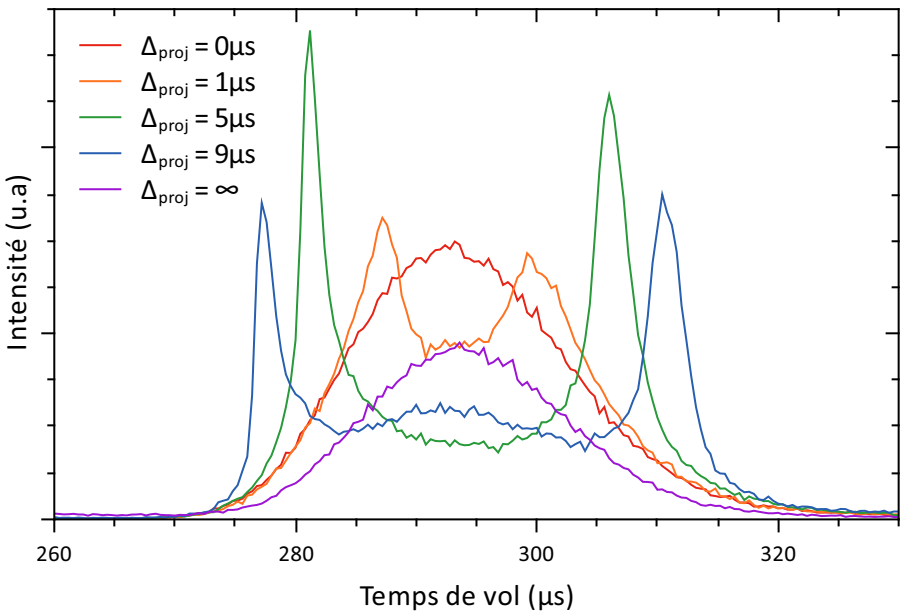


Figure 4.2.22 : *Distributions en temps de vol, mesurées sur le DSP_{biomol}, de paquets de kanamycines protonées ($m/q = 485$) de 15 eV d'énergie cinétique, en fonction de la largeur du pulse projectile Δ_{proj} traversant la zone d'interaction. Le faisceau projectile est composé d'ions He^+ de 7 keV d'énergie cinétique pour une intensité de 100 μA en continu. La courbe rouge présente la distribution en temps de vol en l'absence du faisceau projectile.*

par le potentiel électrique. Les deux structures observées en figure 4.2.22 deviennent alors asymétriques. Cet effet nous permet donc de vérifier et d'affiner la synchronisation en temps de nos deux faisceaux cibles et projectiles au centre de la zone d'interaction. On peut d'ailleurs noter que les simulations SIMION indiquent qu'une synchronisation en temps correcte se traduit par des structures piquées symétriques

Enfin, on peut noter que l'effet de la répulsion coulombienne s'observe aussi dans le plan transverse à la direction de propagation des ions cibles. Cet effet est d'ailleurs à l'origine de la diminution de l'intensité observée sur la figure 4.2.22 lorsque le faisceau projectile est continu (diminution de 40 %) qui traduit d'un fort élargissement du paquet d'ions cibles. En effet, un pulse projectile de 1 μs (ou plus) pouvant être considéré comme infiniment long suivant l'axe x pour les ions cibles, ceux-ci sont principalement déviés suivant l'axe z. La figure 4.2.23 montre l'effet de cette déviation grâce à des images réalisées dans le plan du DSP_{biomol}. On observe ici une augmentation d'un facteur deux de la taille du paquet d'ions suivant l'axe z lorsque le faisceau est présent en continu dans la zone d'interaction. En revanche, la dimension du paquet dans l'axe x reste inchangée. On note que le paquet d'ions est initialement centré sur le détecteur et que l'augmentation selon l'axe z se fait ici symétriquement par rapport au centre du paquet d'ions. Ceci suggère que les faisceaux sont effectivement coplanaires et se croisent à $z = 0$. On a alors ici une preuve expérimentale du bon alignement spatial des deux faisceaux au centre de zone d'interaction.

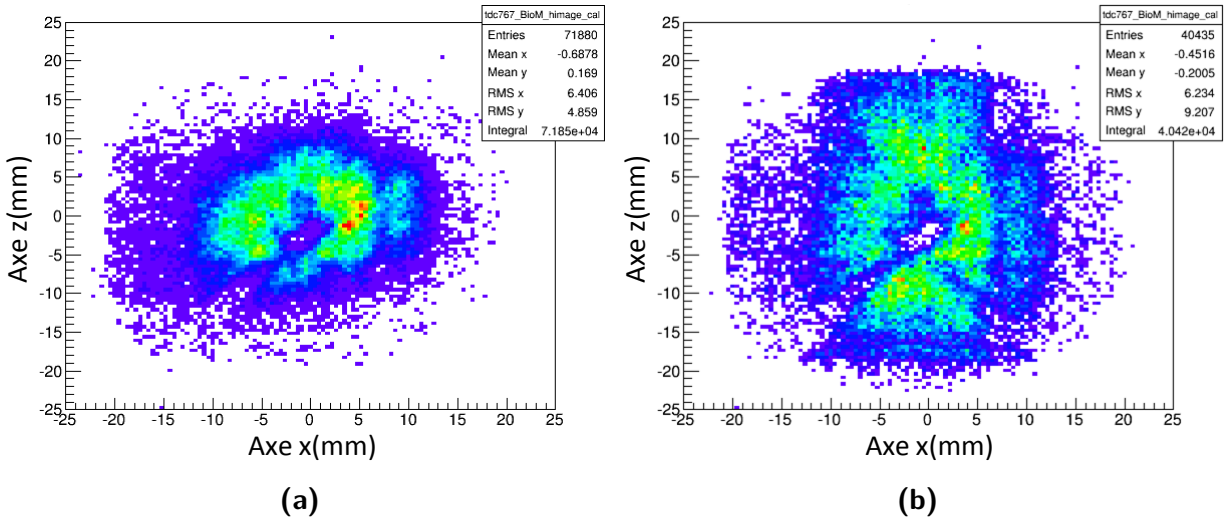


Figure 4.2.23 : *Profils 2D acquis dans le plan du DSP_{biomol} de paquets de kanamycine protonée ($m/q = 485$) de 15 eV d'énergie cinétique dans les conditions **(a)** sans faisceau projectile, et **(b)** avec faisceau projectile continu (He^+, $E_c = 7$ keV, $I_{proj} = 100\ \mu A$).*

4.2.4 Spectromètre de masse à temps de vol

Le spectromètre à temps de vol utilisé sur le dispositif PIBALE possède deux particularités qui conditionnent une partie du fonctionnement global de l'expérience. Comme décrit dans la section 4.1.4, le centre du détecteur, noté DSP_{tof}, est décalé de 80 mm dans la direction y par rapport au centre de la zone d'interaction. De plus, les électrodes d'extraction du TOFMS peuvent pivoter de quelques degrés autour de l'axe z permettant notamment de modifier l'orientation des champs d'extractions $\vec{E_1}$ et $\vec{E_2}$ dans le plan yOz suivant un angle θ. Nous verrons comment les caractéristiques de ce spectromètre nous permettent de séparer les fragments des ions cibles et les ions du gaz résiduel sur le détecteur et dans quelles gammes de paramètres (champs d'extractions, angle θ, énergie cinétique des ions) ce fonctionnement est possible.

4.2.4.1 Différenciation en vitesse et gamme de fonctionnement

La différenciation en vitesses initiales entre les ions cibles et le gaz résiduel nous permet de pouvoir détecter sur le DSP_{tof} l'ion parent et ses fragments en diminuant la contribution du gaz résiduel ionisé par le faisceau projectile. De cette façon il est possible de limiter le bruit de fond des spectres de temps de vol. La séparation en position dans le plan du détecteur se fait uniquement selon l'axe y, en fonction de la vitesse initiale des ions dans cet axe v_{y0}, comme le montre l'exemple de la figure 4.2.24. En première approximation, nous pouvons négliger l'effet du champ électrique dans l'axe y sur la vitesse initiale des ions v_{y0} et sur le temps de vol total, T. Ainsi, la position d'impact dans le plan du détecteur, Y_{DSP}, peut être déduite de la position d'impact pour $\theta = 0$, en rajoutant la contribution purement géométrique de l'angle avec le terme $z_{DSP} \times \tan\theta$, où $z_{DSP} = 138$ cm est la distance entre le détecteur et le centre de la ZI.

Ainsi, la position $Y_{DSP}(y_0,v_{y0},T,\theta)$, pour des ions de position initiale y_0 (où $y_0 = 0$ est le centre de la ZI), est définie par :

$$Y_{DSP}(y_0, v_{y0}, T, \theta) = Y_{DSP}(y_0, v_{y0}, T, \theta = 0) + z_{DSP}.tan\theta \tag{4.2.14}$$

$$Y_{DSP}(y_0, v_{y0}, T, \theta) = y_0 + v_{y0}.T + z_{DSP}.tan\theta \tag{4.2.15}$$

En remplaçant dans cette équation $v_{y0} = \sqrt{2E_c/m}$ et $T = K.\sqrt{m/q}$, où E_c est l'énergie cinétique des ions dans l'axe y et $K \propto 1/\sqrt{V_1}$ est fonction des champs électriques E_1 et E_2 et de la géométrie du spectromètre ($K = 1{,}92$ pour $V_1 = 4000$ V), on obtient :

$$Y_{DSP}(y_0, v_{y0}, T, \theta) = y_0 + K.\sqrt{\frac{2E_c}{q}} + z_{DSP}.tan\theta \tag{4.2.16}$$

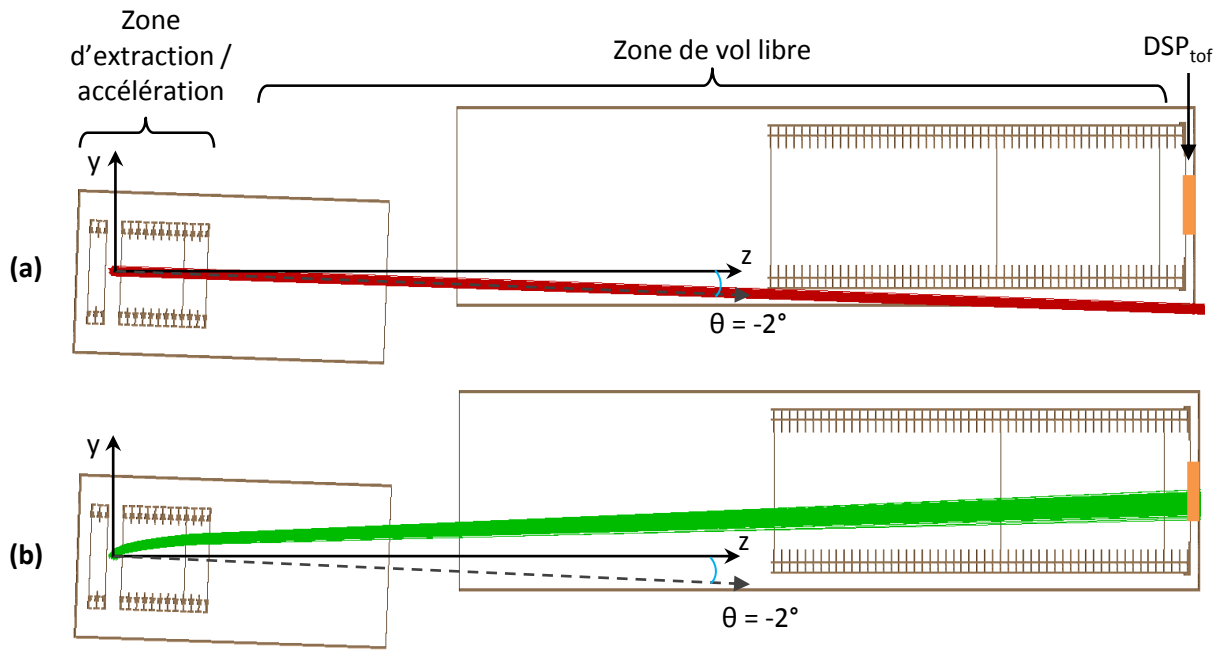


Figure 4.2.24 : *Exemples de simulations SIMION de notre spectromètre de masse à temps de vol. La tension d'extraction est fixée à $V_1 = 4$ kV, ce qui correspond à $E_1 = 107{,}3$ V/cm et $E_2 = 904$ V/cm, et l'angle du spectromètre à θ= -2°.* ***(a)*** *: vitesse initiale nulle dans l'axe y. Les ions suivent la direction du champ d'extraction et n'atteignent pas le détecteur.* ***(b)*** *: vitesse initiale non nulle dans l'axe y, avec $E_c = 17$ eV. L'angle θ et le champ électrique permettent de guider les trajectoires vers le centre du détecteur. On notera la présence des électrodes d'un miroir électrostatique dans la zone de vol libre mais non utilisées (potentiel nul sur ces électrodes).*

On voit alors que pour l'ion parent cible, la position sur le détecteur est indépendante de la masse et ne dépend que de E_c pour q, y_0 et θ fixés. De plus, l'augmentation de V_1 permet de redresser les trajectoires et de ramener les ions dans l'axe du champ d'extraction, et ainsi

de compenser la contribution de l'énergie cinétique initiale des ions. De plus l'orientation du champ d'extraction du spectromètre suivant θ nous permet de modifier la position des ions dans le plan du détecteur sur la gamme de $\pm$ 50 mm pour θ compris entre -2° et +2°.

Différenciation du gaz résiduel

La position moyenne sur le détecteur des ions du gaz résiduel, dont les distributions en vitesses sont nulles en moyenne, est uniquement dépendante de l'angle d'extraction θ et de leur position initiale y_0, soit de la largeur du faisceau projectile dans la zone d'interaction. Ainsi, pour des ions au centre de la ZI, $y_0 = 0$, un angle de 1,7° est nécessaire pour positionner les ions sur le bord inférieur du détecteur ($Y_{PSD} = 40$ mm). Nous verrons qu'il est possible, grâce à l'angle θ, de sortir les ions du gaz résiduel du détecteur et de réduire la pollution des spectres de temps de vol.

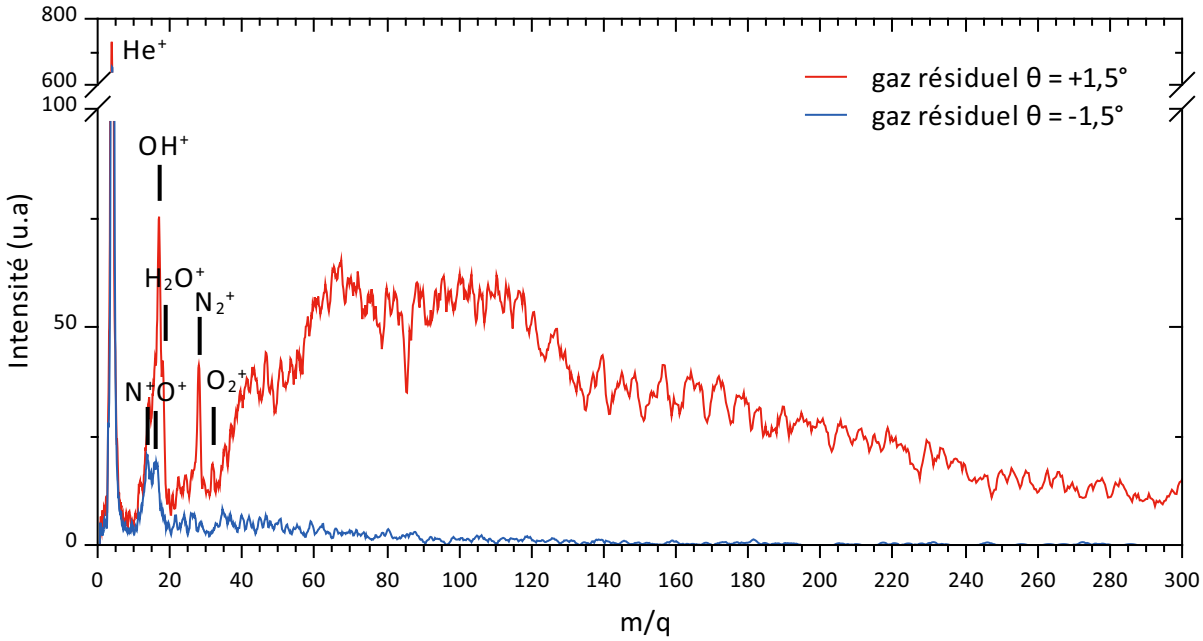


Figure 4.2.25 : *Spectres de temps vol acquis sur le DSP_{tof} pour une tension d'extraction V_1 = 4000 V. En rouge et en bleu sont comparés en fonction de l'angle θ du spectromètre, les spectres de gaz résiduel ionisé par un faisceau d'He^+ de 7 keV d'énergie cinétique et de longueur de pulse Δ_{proj} = 3 μs.*

La figure 4.2.25 illustre parfaitement cet effet dans le cas de spectres de temps de vol du gaz résiduel ionisé après le passage d'un pulse faisceau d'He^+ de 7 keV d'énergie cinétique ($\Delta_{proj} = 3$ μs, $V_1 = 4000$ V). On observe ici clairement l'effet de l'orientation du spectromètre sur la détection du gaz résiduel. Lorsque l'axe du spectromètre est orienté vers le DSP_{tof} avec $\theta = +1{,}5°$ (spectre rouge, figure 4.2.25), on détecte les molécules du gaz résiduel ionisé H_2O^+, N_2^+ et O_2^+. Les fragments de ces molécules, N^+, O^+ et OH^+ sont aussi observés, ainsi qu'un pic intense d'He^+ dû à l'effusion de l'hélium depuis le piège jusqu'à la zone d'interaction. Ce

spectre présente de plus un large fond sans structure identifiable s'étendant jusqu'à quelques centaines de m/q, gamme dans laquelle peuvent apparaître des fragments de la molécule cible. En tournant l'orientation du spectromètre à θ = -1,5°, la majorité des ions n'atteint plus le détecteur et le bruit est considérablement réduit (spectre bleu, figure 4.2.25). On observe cependant encore les pics correspondant à N^+ et O^+. En effet, ces ions acquièrent de l'énergie cinétique lors de l'explosion coulombienne des dications $N_2{}^{2+}$ et $O_2{}^{2+}$ (KER pouvant être compris entre 5 et 30 eV). De fait, seuls les ions possédant une vitesse non nulle dans la direction y peuvent alors atteindre le détecteur.

Cette figure présente deux cas extrêmes d'orientation du spectromètre, mais nous pouvons aussi définir quel est l'angle θ_{lim} en dessous duquel le gaz résiduel se retrouve hors du détecteur. Ainsi, en considérant le cas de molécules de $N_2{}^+$ formés loin du centre à y_0 = 10 mm (à l'extrémité d'un faisceau projectile en forme de bâtonnet horizontal), et un élargissement dû à la vitesse initiale thermique des ions (300 K, 0,5 mm/μs), avec une tension d'extraction V_1 = 4000 V, le temps de vol de ces ions est de K$\times\sqrt{m} \sim$ 10 μs et leur position dans le plan du détecteur à θ = 0° est donc :

$$Y_{DSP} = 10 + 0,5 \times 10 = 15mm \tag{4.2.17}$$

Ainsi l'angle limite θ_{lim} pour que ces ions restent en dehors du détecteur, soit $Y_{\text{DSP}} < 40$ mm (bord inférieur du détecteur), vaut $\theta_{\text{lim}} \simeq 1°$.

Énergie cinétique des ions cibles et tension d'extraction

La position d'impact des ions cibles sur le détecteur étant dépendant de leur énergie cinétique initiale, de la tension d'extraction V_1 et de l'angle θ, il est possible en ajustant ces paramètres de « choisir » cette position d'impact Y_{DSP}. Cependant la position moyenne des fragments sur le détecteur par rapport à celle de l'ion cible doit également être prise en considération pour déterminer les paramètres (E_c, V_1, θ). En effet, les fragments d'une molécule ont une masse inférieure et donc un temps de vol T_{frag} plus court que l'ion parent, de masse m et de charge q (en considérant $q_{\text{frag}} \geq q$). La vitesse moyenne des fragments étant peu modifiée lors de la collision par rapport à la vitesse initiale de l'ion parent, leur position d'impact est donc inférieure à celle de l'ion parent. De plus, l'énergie cinétique acquise par les fragments suite à la fragmentation (KER) se traduit par un élargissement autour de leur position moyenne, et peut donc être négligée ici. L'écart en position ΔY entre l'ion parent de masse m_p et un fragment de masse m_f, de même charge $q_{\text{frag}} = q$, suit donc la relation :

$$\Delta Y = K\sqrt{\frac{2E_c}{q.m_p}}(\sqrt{m_p} - \sqrt{m_f}) \tag{4.2.18}$$

Cet écart augmente donc avec l'énergie cinétique initiale des ions cibles. Cependant comme K $\propto 1/\sqrt{V_1}$, il est possible de resserrer les positions d'impacts des fragments en augmentant la tension d'extraction.

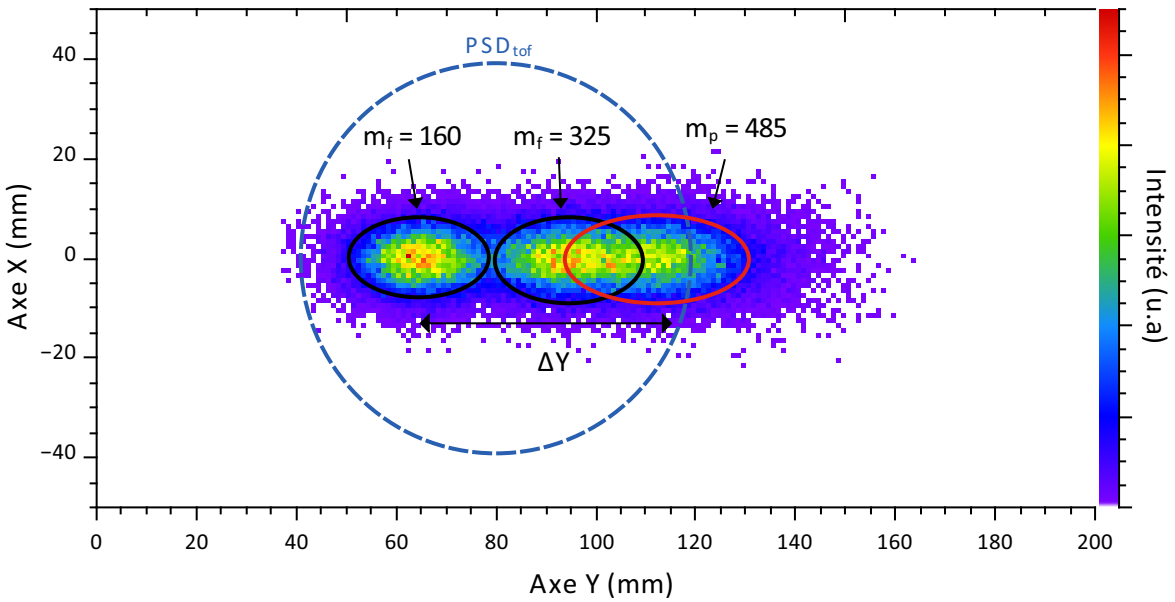


Figure 4.2.26 : *Simulation SIMION des positions d'impacts d'ions parents de masse $m_p = 485$ u.m.a et fragments de masses $m_f = 160$ et 325 u.m.a. Les caractéristiques initiales du nuage d'ions dans la zone d'interaction, avant l'application du champ d'extraction V_1 de 4 kV, sont celles du tableau 4.2.3. Les ions ont une vitesse positive selon y. $Y = 0$ correspond au centre de la zone d'interaction et le détecteur, centré sur $Y = 80$ mm et $X = 0$ mm, est délimité par la ligne pointillée bleue.*

La figure 4.2.26 illustre cet écart en position à partir de simulations SIMION. Elle présente la position d'impact dans le plan du détecteur d'ions parents de $m/q = 485$ et deux fragments de $m/q = 160$ et 325, extraits avec un potentiel V_1 de 4 kV et un angle θ de 0°. Sur cet exemple, la position des ions parents sur le détecteur Y_{DSP} est de $\sim$ 115 mm et l'écart ΔY avec les fragments de $m/q = 160$ et $m/q = 325$ est respectivement de $\sim$ 50 et 20 mm. Le détecteur s'étendant de 40 à 120 mm, les deux ions peuvent être détectés.

La figure 4.2.27 reprend cet exemple et présente l'évolution de ΔY en fonction de la masse du fragment et pour des énergies cinétiques de l'ion parent de 15, 25 et 35 eV. En considérant que les ions parents sont centrés sur le bord supérieur du détecteur à $Y = 120$ mm, alors les fragments dont l'écart ΔY est supérieur 80 mm sont hors du détecteur, constituant une coupure de la détection des fragments de faibles masses. La valeur de cette coupure en masse augmente avec l'énergie cinétique des ions cibles, passant ainsi de $m_f = 25$ u.m.a pour 15 eV à $m_f = 120$ u.m.a pour 35 eV. Ceci met en avant l'importance de pouvoir orienter la position d'impact des ions parents Y_{DSP} vers le bord supérieur du détecteur pour garder le plus de fragments dans la zone de détection.

Les simulations SIMION nous permettent de déterminer la position des ions dans le plan du détecteur en fonction des paramètres ((E_c, V_1, θ). La figure 4.2.28 présente pour un angle $\theta = 0° < \theta_{lim}$ l'évolution de la positon du centroïde d'un paquet d'ions parents dans le plan du DSP_{tof} en fonction de la tension d'extraction V_1 pour différentes énergies cinétiques initiales

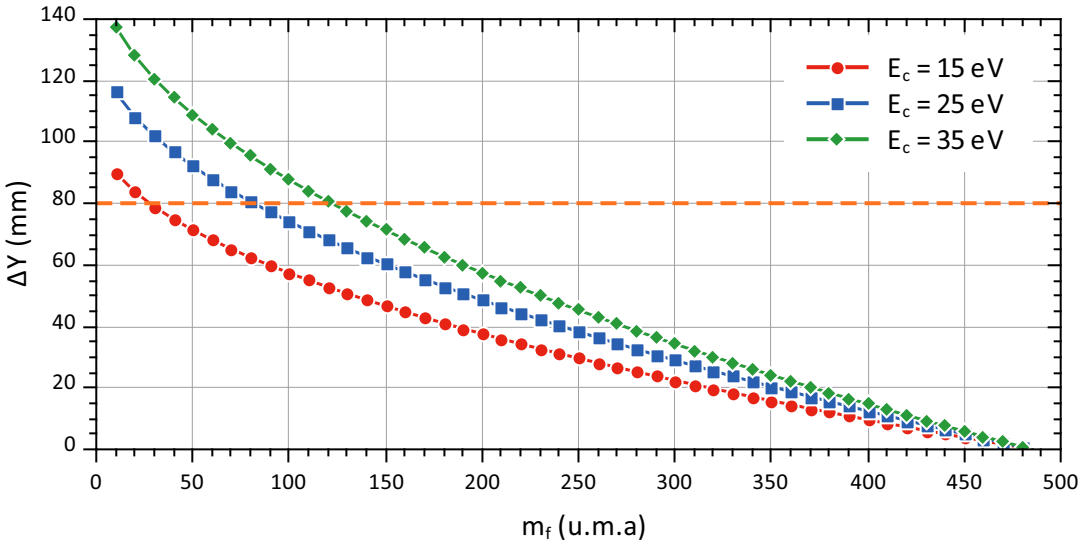


Figure 4.2.27 : *Écart en position ΔY des fragments de masses m_f par rapport à la position de l'ion parent de masse $m_p = 485$ u.m.a, d'énergie cinétique $E_c = 15$, 25 et 35 eV et de même charge $q = 1e$, pour une tension d'extraction $V_1 = 4000$ V. Les fragments de masse m_f dont ΔY est supérieur à 80 mm (diamètre du détecteur, représenté par la ligne pointillée orange) sont hors détecteur si la position de l'ion parent Y_{DSP} est inférieure à 120 mm (position du bord supérieur du détecteur).*

des ions. On voit ainsi que pour un angle donné il existe des couples (E_c, V_1) tel que $\langle Y_{DSP} \rangle \simeq$ 120 mm, représenté ici par la zone entourée. En diminuant θ, cette zone se décale vers des tensions d'extraction V_1 plus faibles et des énergies cinétiques plus hautes. On peut noter comme limite que pour des énergies cinétiques inférieures à 10 eV ou supérieures à 30 eV, la tension d'extraction V_1 doit être respectivement inférieure à 3 kV et supérieure à 10 kV. De plus on observe de manière générale dans ces simulations que lorsque la position des ions Y_{DSP} est supérieure à 140 mm, une partie des ions est perdue en frappant les électrodes d'extractions. Par exemple pour des ions 35 eV d'énergie cinétique il faut au minimum $V_1 = 5$ kV pour redresser la trajectoire des ions avant que ceux-ci ne heurtent les électrodes. Il n'est donc pas possible de ramener ces ions sur le détecteur en orientant θ vers -2°.

En pratique, le montage électrique réalisé pour appliquer la haute tension V_1 ne nous permet pas pour le moment d'appliquer une tension supérieure à 7 kV. Notre plage de fonctionnement correspond donc à :

$$\begin{aligned} V_1 &\in [3\,;\,6]\ \text{kV} \\ E_c &\in [15\,;\,25]\ \text{eV} \\ \theta &\in [-1{,}5\,;\,0]\ ^\circ \end{aligned}$$

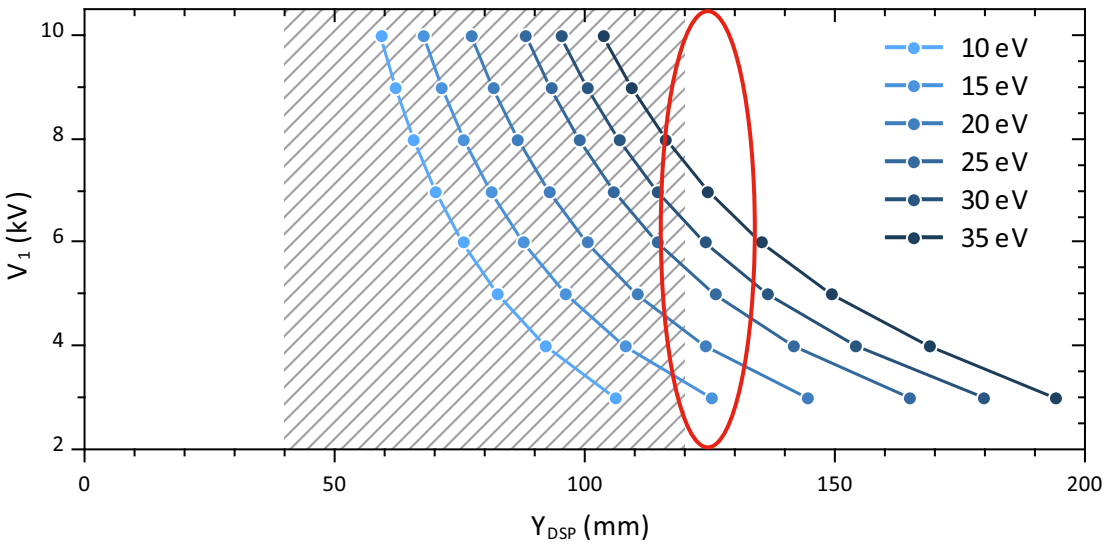


Figure 4.2.28 : *Position Y_{DSP} du centroïde de paquets d'ions cibles dans le plan du détecteur en fonction de la tension d'extraction V_1 et de l'énergie cinétique initiale des ions E_c dirigée suivant l'axe y, d'après des simulations SIMION. $Y_{DSP} = 0$ mm est le centre de la zone d'interaction. La zone hachurée représente l'emplacement du détecteur de 80 mm de diamètre, centré en $Y_{DSP} = 80$ mm.*

4.2.4.2 Exemple d'imagerie du paquet d'ions cibles

Dans cette section, nous allons montrer brièvement l'exemple d'une mesure en temps de vol et en position d'un paquet d'ions extrait depuis la zone d'interaction et détecté sur le PSD_{tof}. Ces mesures ont été réalisées pour un paquet de kanamycine protonée (m/q = 485) d'une énergie cinétique de 17,0 ± 3,2 eV, avec un champ d'extraction V_1 de 6 kV de manière à observer le paquet en entier sur le détecteur. Pour pouvoir réaliser correctement ces mesures, le taux de comptage doit être faible sur le détecteur. L'intensité du paquet d'ions est donc volontairement réduite (quelques ions par paquet) et il n'y a donc pas de charge d'espace dans le piège.

La figure 4.2.29 présente l'image sur ce détecteur et les profils dans les axes X et Y. La coordonée (0,0) sur le détecteur correspond au centre du détecteur. À partir des profils nous pouvons déterminer les dimensions du paquet :

— $\langle y \rangle = 13{,}0$ mm (soit $Y_{DSP} = 93$ mm) et $\Delta y = 26{,}8$ mm
— $\langle x \rangle = 0{,}5$ mm et $\Delta x = 15{,}2$ mm

Les largeurs du nuage sont cohérentes avec celles déterminées par SIMION au centre de la zone d'interaction (section 4.2.2.5, tableau 4.2.3), en considérant que les dimensions du nuage s'élargissent dans le tube de temps de vol du fait des vitesses initiales des ions. La position du paquet sur le détecteur Y_{DSP} est aussi en accord avec celle attendue d'après les simulations SIMION présentées dans la figure 4.2.28 de la section précédente.

Le pic de temps de vol de ce paquet d'ions est présenté dans la figure 4.2.30. Dans ces conditions nous mesurons un temps de vol moyen T de 31,5 μs et une largeur à mi hauteur ΔT

de 170 ns. La résolution en masse m/Δm déduite de cette mesure est de $\sim$93, ce qui est loin de la résolution optimale d'un spectromètre de ce type. Cette valeur traduit une forte dispersion en vitesse dans l'axe z des ions, qui est l'effet dominant sur la largeur du pic de temps de vol.

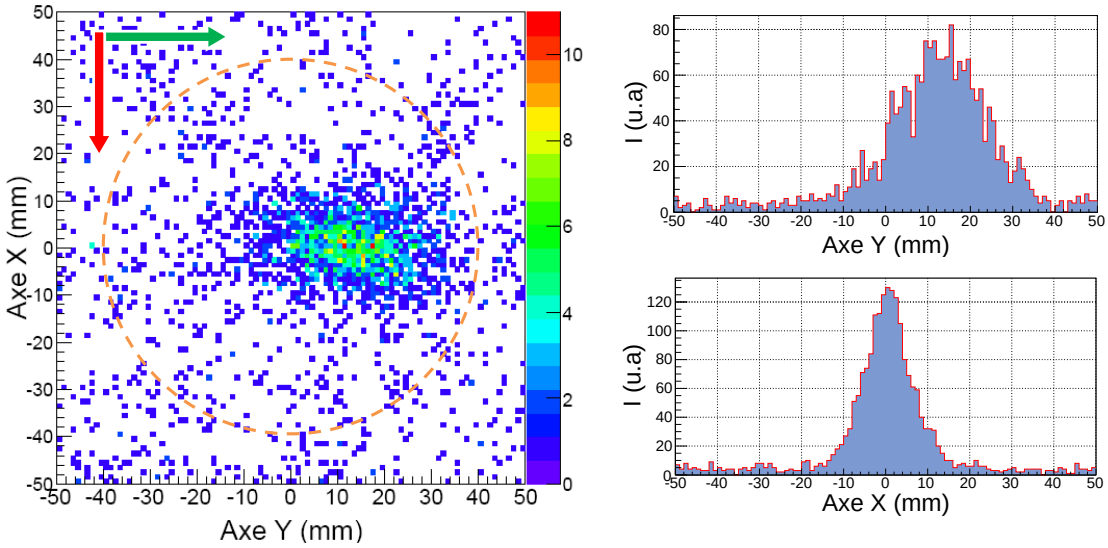


Figure 4.2.29 : *Image et profils d'un paquet d'ions de kanamycine (m/q = 485) de 17 eV d'énergie cinétique obtenus sur DPS_{tof} pour un potentiel d'extraction de 6kV. Les axes X et Y sont centrées sur le détecteur, délimité par la ligne pointillée orange. La trajectoire initiale des ions cibles (flèche verte) selon l'axe Y va de gauche à droite et celle des ions projectiles (flèche rouge) selon l'axe X va du haut vers le bas.*

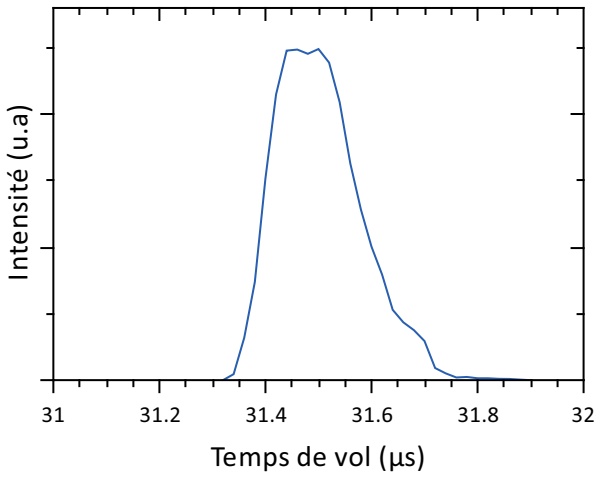


Figure 4.2.30 : *Temps de vol mesuré sur le DSP_{tof} d'un paquet d'ions de kanamycine (m/q = 485) de 17 eV d'énergie cinétique, pour un potentiel d'extraction de 6kV.*

4.3 Bilan et premières expériences en faisceaux croisés

Nous allons ici faire le bilan de toutes les informations importantes énoncées dans les sections précédentes dont, notamment, la densité d'ions cibles et l'intensité du faisceau projectile, afin d'estimer le taux d'évènements attendus lors d'expériences réalisées sur ce dispositif. Ensuite, nous présenterons dans premier temps le fonctionnement d'une acquisition en quatre cycles nécessaire à la soustraction des différentes sources de pollution des spectres de collisions et dans un second temps, les résultats d'une expérience réalisée avec des ions moléculaires cibles de kanamycine protonée et un faisceau projectile d'He^+ de 7 keV d'énergie cinétique. Nous y détaillerons les différentes informations que nous pouvons obtenir des spectres de temps de vol et des positions d'impact des ions.

4.3.1 Bilan

Comme il l'a été présenté tout au long de ce chapitre, le fonctionnement global de ce dispositif est principalement régi par les caractéristiques du piège à ions et du spectromètre de masse à temps de vol. Nous avons ainsi identifié différentes contraintes liées au fonctionnement du dispositif :

— La durée du cycle $T_{cycle} = 200$ ms est imposée par le temps nécessaire pour remplir le piège au maximum de sa capacité et par la vitesse de pompage du gaz tampon avant l'extraction d'un paquet d'ions. Nous avons vu que pour une intensité initiale de bio-molécules de ~ 15 pA, une centaine de millisecondes est nécessaire pour remplir le piège à son maximum. Ce temps est directement lié à l'intensité de faisceau en amont du piège et à l'efficacité d'injection et de piégeage des ions. De plus, nous avons mis en évidence qu'une centaine de millisecondes est nécessaire pour pomper le gaz tampon du piège avant d'extraire un nuage d'ions et ainsi limiter les collisions dans le gaz résiduel pouvant altérer les caractéristiques du paquet.

— Le nombre maximal d'ions que peut contenir un paquet est limité par l'effet de la charge d'espace lors de l'accumulation des ions dans le piège. Nous avons estimé qu'un maximum d'environ $1{,}6.10^5$ ions monochargés peut être accumulé dans le piège.

— Les dimensions d'un paquet d'ions dans la zone d'interaction dépendent principalement de la distribution en énergie des ions. Cette distribution est directement liée à la taille du nuage dans le piège (influencée par l'effet de la charge d'espace) et à la valeur du champ d'extraction du piège $\|\overrightarrow{E_{ext}}\|$. Nous avons estimé à l'aide de simulations SIMION, pour un piège rempli ($1{,}6.10^5$ ions), que la densité d'un paquet d'ions dans la ZI est d'environ $6{,}2.10^4$ ions/cm^3/paquet, pour des ions de rapport $m/q = 485$ (équivalent à la kanamycine protonée) de 17,4 eV d'énergie cinétique, dont les dimensions du paquet dans la ZI sont de $\Delta y \sim 16$ mm et $\Delta x = \Delta z \sim 10$ mm.

— Afin de détecter tous les fragments produits lors d'expériences de collisions sur le DSP_{tof} et limiter la détection du gaz résiduel ionisé par le faisceau projectile, le fonctionnement

du spectromètre exige certaines contraintes. Dans la plage de fonctionnement possible, nous travaillons avec des ions d'énergie cinétique entre 15 et 20 eV, une tension d'extraction de 4 kV et un angle de 0° à -1°.

— La source d'ions projectile Mono1000 peut fournir des faisceaux d'ions atomiques intenses (jusqu'à 100μA en continu disponible dans la zone d'interaction) jusqu'à 7 keV d'énergie cinétique. En particulier, le faisceau peut être mis en forme pour maximiser le recouvrement des faisceaux. Nous avons ainsi montré que le faisceau peut prendre une forme de bâtonnet horizontal de dimension Δy $\simeq$ 15 mm et Δz $\simeq$ 4 mm. Des pulses de faisceaux de 1 à 5 μs sont utilisés.

— Enfin, l'effet du potentiel électrique créé par le faisceau projectile sur les paquets d'ions cibles nous permet de nous assurer de la bonne synchronisation des faisceaux et de leur bon alignement vertical.

4.3.2 Calcul du taux d'événement attendu

À partir de ces paramètres, nous pouvons estimer le taux d'événement R attendu pour de telles expériences de faisceaux croisés. En particulier dans le cas de faisceaux croisés continus, le taux d'événement par seconde R peut s'exprimer comme [150] :

$$R = \sigma \frac{1}{F} \frac{I_1.I_2}{q_1.q_2} \frac{v_{rel}}{v_1 v_2 \sin\theta} \tag{4.3.1}$$

où :

— σ est la somme des sections efficaces des réactions possibles (excitation dissociative, ionisation, capture électronique) entre les deux faisceaux, dont les produits peuvent être identifiés par spectrométrie de masse (en m^2),

— I_1, q_1 et v_1 sont respectivement l'intensité (en A), la charge (en C) et la vitesse (en m/s) du faisceau projectile,

— I_2, q_2 et v_2 sont respectivement l'intensité (en A), la charge (en C) et la vitesse (en m/s) du faisceau cible,

— $v_{rel} = \sqrt{v_1^2 + v_2^2 - 2v_1 v_2 \cos\theta}$ est la vitesse relative des deux faisceaux,

— θ est l'angle entre les deux faisceaux.

— F est le facteur de forme (en m) et représente le recouvrement des faisceaux dans la dimension orthogonale au plan des deux faisceaux,

On montre que dans le cas de faisceaux coplanaires de profil gaussien dans la dimension orthogonale (z) au plan des faisceaux, le facteur de forme F peut s'exprimer par :

$$F = \sqrt{\sigma_{z1}^2 + \sigma_{z2}^2}\sqrt{2\pi} \tag{4.3.2}$$

où σ_{z1} et σ_{z2} sont les écarts types des distributions des profils du faisceau projectile et du faisceau cible respectivement. Ce facteur de forme se simplifie si l'un des faisceaux a un profil homogène sur une largeur $\overline{z}$ grande devant l'écart type de l'autre faisceau ($\overline{z} > 4\sigma_z$) et devient simplement F $= \overline{z}$.

De plus, dans notre cas les faisceaux se croisent à angle droit $\theta = 90°$ et la vitesse des ions du faisceau projectile est grande devant celle des ions cibles $v_1 \gg v_2$ (581 mm/μs pour des ions He^+ de 7 keV d'énergie cinétique contre $\sim$ 2,6 mm/μs pour des ions de m/q = 485 et de 17 eV d'énergie cinétique). Dans ces conditions on peut réécrire :

$$\frac{v_{rel}}{v_1 v_2 \sin\theta} \sim \frac{1}{v_2} \tag{4.3.3}$$

L'équation 4.3.1 devient alors :

$$R = \sigma \frac{1}{F} \frac{1}{v_2} \frac{I_1.I_2}{q_1.q_2} \tag{4.3.4}$$

R est ainsi inversement proportionnel à la vitesse des ions cibles. Ainsi dans notre cas malgré une intensité cible I_2 faible, l'utilisation d'ions cibles de basse énergie nous permet d'augmenter le taux d'interaction.

Cependant cette formule est valable pour des faisceaux continus et il nous faut l'adapter pour prédire un taux de collision en fonctionnement pulsé. Pour cela nous devons considérer deux points.

D'une part, la densité du paquet d'ions cibles doit être ramenée à une intensité de faisceau équivalente I_2^{eq} pour un faisceau continu. Elle peut être calculée comme le produit de la densité de charge linéique λ_q du paquet avec la vitesse moyenne des ions v_2. Ainsi pour un paquet cylindrique de section $S = \pi\ (\Delta r/2)^2$ (par symétrie cylindrique $\Delta r = \Delta x = \Delta z$) et de longueur Δy_2, et un nombre d'ions par paquet N_p, la densité d'ions ρ vaut $N_p/(S.\Delta y)$ et la densité de charge linéique s'exprime par :

$$\lambda_q = q_2.\rho \times S = q_2 \frac{N_p}{\Delta y_2} \tag{4.3.5}$$

L'intensité équivalente pour un faisceau continu est alors donnée par :

$$I_2^{eq} = \lambda_q \times v_2 = q_2 \frac{N_p}{\Delta y_2} \times v_2 \tag{4.3.6}$$

D'autre part, il faut prendre en compte, dans une seconde, le temps d'irradiation effectif du paquet d'ions cibles par le faisceau projectile, T_{eff}, pour pondérer l'intensité de faisceau projectile. En considérant que le facteur de forme F est constant pendant toute la durée du pulse projectile Δ_{proj}, alors T_{eff} est simplement le produit de Δ_{proj} et du nombre de cycles par seconde $N_{cycle} = 1/T_{cycle}$.

L'équation 4.3.4 devient alors dans le cas de faisceaux pulsés :

$$R = \sigma \frac{1}{F} \frac{1}{v_2} \frac{I_1 \times T_{eff}}{q_1} \frac{\lambda_q.v_2}{q_2} \tag{4.3.7}$$

$$= \sigma \frac{1}{F} \frac{I_1}{q_1} \frac{\Delta_{proj}}{T_{cycle}} \frac{N_p}{\Delta y_2} \tag{4.3.8}$$

Dans notre cas, le profil selon l'axe z du paquet d'ions cibles peut être approximé comme homogène sur une largeur $\overline{z_2}$ de 10 mm, ce qui est grand devant l'écart type du profil du faisceau projectile ($4\sigma_{z_1} = 6{,}5$ mm). Nous pouvons utiliser l'expression simplifiée du facteur de forme. L'équation devient alors :

$$R = \sigma \frac{1}{\overline{z_2}} \frac{I_1}{q_1} \frac{\Delta_{proj}}{T_{cycle}} \frac{N_p}{\Delta y_2} \tag{4.3.9}$$

En considérant que le processus de capture électronique est le processus dominant pour un faisceau projectile d'He^+ à 7 keV, nous utiliserons, pour le calcul de l'ordre de grandeur du taux d'événement attendu, la section efficace de 12.10^{-20} m^2 rapportée pour des collisions d'He^+ à 10 keV sur une cible de CH_4 [151]. Les données pour ce type de section efficace sont courantes dans la littérature pour des petites molécules neutres mais peu de données existent pour des molécules d'intérêt biologique protonées.

Ainsi, avec les paramètres expérimentaux suivants :

— faisceau projectile : $I_1 = 100$ μA, $q_1 = 1e$, $\sigma_{z1} = 1{,}6$ mm et $\Delta_{proj} = 3$ μs,

— faisceau cible : $N_p = 1{,}6.10^5$, $\Delta y_2 = 16$ mm (soit $I_2^{eq} = 1{,}6$ nA) et $\overline{z_2}$ 10 mm,

— $T_{cycle} = 200$ ms,

le calcul du taux d'événements attendus nous donne R = 1,1 événements par seconde, soit 0,22 événement par cycle de collisions. Toutefois, pour considérer le nombre d'événements détectés $R_{dét}$ sur le DSP_{tof}, nous devons prendre en compte l'efficacité de détection des galettes à micro-canaux ($\varepsilon_{géo} = 0{,}55$) ainsi que la transmission des quatre grilles (76 % de transmission chacune) sur le parcours des ions dans le tube de temps de vol. Le taux d'événement détecté en est réduit d'un facteur ~ 5 et est de l'ordre de :

$$R_{dét} \simeq 0{,}2 \text{ coups par seconde (0,05 événements par cycle).}$$

Cette faible valeur traduit que le temps d'irradiation effectif est l'un des points faibles de ce dispositif et met en évidence que les caractéristiques du paquet d'ions doivent être optimales (volume le plus petit possible) pour atteindre des taux d'événements acceptables. Le faible taux de comptage attendu nécessite de pouvoir limiter les sources de bruit pour assurer un bon rapport signal/bruit. Quelques méthodes peuvent être mises en place expérimentalement pour réduire ce bruit, mais une part importante peut se faire par la soustraction des différentes contributions lors de l'analyse des résultats.

4.3.3 Résultats

Compte tenu de la faible densité des paquets d'ions cibles dans la zone d'interaction et donc de la faible probabilité d'interaction, il est d'autant plus important de réduire toutes les sources de bruit de fond. En plus des différentes méthodes envisagées pour réduire le bruit de fond, il est possible de faire l'acquisition de spectres de temps de vol indépendants pour prendre en compte et soustraire chaque contribution au bruit de fond. Dans cette section, nous allons

donc présenter ce mode de fonctionnement en quatre cycles puis les résultats d'une expérience de faisceaux croisés analysés avec cette méthode.

4.3.3.1 Cycle d'acquisition

Plusieurs sources de bruit sont à l'origine de la pollution des spectres de collisions. On considère comme *bruits* toutes les contributions d'un spectre de temps de vol qui ne sont pas des produits de l'interaction cible/projectile. Ces sources de bruit peuvent être séparées en trois catégories :

— Les *pollutions* du paquet d'ions cibles, notamment les fragments de la molécule parent produits par collisions avec le gaz résiduel (CID) à l'extraction du piège et/ou pendant le transport jusqu'à la ZI.

— Le *gaz résiduel* ionisé par le faisceau projectile lors de son passage dans la zone d'interaction.

— Le *bruit de fond* généré par les particules neutres issues de la source ECR (par exemple les photons de désexcitation de l'He et l'He^+, voir section 4.3.3.2).

De manière à isoler et comptabiliser les contributions de chacune de ces sources pour les soustraire aux spectres de collisions nous avons recours à un fonctionnement en quatre temps, comme schématisé en figure 4.3.1. Ce fonctionnement permet l'acquisition de quatre jeux de données :

1. Les faisceaux cibles et projectiles se croisent dans la zone d'interaction : spectre de **collision**, contenant les fragments issus de la collision et toutes les sources de bruits.

2. Le faisceau projectile seul traverse la zone d'interaction : spectre **projectile** contenant le *gaz résiduel* et le *bruit de fond*.

3. Le faisceau cible est seul dans la zone d'interaction : spectre **cible** contenant la molécule parent cible et les *pollutions*, ainsi que le *bruit de fond*.

4. Aucun des faisceaux ne traverse la zone d'interaction : spectre **neutre**, contenant uniquement le *bruit de fond*.

De plus, l'acquisition cyclique de ces spectres nous permet de ne pas être sensible aux variations dans le temps de l'intensité des sources d'ions cibles et projectiles. Ceci ne serait pas possible en réalisant simplement de longues acquisitions indépendantes pour déterminer les contributions de chaque source de bruit.

Ainsi, pour obtenir le spectre des produits de la collision uniquement, les spectres **(2)** et **(3)**, respectivement du **projectile** et de la **cible**, doivent être soustrait au spectre **collision (1)**. En soustrayant ces deux spectres, la contribution des **neutres**, présent dans chaque spectre, est alors soustraite deux fois. Il faut donc additionner le spectre **(4)** pour obtenir le spectre final.

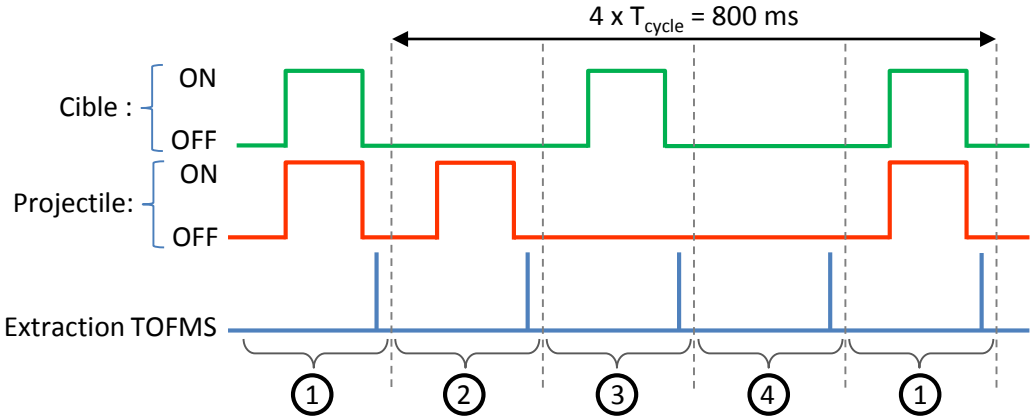


Figure 4.3.1 : *Schématisation du principe de l'acquisition en quatre cycles successifs. L'extraction du contenu de la zone d'interaction dans le TOFMS a lieu à chaque cycle et permet l'enregistrement des données dans quatre configurations différentes :* ***(1) collision*** *(cible + projectile),* ***(2) projectile*** *(projectile seul),* ***(3)*** *:* ***cible*** *(molécule parent et pollution) et* ***(4) neutre*** *(aucun faisceau).*

4.3.3.2 Collision entre un faisceau d'He$^+$ à 7 keV et une cible de kanamycine protonée

Nous allons aborder ici les méthodes du traitement des données obtenues avec le DSP$_{TOF}$ nous permettant d'analyser le contenu des spectres de masse. Les résultats de quatre heures d'acquisition d'une expérience de collision entre un faisceau d'He$^+$ de 7 keV d'énergie cinétique et des ions cibles de kanamycine à 17 eV sont présentés. Une tension d'extraction V_1 de 4 kV et une angle θ de -1° ont été utilisés. Pour cette expérience, ni le refroidissement de la zone d'interaction à l'azote liquide, ni la pompe à sublimation de titane n'ont été utilisés.

La figure 4.3.2 présente les quatre spectres acquis avec la méthode décrite précédemment : **cible**, **projectile**, **neutre** et **collision**. Le pic parent (m/q = 485) présente un pic très intense à 39,2 μs. Deux contributions peuvent être distinguées sur le spectre de collision. En dessous de 16 μs, le spectre est dominé par la contribution du gaz résiduel et au delà, par le contenu du spectre cible. Nous détaillerons ces différentes structures par la suite. La gamme de temps de vol comprise entre 0 et 5 μs (inférieure à m/q = 5,5) est volontairement exclue de la gamme d'acquisition des données car il ne contient que le pic intense de l'He$^+$ (voir figure 4.2.25).

Pour calibrer ce spectre selon le rapport masse-sur-charge, nous avons utilisé les pics correspondants à N$^+$ et O$^+$ (respectivement 6,60 et 7,02 μs) ainsi que le temps de vol de l'ion parent, obtenu avec précision lors d'une acquisition séparée, avec un bas taux de comptage (quelques ions par paquet, comme présenté dans la section 4.2.4.2). Pour avoir un point intermédiaire, nous pouvons utiliser le pic à 31,51 μs correspondant à un rapport m/q de 324. Dans une précédente expérience, nous avons identifié que ce pic est un fragment de la kanamycine par CID [145]. La calibration est obtenue en ajustant ces points par une fonction polynomiale d'ordre 2 (figure 4.3.3).

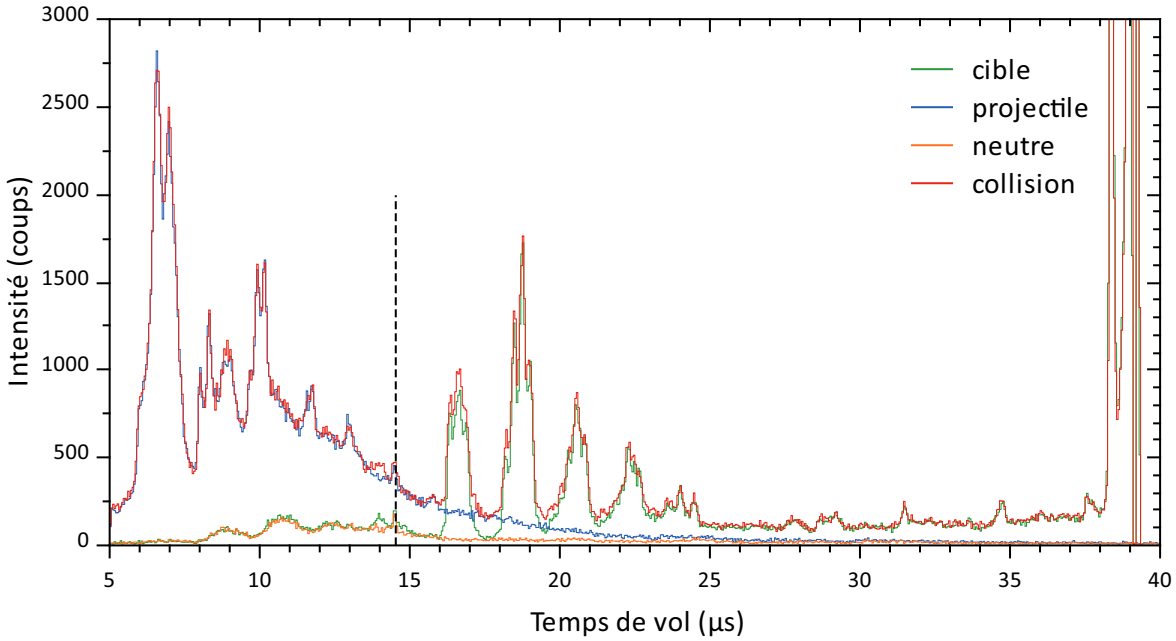


Figure 4.3.2 : *Spectres de temps de vol* ***cible****,* ***projectile****,* ***neutre*** *et* ***collision*** *pour un faisceau projectile d'He$^+$ à 7 keV et une cible de kanamycine protonée de 17 eV d'énergie cinétique (V_1 = 4 kV et θ = -1°). La ligne pointillée indique un bruit électronique produit par la fin de l'application de la tension du champ d'extraction du spectromètre.*

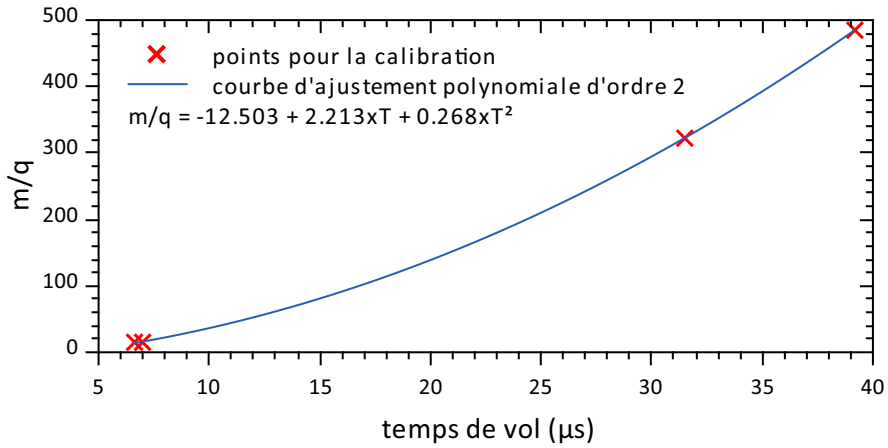


Figure 4.3.3 : *Calibration en masse à partir des pics N$^+$ (14 u.m.a) et O$^+$ (16 u.m.a), du pic parent (485 u.m.a) et d'un fragment de la kanamycine (324 u.m.a).*

En plus des informations obtenues à partir des spectres de temps de vol, la position d'impact des ions sur le détecteur nous apporte des données supplémentaires importantes pour identifier les différentes structures observées. La figure 4.3.4 présente les images d'impacts des ions pour chacun des quatre spectres obtenus (le pic parent est exclu pour la reconstruction de l'image). L'utilisation de ces images brutes ne nous donne que peu d'informations. D'une part, nous

pouvons observer qu'une majorité des ions arrivent sur le bord inférieur du détecteur (Y = -40 mm), ce qui est cohérent avec le fait que le détecteur soit décentré selon cet axe par rapport au centre de la zone d'interaction. D'autre part, la symétrie le long de l'axe y autour de X = 0 mm nous confirme que le spectromètre est « correctement » aligné selon cet axe.

Une manière d'obtenir plus d'informations est de représenter la position d'impact d'un ion en fonction de son temps de vol (ou rapport m/q), séparément pour chacun des axes x et y. Nous utiliserons ces informations par la suite pour expliquer l'origine des structures présentes dans chaque spectre.

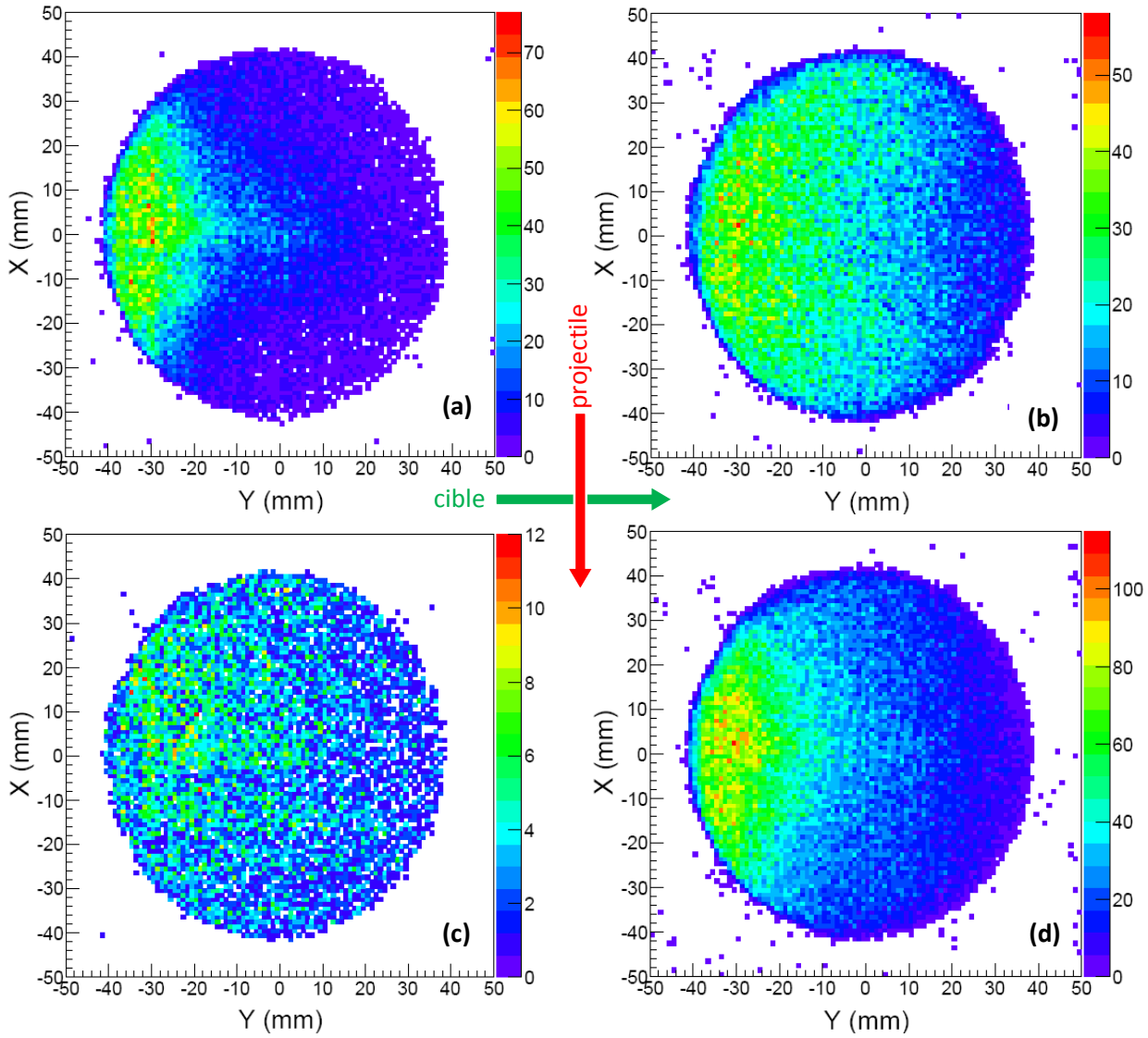


Figure 4.3.4 : *Position d'impact des ions sur le DSP_{tof} pour les spectres :* ***(a) cible***, ***(b) projectile***, ***(c) neutre*** *et* ***(d) collision****. La trajectoire initiale des ions cibles (flèche verte) selon l'axe Y va de gauche à droite et celle des ions projectiles (flèche rouge) selon l'axe X va du haut vers le bas.*

Spectres projectile et neutre

Pour rappel, pour cette expérience l'angle du spectromètre est tel que nous ne détectons pas la majorité des ions du gaz résiduel, mais seulement ceux qui fragmentent avec une vitesse positive selon l'axe y (voir section 4.2.4). La contribution du gaz résiduel domine largement le spectre de collision pour les temps de vol inférieurs à 16 μs (m/q $<$ 80). Le spectre **projectile** (figure 4.3.5) montre de nombreuses structures dont les deux pics majoritaires, identifiés précédemment dans la section 4.2.4, sont attribués aux ions N^+ et O^+. Les rapports m/q des autres pics sont notés sur la figure 4.3.5. Ces pics ne sont pas attribués mais compte tenu de leur masse ils ne correspondent pas, a priori, à des molécules du gaz résiduel. Ces ions pourraient provenir de matière pulvérisée depuis les surfaces frappées par le faisceau (iris, cage de faraday). On note que le pic d'hélium ionisé n'apparaît pas ici dans la gamme de masse étudiée pour ces spectre.

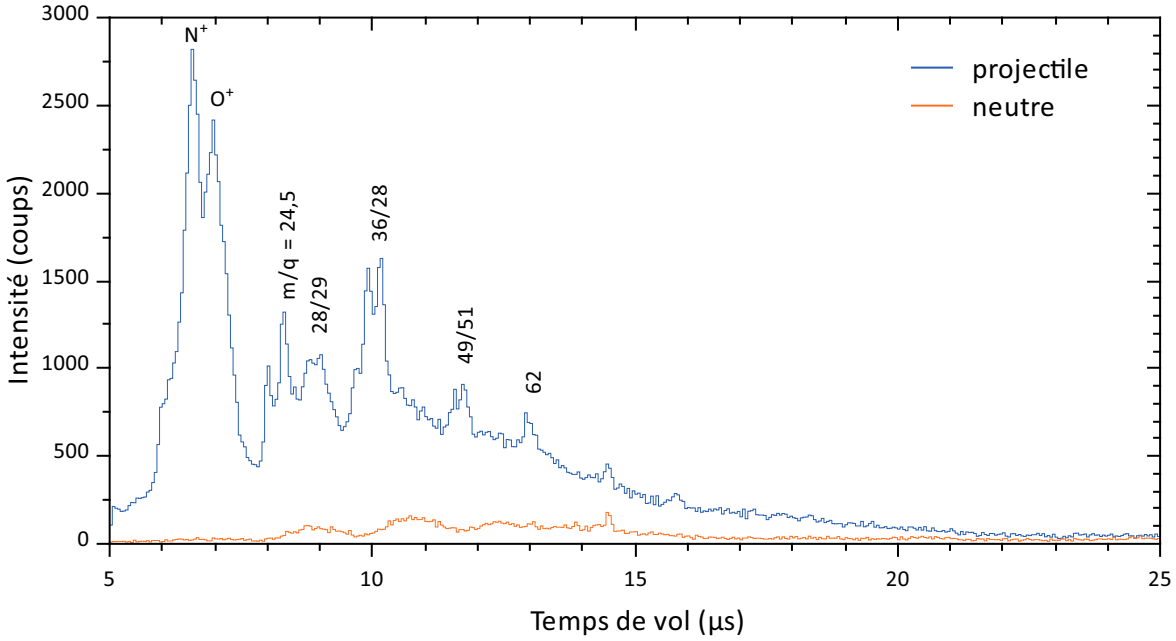


Figure 4.3.5 : *Spectres **projectile** et **neutre** dans la gamme de temps de vol comprise entre 5 et 25 μs (m/q $<$ 210).*

La figure 4.3.6 nous donne des informations supplémentaires intéressantes sur cette partie du spectre. Par exemple dans l'axe x (axe du passage du faisceau projectile), les ions N^+ et O^+ occupent toute la largeur du détecteur, ce qui est cohérent avec l'ionisation du gaz résiduel le long du passage du faisceau projectile dans la zone d'interaction. De plus, en considérant que le faisceau traverse bien la ZI en $Y_{DSP} = 0$, nous pouvons estimer grossièrement l'énergie cinétique moyenne des ions du gaz résiduel selon leur position moyenne d'impact sur le détecteur selon y (axe du faisceau cible). Par exemple pour O^+ ($O_2{}^{2+} \longrightarrow O^+ + O^+$), la position moyenne des ions selon y est de -20 mm par rapport au centre du détecteur, soit $Y_{DSP} = 60$ mm. À partir de

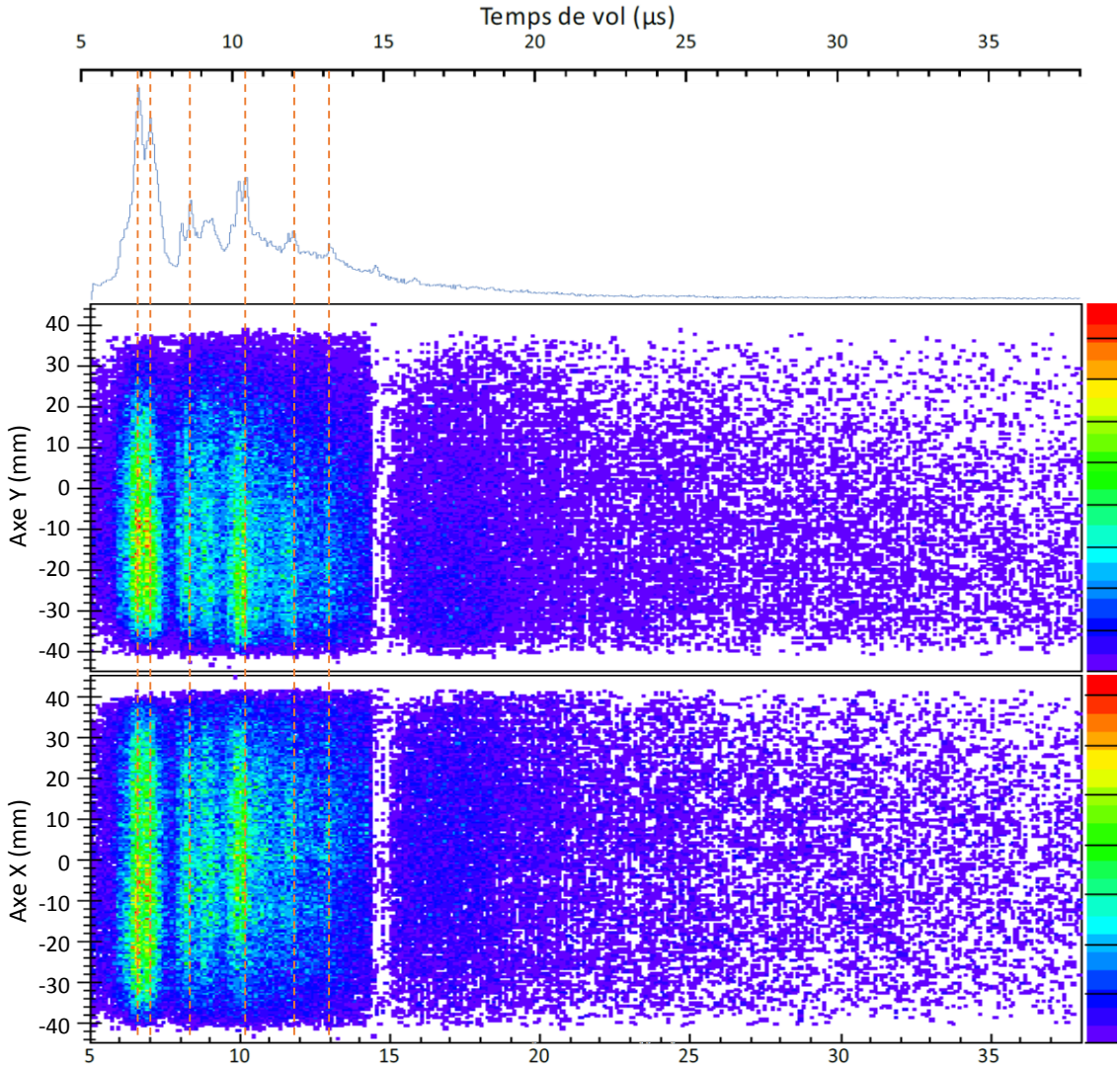


Figure 4.3.6 : *Représentation de la position d'impact des ions, suivant les axes Y et X, en fonction de leur temps de vol, dans la configuration* ***projectile****.*

l'équation 4.2.15 (section 4.2.4) et en considérant le décalage dû à l'angle θ de -1° (-24 mm), l'énergie cinétique moyenne de l'ion est d'environ 12 eV.

Le spectre **neutre** présente un fond peu intense sans structure résolue, dont la partie la plus intense est comprise entre 8 et 15 μs. L'origine de ce bruit de fond a pu être définie en observant que cette contribution disparaît lorsque la source ECR du faisceau projectile est éteinte ou lorsqu'un obstacle physique est interposé sur la ligne du faisceau projectile, entre la source ECR et la zone d'interaction (cage de faraday escamotable, vanne d'isolement entre la ligne projectile et la zone d'interaction). Ce spectre est donc généré par des particules neutres provenant de la source ECR. En effet, au sein de la source ECR peuvent être produits un grand nombre de particules neutres dont des photons X. L'extraction de cette source étant dans l'axe de la zone d'interaction, les particules neutres comme les photons peuvent traverser

la ligne de faisceau projectile jusqu'à la zone d'interaction ; elles ne sont en effet pas affectées par la haute tension du déviateur électrostatique permettant de bloquer les ions chargés du faisceau projectile. Ces photons sont alors susceptibles de ioniser les particules du gaz résiduel à tout moment. En l'absence du champ d'extraction ces ions peuvent diffuser librement dans les zones d'extractions et d'accélérations du spectromètre. Ainsi lorsque le champ d'extraction est appliqué, ces ions sont extraits et accélérés depuis un volume très large dans la zone d'interaction. Par conséquent la résolution en temps de vol pour ces ions est extrêmement basse et est l'origine de l'absence de structures résolues sur ce spectre.

On notera qu'au delà de 25 μs (m/q = 210), le spectre de gaz résiduel ne contient plus que la contribution des ions du bruit de fond.

Spectre cible : origine des pollutions

Le spectre **cible** devrait contenir uniquement le pic parent, cependant comme le montre la figure 4.3.2, ce spectre contient aussi de nombreuses pollutions qui représentent la majeure contribution du spectre de collision au delà 16 μs (m/q $>$ 80). Trois parties peuvent être distinguées : la région de temps de vol inférieur à 16 μs provient essentiellement de la contribution du bruit de fond (spectre **neutre**), la région de temps de vol compris entre 16 et 26 μs (m/q compris entre 80 et 220) est composée de cinq structures intenses, et enfin celle au delà de 25 μs est composée de quelques pics peu intenses et du pic parent. Nous allons décrire séparément ces deux dernières régions.

Les cinq structures intenses dans la région de temps de vol compris entre 16 et 26 μs sont une importante source de pollution du spectre dans une région où nous pouvons nous attendre à observer des fragments de la molécule cible. La figure 4.3.7 nous montre que ces ions sont centrés sur le détecteur dans l'axe x, mais impactent le bord inférieur du détecteur selon y. Un test avec une molécule parent différente a montré que ces cinq mêmes structures sont aussi présentes mais à des rapports m/q décalés, par exemple inférieurs lorsque la molécule parent a une masse plus faible que la kanamycine. Ceci nous montre que ces structures ne sont pas des fragments de la molécule parent.

Des tests supplémentaires nous ont permis de déterminer l'origine de ces structures. Notamment, pour V_1 = 4 kV, nous avons observé que leur intensité est fortement réduite en appliquant une tension U_G égale ou supérieure à 2800 V sur une grille placée devant le détecteur (figure 4.3.8). Ces ions ont donc une énergie inférieure à celle des ions parents (V_{ZI} = 0,92$\times V_1 \simeq$ 3,7 kV), ce qui suggère qu'ils ne sont pas créés au centre de la zone d'interaction. En supposant que ces ions sont créés au repos et à un certain potentiel électrique définissant leur énergie cinétique, nous pouvons déduire qu'ils sont créés sur la grille séparant les champs électriques $\vec{E_1}$ et $\vec{E_2}$ de la zone d'extraction/accélération du TOFMS, où un potentiel V_2 égal à environ 0,68$\times V_1$, soit environ 2720 V, est appliqué. En effet, au moment de l'application du champ d'extraction, le paquet d'ions cibles, contenant jusqu'à quelques 10^5 ions, est accéléré et possède une énergie cinétique de environ 1 keV au niveau de cette grille. À leur passage,

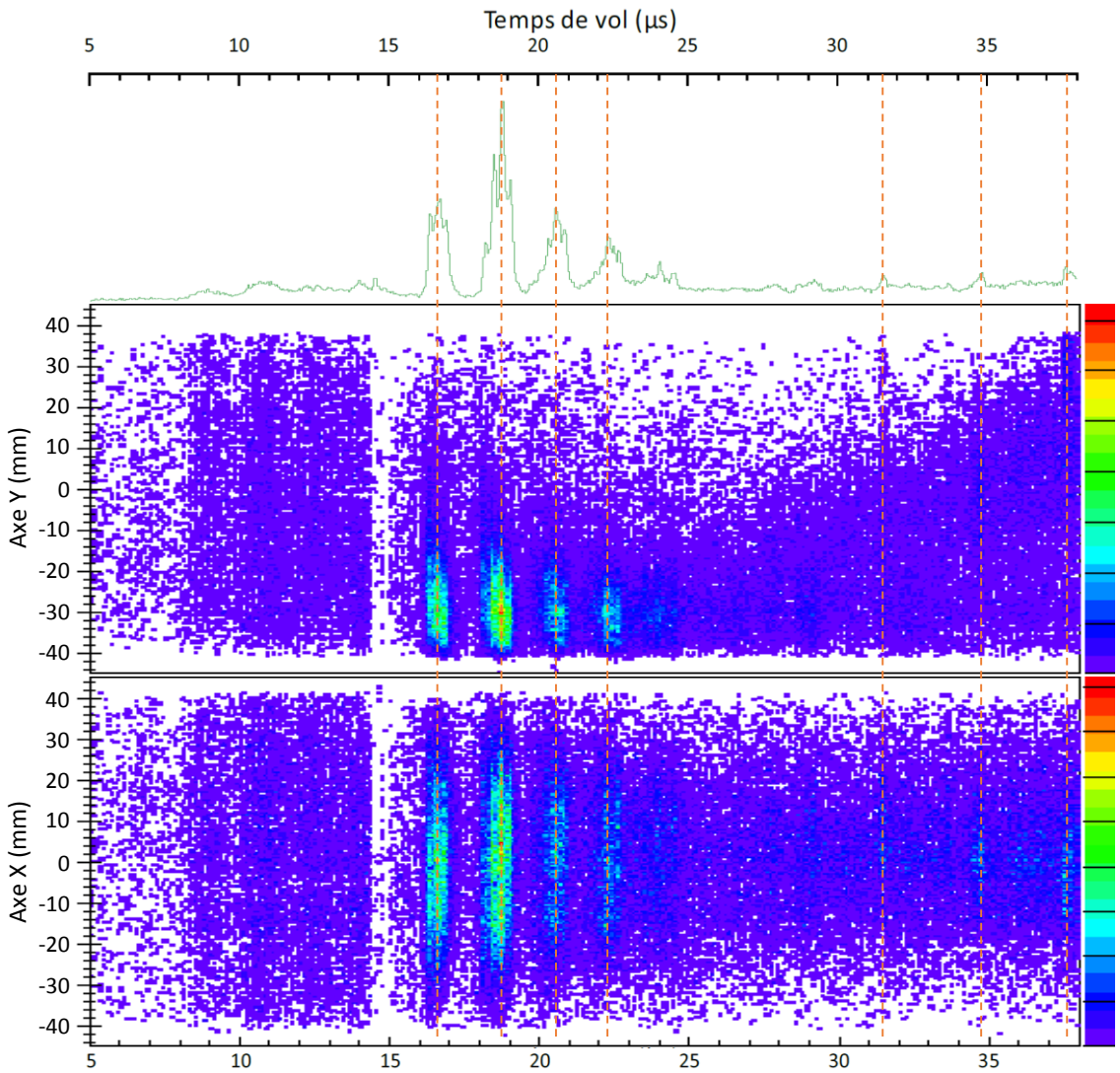


Figure 4.3.7 : *Représentation de la position d'impact des ions, suivant les axes Y et X, en fonction de leur temps de vol, dans la configuration* ***cible****.*

ceux-ci sont susceptibles de pulvériser de la matière de la surface de cette grille. Des ions ainsi produits sont accélérés par le potentiel V_2. En prenant en compte le temps de vol des ions parents jusqu'à cette grille, nous pouvons estimer les masses correspondantes de ces différentes structures, noté sur la figure 4.3.8. On peut noter que ces masses sont très proches des pics non attribués du spectre de gaz résiduel (figure 4.3.5), ce qui apparaît cohérent avec notre attribution à des molécules pulvérisées depuis des surfaces dans la zone d'interaction. On peut noter que la seconde grille séparant les zones d'accélération et de vol libre étant connectée à la masse, les ions créés sur cette grille se sont pas accélérés vers le détecteur et ne contribuent pas au bruit de fond.

La seconde région du spectre présente quelques pics de faibles intensités. Contrairement aux structures provenant des grilles, ces ions ne sont pas affectés par la tension U_G (figure

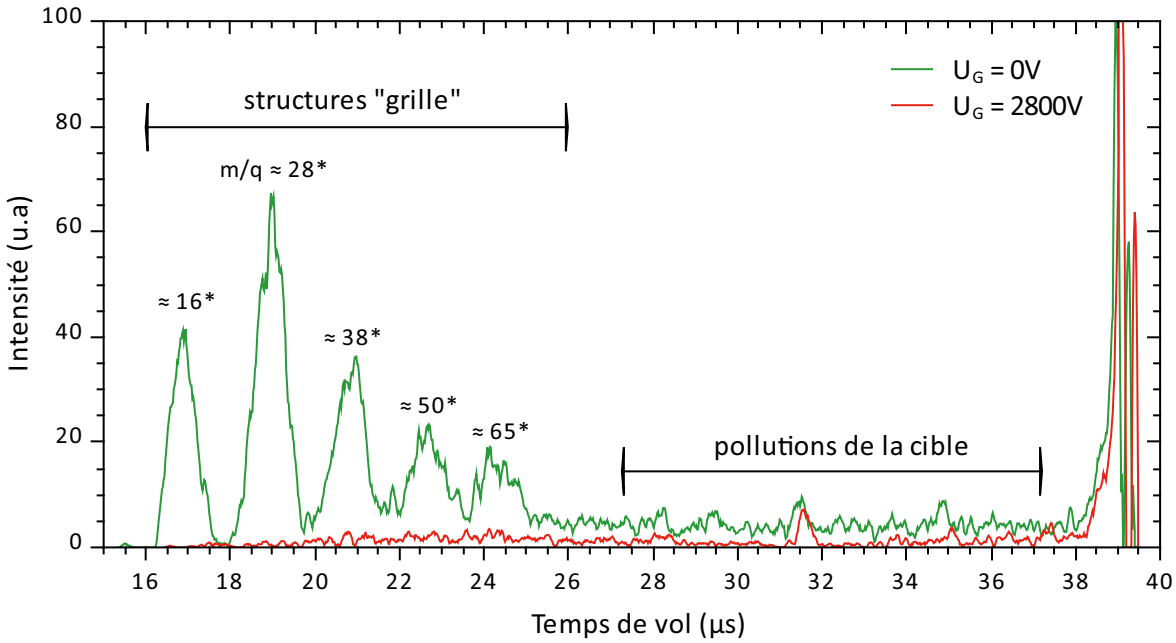
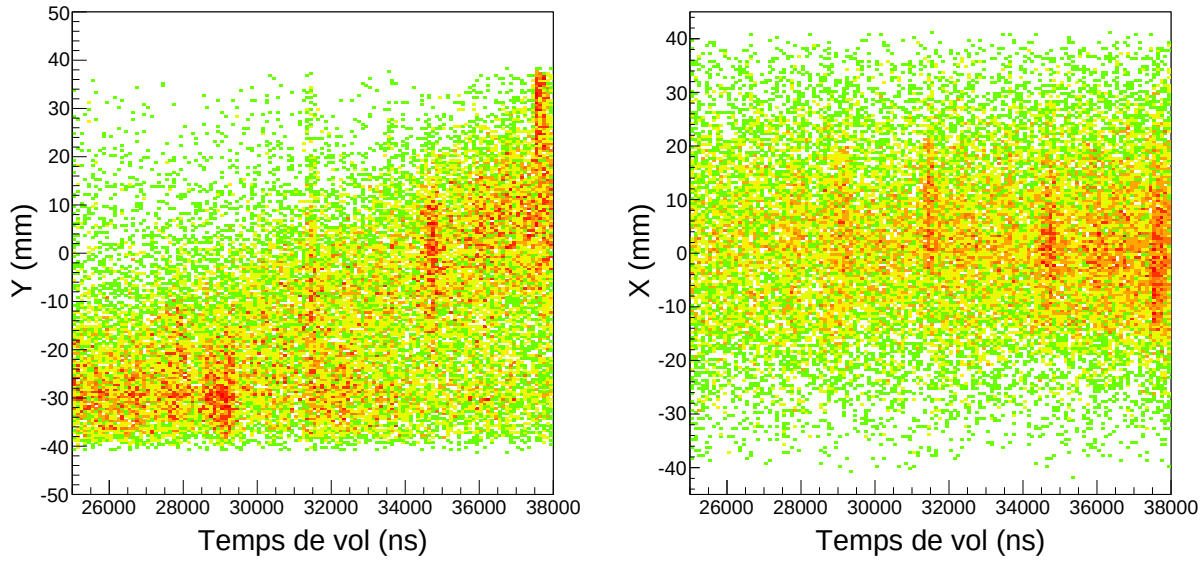


Figure 4.3.8 : *Spectres de temps de vol acquis sur le DSP_{tof} pour un paquet d'ions de kanamycine protonée de 15 eV d'énergie cinétique avec une tension d'extraction V_1 = 4 kV et un angle du spectromètre $\theta \simeq$ -1°. La tension U_G = 2800 V (spectre rouge) permet de supprimer les structures provenant de la grille du spectromètre séparant les champs $\vec{E_1}$ et $\vec{E_2}$.*

4.3.8), ce qui nous indique qu'ils sont à priori présents dans la zone d'interaction au moment de l'extraction. La distribution de la position en X de ces ions sur le détecteur (figure 4.3.9) est moins large que les ions du gaz résiduel ou des grilles, et celle en Y, plus centrée sur le détecteur que ces structures, nous indique que ces ions possèdent une certaine vitesse initiale selon y. Des expériences supplémentaires ont montrés que l'intensité de ces pics varie avec les paramètres d'extraction du piège (pression, valeur de champ d'extraction, tensions sur la première électrode de l'optique de guidage en sortie du piège). Tout ceci nous confirme que ces pics sont des fragments de la molécule parent formés par CID sur la gaz tampon pendant l'extraction du piège. Ceux-ci peuvent être présents dans la zone d'interaction au moment de l'application du champ d'extraction du spectromètre et donc être détectés.

Ces fragments de CID représentent une source de pollution importante car les mêmes fragments issus de l'interaction avec le faisceau projectile sont susceptibles d'être créés. Par exemple pour la kanamycine, le fragment observé à 31,5 μs (m/q = 324) correspond à la perte d'une sucre (161 Da) de la molécule [145]. Pour qu'un fragment de l'interaction ait une part significative de l'intensité d'un tel pic, il est nécessaire que le taux de comptage du pic de pollution ne soit pas grand devant le taux de comptage attendu pour les expériences de collision (section 4.3.2). À partir de l'expérience présentée en figure 4.3.8, nous pouvons estimer que le taux de comptage dans le pic à 31,5 μs du spectre **cible** est de environ 0,08 coups détecté par cycle soit, en prenant compte l'efficacité de détection et la transmission des grilles, environ 0,5



(a) **(b)**

Figure 4.3.9 : *Représentation de la position d'impact des ions, suivant les axes Y et X, en fonction de leur temps de vol, dans la configuration* ***cible****. Zoom dans la région 26 - 38 μs.*

ion par paquet dans la ZI. En comparant cette valeur à $\sim 10^5$ ions cibles dans un paquet, cela donne un rapport pollution-sur-cible inférieur à 10^{-5}. Toutefois, malgré la grande pureté de la cible, cette valeur de comptage est du même ordre de grandeur que le taux de comptage pour les fragments produits par collision avec le faisceau projectile (calculé précédemment).

Identification des fragments de la collision

En résumé, grâce à la méthode d'acquisition en quatre temps mise en place et à l'analyse de la position d'impact des ions sur le détecteur, nous avons identifié quatre sources importantes de pollution du spectre de collision. Le spectre **projectile** comporte des pics produits par une fragmentation énergétique des molécules du gaz résiduel, émis dans le transverse vers le détecteur avec une vitesse v_y positive, ainsi que des structures que nous attribuons à des ions pulvérisés depuis des surfaces proches de la zone d'interaction. La contribution des molécules du gaz résiduel doit pouvoir être réduite en améliorant le vide dans l'enceinte de la zone d'interaction. Le spectre **neutre** est dû à l'ionisation des molécules du gaz résiduel par des particules neutres émises depuis la source ECR. Le spectre **cible** présente des structures intenses générées par la pulvérisation de matière sur une grille. Cette source de pollution peut être largement réduite en appliquant une tension adaptée devant le détecteur. Enfin, ce spectre présente des pics peu intenses attribués à des fragments de la molécule parent, produit par CID lors de l'extraction du piège. Cependant, comme de « vrais » fragments de la collision sont susceptibles d'être détectés aux mêmes rapports m/q et que le taux de comptage des

pollutions dans ces pics est du même ordre de grandeur que le taux de comptage attendu pour les expériences de collision, il est nécessaire de travailler à l'optimisation des paramètres d'extraction du piège pour réduire cette source de pollution.

Pour conclure sur la présence de fragments issus de la collision entre le faisceau projectile d'He^+ et la cible de kanamycine protonée, nous devons soustraire les différents spectres de bruit au spectre de collision. La figure 4.3.10 nous permet de comparer les spectres soustraits de [collision - gaz résiduel] et de [cible - bruit de fond]. Sur la grande majorité de la gamme de m/q, aucun surplus n'est présent dans le spectre de collision, dû à l'absence de fragment ou à une statistique insuffisante. Toutefois, une structure à $m/q = 17$ se détache dans le spectre de collision, qui pourrait être le produit de l'interaction entre les deux faisceaux. Ce pic pourrait correspondre à NH_3^+ ou OH^+, qui sont des petits fragments pouvant être formés dans la kanamycine. De plus, le taux de comptage dans ce pic est de environ 0,04 coups par cycle, ce qui est de l'ordre de grandeur du taux calculé attendu. Cependant pour confirmer, ou infirmer, que ce pic correspond réellement à un fragment issu de la collision, des expériences dans de meilleures conditions (refroidissement de la zone d'interaction, pompe à sublimation de titane, tension U_G appliquée) avec des acquisitions plus longues doivent être réalisées.

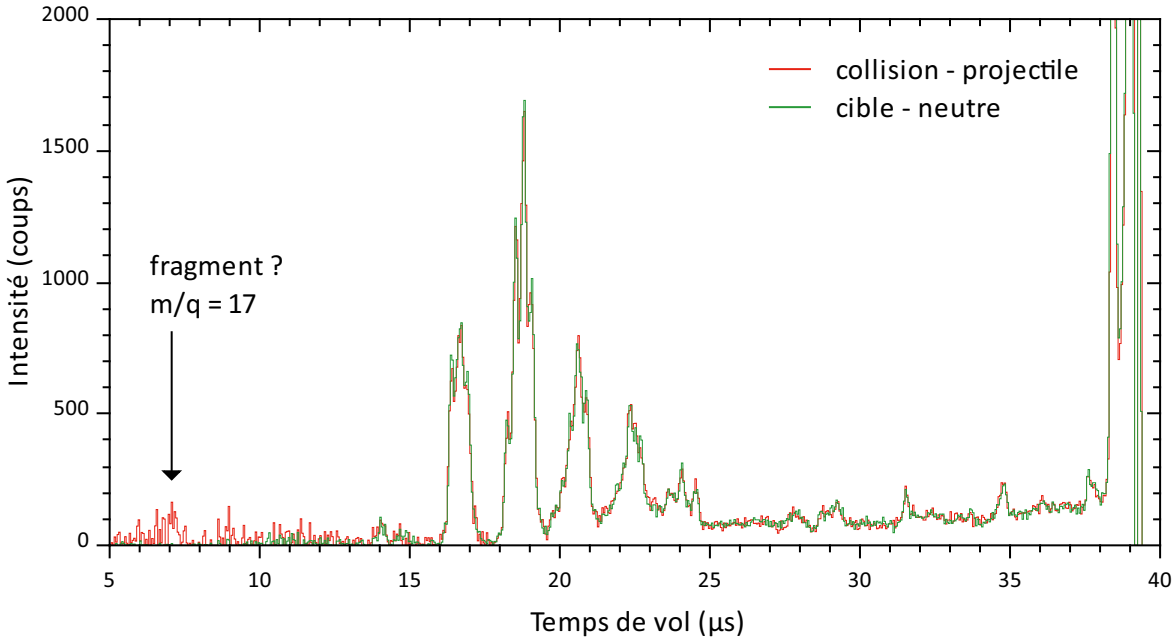


Figure 4.3.10 : *Comparaison des spectres soustraits [collision - gaz résiduel] et [cible - bruit de fond].*

4.4 Conclusion

Le dispositif PIBALE a pour objectif d'étudier l'interaction d'un ion atomique avec une molécule d'intérêt biologique isolée ou environnée, sélectionnée en masse. La spectrométrie de masse à temps de vol et la détection des fragments cationiques en coïncidences sont deux techniques qui nous permettront d'explorer les processus de fragmentation qui suivent cette interaction. Cependant, la faible densité de cible et le faible taux de comptage attendus pour ces expériences posent un challenge expérimental.

Au cours de ces trois années de thèse, le développement et la caractérisation de PIBALE se sont principalement portés sur l'augmentation de la production d'ions cibles, l'optimisation du piégeage et des caractéristiques des paquets d'ions dans la zone d'interaction, les propriétés du spectromètre de masse à temps de vol et la synchronisation des faisceaux.

En particulier, l'amélioration et la caractérisation du funnel a permis d'augmenter d'un facteur trois l'intensité du faisceau de molécules cibles en amont du piège et d'identifier les points clefs pour la réalisation d'un nouveau funnel avec de meilleures performances.

L'étude des propriétés des nuages d'ions constitue une importante partie de ce travail de thèse. Nous avons ainsi mis en avant l'effet de la charge d'espace sur les caractéristiques du nuage et quantifié le nombre maximum d'ions pouvant être accumulés ainsi que le volume du nuage dans le piège. De plus, tous les paramètres d'injection et d'extraction du pièges ont été optimisés pour réduire la fragmentation des molécules dans le gaz résiduel et ainsi limiter les pollutions de la cible transférées vers la zone d'interaction.

Par ses propriétés, le spectromètre de temps de vol nous permet de positionner le gaz résiduel hors de la zone de détection. Nous avons souligné que l'utilisation de ce spectromètre et la détection des fragments de collisions entraînent certaines contraintes quant à l'énergie cinétique des ions cibles, à la valeur du champ d'extraction et à l'angle du spectromètre.

Enfin, l'identification des différentes sources de bruits sur les spectres de collisions, les différentes solutions mises en place pour les limiter ainsi que la méthode d'acquisition en quatre temps font partie des éléments clefs nécessaires à la réussite de ces expériences malgré le faible taux d'événements attendu. Cependant, des expériences dans de meilleures conditions (vide résiduel plus bas, limitation de la détection des pollutions des grilles, acquisition plus longue) doivent encore être réalisées afin de confirmer la détection des produits d'une collision.

Étude de la stabilité de peptides de collagène après photo-absorption

5

Sommaire

5.1 Présentation 130

5.1.1 Contexte scientifique 130

5.1.2 Faits marquants 133

5.1.2.1 Photo-excitation vibrationnelle par photon Infra-Rouge . . . 134

5.1.2.2 Photo-excitation électronique par photon UV 134

5.1.2.3 Photo-ionisation et photo-excitation par photon VUV et X . 137

5.1.3 Dispositifs expérimentaux 140

5.1.3.1 Dispositif pour les expériences de photo-absorption UV . . . 140

5.1.3.2 Dispositif pour les expériences de photo-absorption VUV et X 142

5.1.4 Nomenclature pour les fragments peptidiques 146

5.2 Stabilité d'une séquence peptidique du collagène 146

5.2.1 Séquence peptidique du collagène PK26-P et PK26-Hyp 147

5.2.2 Dissociation induite par photon UV 149

5.2.2.1 Peptide $[PK26\text{-}P+3H]^{3+}$ 149

5.2.2.2 Peptide $[PK26\text{-}P+4H]^{4+}$: influence de l'état de charge . . . 152

5.2.2.3 Peptides PK26-Hyp : influence de l'hydroxylation 154

5.2.3 Ionisation et dissociation induites par photon VUV et X 155

5.2.3.1 Peptide $[PK26\text{-}P+3H]^{3+}$ 155

5.2.3.2 Peptide $[PK26\text{-}P+4H]^{4+}$: influence de l'état de charge . . . 162

5.2.3.3 Peptides PK26-Hyp : influence de l'hydroxylation 164

5.3 Stabilité d'un modèle de la triple hélice du collagène 167

5.3.1 Peptide modèle de la triple hélice du collagène $((PPG)_{10})_3$ 167

5.3.2 Ionisation et dissociation du monomère $(PPG)_{10}$ 168

5.3.2.1 Peptide $[(PPG)_{10}+3H]^{3+}$, de 12 à 28 eV 169

5.3.2.2 Peptide $[(PPG)_{10}+2H]^{2+}$, à 150 et 288 eV 172

5.3.3 Ionisation et dissociation du modèle de triple hélice $((PPG)_{10})_3$ 174

5.4 Conclusion 178

Ce chapitre est dédié aux expériences de photo-absorption réalisées sur des peptides de collagène en phase gazeuse. Ce travail représente le fruit des différentes collaborations construites au cours de ces trois années de thèse. Dans une première partie, le contexte scientifique de cette étude et certains faits marquants sur la photo-absorption de peptides et de protéines en phase gazeuse seront développés. Ensuite, après une description des dispositifs expérimentaux utilisés pour cette étude, les résultats sur la photo-absorption d'une séquence peptidique du collagène seront présentés. Enfin, nous discuterons des récents résultats obtenus sur l'irradiation d'un modèle de la triple hélice de collagène.

5.1 Présentation

Ce travail thématique autour du collagène s'articule autour de la recherche en radio et hadron-thérapie. Le collagène est la protéine structurale la plus abondante dans le corps humain. De ce fait, elle joue un rôle important dans les effets indirects et les complications à long termes liés à ce type de traitement dont l'arthrose articulaire (dégradation du cartilage) radio-induite tardive est l'une des séquelles connues de la radiothérapie conventionnelle. Cette étude a été motivée par une collaboration interdisciplinaire au sein du laboratoire CIMAP entre les équipes de recherche AMA (physique moléculaire), MADIR (radiochimie de la matière organique) et LARIA (radiobiologie de tissus d'intérêt médical). L'objectif est de mettre en évidence des molécules libérés par la matrice extra-cellulaire ou sécrétés par les cellules après irradiation par des rayonnements ionisants et pouvant induire un stress cellulaire. Notamment, l'un des objectifs de ce projet est d'irradier des protéines de collagène avec des faisceaux d'ions sur le dispositif PIBALE.

Dans le cadre de ce projet, nous nous intéressons à des peptides de collagène irradiés avec des photons sur une large gamme d'énergie afin d'en étudier certains processus physico-chimiques fondamentaux et de pouvoir, par la suite, comparer ces résultats avec ceux obtenus après irradiation par des ions. Nous avons ainsi amorcé de nouvelles collaborations avec les groupes de Philippe Dugourd (Institut Lumière Matière, Lyon, France) et Thomas Schlathölter (Zernike Institute for Advanced Materials, Groningen, Pays-Bas) pour étudier la photo-absorption de peptides de collagène par photons UV, VUV et X.

5.1.1 Contexte scientifique

Effets indirects : modifications radio-induites de la matrice extra-cellulaire

Le chondrosarcome est un cancer du cartilage qui représente 20 % des cas de tumeurs de l'os chez l'adulte. Sa faible teneur en oxygène (hypoxie) le rend naturellement radio- et chimio-résistant. Cette tumeur est un bon candidat pour les traitements par hadron-thérapie qui allient efficacité balistique et thérapeutique, et qui présentent une alternative à la chirurgie extensive, toujours invalidante.

Parmi les différents types de cartilage, le cartilage articulaire est le plus répandu dans le corps humain. On le trouve aux extrémités des os et sa fonction principale est de permettre leurs mouvements sans friction ni choc. La capacité d'absorption des chocs par le cartilage articulaire est directement liée à la structure et à la composition de la matrice extracellulaire qui le compose. Cette matrice est majoritairement constituée d'un réseau dense et hautement organisé de protéines structurantes spécifiques. Le collagène représente plus de 95 % de ce réseau tandis que le chondrocyte, qui est l'unique type cellulaire présent dans le cartilage, représente 2 % du volume total. Cette structure permet d'assurer l'élasticité et la robustesse du cartilage lors des tensions associées au mouvement des os.

Les chondrocytes et la matrice qui les entoure ont des activités biologiques réciproques fortes qui contrôlent le renouvellement du cartilage. Ainsi, les chondrocytes régulent la matrice extracellulaire en produisant l'ensemble de ses composants tandis que leur activité métabolique, leur différentiation et leur prolifération sont contrôlées physiologiquement par certains constituants de la matrice [152, 153]. De plus, lors de la détérioration de la matrice extracellulaire induite par l'arthrose, les constituants dégradés sont absorbés par les chondrocytes afin de procéder à une digestion enzymatique. Certains composés pourraient alors agir comme des messagers de stress modifiant le métabolisme cellulaire [154].

La matrice extracellulaire du cartilage ne peut donc être considérée comme un matériau biologique inerte car des transformations de sa structure ou de sa composition peuvent avoir un impact au niveau cellulaire. L'étude des modifications radio-induites (fragmentation, modifications structurale et fonctionnelle) de la matrice extracellulaire est donc un champ d'investigation extrêmement intéressant au regard des effets indirects que ces modifications peuvent induire sur la survie cellulaire. La protéine de collagène, composant essentiel de la matrice du cartilage mais aussi des os, a donc un rôle central dans cette étude.

Le collagène, une protéine structurale modèle

Le cartilage est composé, entre autre, de longues fibres de collagène résistantes et inextensibles, assurant la résistance mécanique à l'étirement des tissus. Chacune de ces fibres est composée de nombreuses protéines de collagène prenant la forme d'un filament de 300 nm de long et de 1,5 nm de diamètre. Cette protéine ne présente donc pas la forme repliée classique de certaines protéines fonctionnelles. Ces filaments sont agrégés parallèlement entre eux dans le cartilage, et lui donnent ses propriétés mécaniques.

La protéine de collagène ($\sim$ 300 kDa) est formée de trois sous-unités liées de manière non covalente par des liaisons hydrogènes (figure 5.1.1.a). L'assemblage de ces trois chaînes polypeptidiques forme une structure particulière en triple hélice (figure 5.1.1.b). La modification de sa structure chimique, soit par l'apparition de défauts dans les chaînes le constituant (rupture des liaisons covalentes), soit par rupture des liaisons hydrogène qui en assurent la cohésion peut entraîner l'altération de ses propriétés biomécaniques.

Les chaînes polypeptidiques sont constituées de la répétition du motif d'acides aminés X-Y-

G, où G est la glycine et X et Y peuvent être d'autres acides aminés. Ce motif se distingue par une grande richesse en proline ($\sim 20\ \%$) et par la présence fréquente de deux acides aminés peu courants, la 4-hydroxyproline (Hyp) (figure 5.1.1.c) et la 5-hydroxylysine (Hyl). On peut ajouter que seules les prolines en position -Y- peuvent être hydroxylées. Ces chaînes sont elles-mêmes enroulées en une structure secondaire d'hélice gauche (différente de l'hélice alpha) résultant de la répulsion des cycles pyrrolidines des résidus de proline.

D'après plusieurs études, l'hydroxyproline joue un rôle important dans la stabilité de la triple hélice en phase condensée [155]. En particulier, il a été montré que la température de perte de structure du modèle de la triple hélice du collagène $((PPG)_{10})_3$ augmente d'environ 35°C lorsque les prolines en positions -Y- sont remplacées par des hydroxyprolines [156]. Par ailleurs, Jariashvili *et co.* [157] ont observé une diminution des dommages induits par irradiation UV par substitution des prolines par des hydroxyprolines.

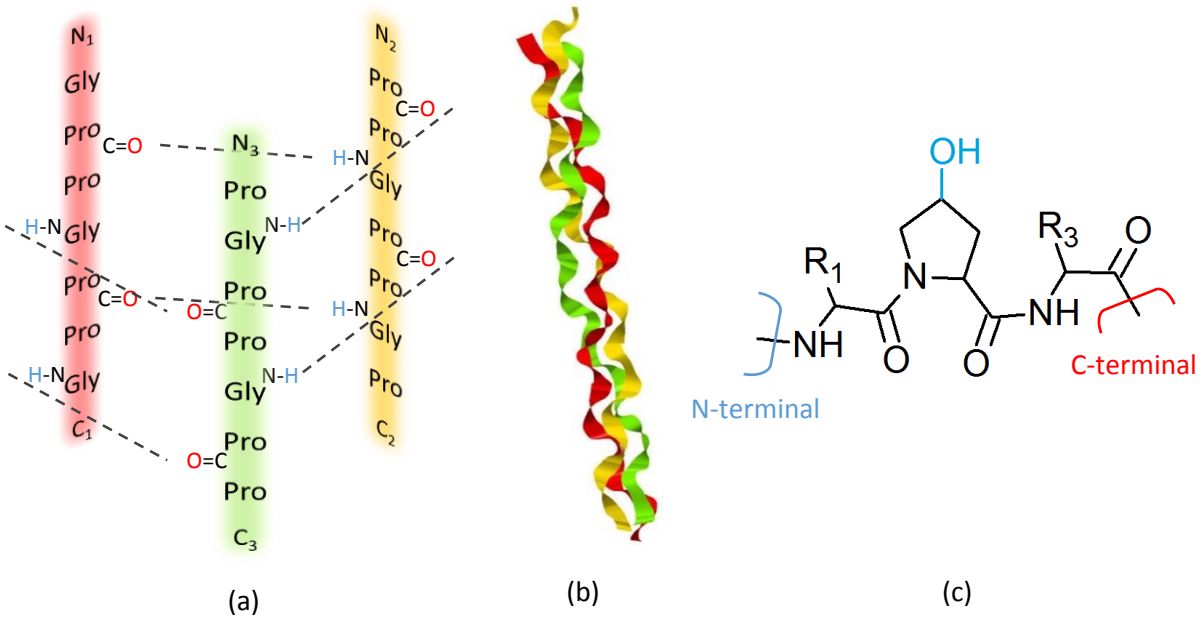


Figure 5.1.1 : ***(a)*** *: Liaisons hydrogène (lignes pointillées) entre les trois chaînes polypeptidiques, composées du motif Pro-Pro-Gly, d'une triple hélice de collagène. Les liaisons sont formées entre les groupements NH du N-terminal des glycines et les groupements C=O du C-terminal des prolines en position -X- d'une chaîne voisine [158].* ***(b)*** *: Structure tridimensionnelle d'un modèle de triple hélice $((PPG)_{10})_3$ [158].* ***(c)*** *: Ajout d'un groupement hydroxyle -OH sur le cycle pyrrolidine de la proline pour former le résidu 4-hydroxyproline (Hyp).*

Objectifs

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, l'étude des processus physiques et physico-chimiques résultant de l'interaction entre différents types de rayonnement et des molécules

d'intérêt biologique a été le fruit de nombreux travaux depuis plusieurs dizaines d'années. Ces travaux se sont principalement concentrés sur des systèmes moléculaires présents dans les cellules, tels que les acides nucléiques, les protéines et leurs composants élémentaires. Les études d'irradiation en phase gazeuse par des photons, des électrons et des ions ont permis d'analyser les processus résultants (ionisation, transfert de charge, fragmentation...) jusqu'à quelques centaines de millisecondes après l'irradiation.

Malgré l'intérêt évident d'étudier les molécules de l'environnement cellulaire tel que la matrice extra-cellulaire du cartilage, à notre connaissance aucune expérience n'a été réalisée en phase gazeuse sur des peptides de collagène. C'est pourquoi nous nous intéressons à la dégradation du collagène en phase gazeuse à l'échelle moléculaire par des méthodes d'activation impliquant l'excitation et l'ionisation du système. Nous cherchons, notamment, à identifier si la séquence spécifique (XYG) peut induire des sites préférentiels de rupture du peptide.

Nous souhaitons aussi étudier l'effet de l'hydroxylation des prolines sur la stabilité et la variété des voies de dissociation d'une chaîne polypeptidique isolée. Nous nous intéressons, de plus, à un modèle de la triple hélice du collagène reproduisant sa structure tridimensionnelle, qui joue un rôle clef dans les propriétés biomécaniques du collagène.

Afin d'explorer ces différents effets de structure et de composition des peptides, nous avons choisi d'étudier la séquence peptidique isolée [423-448] de la chaîne α-1 du collagène de type I en fonction de son état de charge et de sa composition en hydroxyproline (section 5.2). De plus, pour étudier la structure particulière en triple hélice du collagène, nous allons comparer le peptide isolé $(PPG)_{10}$ et le modèle de triple hélice $((PPG)_{10})_3$ (section 5.3). Un tel trimère comporte près de 30 liaisons hydrogène inter-moléculaires permettant la cohésion de la structure hélicoïdale.

Pendant cette thèse, j'ai choisi de me focaliser sur l'étude de différents processus de relaxation après excitation électronique et ionisation de ces systèmes induits par l'absorption d'un photon sur une grande gamme d'énergie :

- excitation électronique des liaisons peptidiques par photons UV (220 nm, 5,6 eV),
- excitation électronique et/ou ionisation en couche de valence par des photons VUV de 12 à 150 eV,
- excitation électronique et/ou ionisation en couche atomique interne par des photons X de 288 à 545 eV.

5.1.2 Faits marquants

L'absorption d'un photon par une molécule est une méthode d'activation permettant de déposer une certaine quantité d'énergie dans la molécule. En fonction de l'énergie du photon, la molécule peut atteindre des états vibrationnels ou électroniques pouvant entraîner sa fragmentation. Dans cette section, nous allons discuter des faits scientifiques marquants dans le domaine de la photo-absorption de peptides et de protéines protonés en phase gazeuse, et qui seront utiles dans la discussion des résultats.

5.1.2.1 Photo-excitation vibrationnelle par photon Infra-Rouge

Les photons du domaine infra rouge (IR) ont une énergie de l'odre de 0,1 eV, ce qui correspond à l'écart entre les niveaux vibrationnels d'une molécule ; celle-ci devient donc excitée vibrationnellement après absorption d'un tel photon [17]. Cette faible énergie rend l'absorption d'un grand nombre de photons nécessaire pour entraîner la fragmentation de peptides (IRMPD, *infrared multiphoton dissociation*) (processus 5.1.1). L'action globale de ces photo-absorptions consiste en une élévation progressive de l'énergie interne ro-vibrationnelle. La fragmentation qui en résulte est statistique, comme ce qui est observé en CID de basse énergie (quelques eV) [159], c'est à dire qu'elle intervient après le transfert de l'énergie du photon dans les modes de vibration et de rotation de la molécule. La fragmentation de peptide par IRMPD mène principalement à la rupture des liaisons peptidiques et la formation d'ions de types b et y [32, 160]. Dans le cas des peptides protonés, cette fragmentation se fait via des réactions impliquant les protons selon le modèle du « proton mobile » [161]. En présence d'acides aminés basiques (comme l'arginine et la lysine), les protons sont séquestrés par la forte affinité protonique de leur chaîne latérale et la fragmentation se fait alors par des processus différents impliquant les chaînes latérales des acides aspartique et glutamique. En l'absence d'acides aminés basiques, l'activation du peptide permet au proton de se mouvoir vers différents sites de protonation, tels que les azotes des liaisons peptidiques, et entraîner la fragmentation du peptide à différents endroits [161].

$$AB^{n+} \xrightarrow{k \times h\nu} A^{m+} + B^{p+} \quad (n = m + p) \tag{5.1.1}$$

Pour initier la fragmentation d'un peptide avec l'absorption d'un unique photon, il est nécessaire de porter un électron dans des états excités, ce qui requiert une énergie plus importante.

5.1.2.2 Photo-excitation électronique par photon UV

L'absorption de photons du domaine visible jusqu'à l'ultra-violet lointain (VUV, *Vacuum ultra-violet*) permet d'atteindre les états électroniques excités des molécules. À ces longueurs d'onde, correspondant à des photons d'une énergie de quelques eV (l'ordre de grandeur d'une liaison covalente), la fragmentation de la molécule peut être initiée par l'excitation d'un électron induite par l'absorption d'un seul photon. Si l'électron est porté vers un état électronique dissociatif, la fragmentation du système peut se produire rapidement, en quelques dizaines de femtosecondes. D'autre part, une conversion interne de l'énergie électronique en énergie vibrationnelle peut entraîner la fragmentation du système dans son état fondamental. Cette fragmentation peut intervenir avant ou après la redistribution de l'énergie du photon dans les modes de vibrations de la molécule (IVR, *intramolecular vibrational redistribution*). La photo-dissociation de peptides peut être séparé en deux domaines de longueurs d'ondes : lorsqu'elle est comprise entre 280 et 240 nm, la molécule est excitée localement au niveau des acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine et tryptophane) [23, 24], si elle est inférieure à 240nm, des transitions au niveau des liaisons peptidiques [162] sont principalement impliquées.

Photo-absorption par les chaînes latérales aromatiques (240 nm $< \lambda <$ 280 nm)

L'absorption d'un photon dans la gamme des longueurs d'ondes comprises entre 240 et 280 nm permet d'exciter un chromophore dans la chaîne d'acides d'aminés. Les trois acides aminés possédant des chaînes latérales aromatiques sont la phénylalanine (F), la tyrosine (Y) et le tryptophane (W) dont les bandes d'absorption larges sont centrées autour de $\lambda_{\text{abs}} = 257$ nm, 275 nm et 280 nm, respectivement. Les électrons des liaisons π des cycles aromatiques sont ainsi excités via les transitions électroniques $\pi\pi^*$. La fragmentation du peptide depuis un état dissociatif peut se produire de manière non-statistique via des ruptures de liaisons covalentes à proximité des chromophores [28, 29] et la perte d'un atome d'hydrogène dans le cas du tryptophane [30]. La fragmentation après conversion interne de l'énergie électronique dans les modes de vibration du peptide entraîne une fragmentation statistique des liaisons peptidiques comme en CID.

Plusieurs études réalisées par W. Gabryelski et L. Li [163] et les groupes de M.S. Kim [28,29] et P. Dugourd [30,164] dans les années 2000 ont été menées sur des peptides protonés contenant des chromophores, excités grâce à des lasers Nd :YAG à une longueur d'onde de 266 nm. Dans le cas de la photo-dissociation de la leucine-enképhaline (YGGFL), décrite comme un modèle pour l'étude des peptides, des fragments de types a, b et y ainsi que des ions immonium de la tyrosine et de la phénylalanine sont observés [30, 163]. De plus, la perte de la chaîne latérale de la tyrosine est majoritaire et n'est pas présente en CID. Cette perte peut s'expliquer par une dissociation non statistique dans l'état excité S_1 [30]. De la même façon, la photo-dissociation de différents peptides contenant de la tyrosine présente la perte de la chaîne latérale de ce chromophore [164]. De manière générale les ruptures du squelette des peptides comprenant un acide aminé aromatique se font préférentiellement du côté du C-terminal de ce chromophore, formant les ions de types a (majoritaires), y et z répartis sur l'ensemble des peptides [28, 29].

L'absorption à ces longueurs d'onde provoque donc majoritairement une fragmentation très spécifique et localisée autour des acides aminés aromatiques. Pour exciter avec un seul photon un peptide ne contenant pas ces chromophores et/ou exciter les électrons des liaisons peptidiques, il est nécessaire d'utiliser des photons de plus haute énergie.

Photo-absorption par les liaisons peptidiques ($\lambda <$ 240 nm)

Une technique alternative à la photo-excitation des chromophores, et applicable pour n'importe quel type de peptide sans chaîne latérale aromatique spécifique, est d'utiliser des photons de longueur d'onde inférieure à 240 nm qui implique l'absorption par des électrons des groupement NH et C=O des liaisons peptidiques. En particulier cette gamme de longueur d'onde permet d'exciter les peptides via les transitions électroniques $n\pi^*$ (215 - 230 nm) et $\pi\pi^*$ (185 - 200 nm) ainsi qu'une transition de transfert de charge (150 - 175 nm) [25, 165]. Seulement quelques domaines de longueur d'onde sont accessibles par les lasers pour étudier l'excitation de peptides et de protéines. Le groupe de P. Dugourd [30, 166–168] utilise un laser OPO accordable en longueur d'onde leur donnant accès à un domaine de longueur d'onde s'étendant de

2 μm à 210 nm, tandis que d'autres groupes, dont ceux de J.P. Reilly et de M.S. Kim utilisent, respectivement, des lasers émettant à 193 nm (6,4 eV) et 157 nm (7,9 eV) [31].

À 220 nm, la leucine-enképhaline fragmente principalement après IVR (comme en CID) [30], mais aussi par des pertes de chaînes latérales des acides aminés aromatiques (Y et F) et d'un atome d'hydrogène, formant le radical cation $M^{+\bullet}$. Il est intéressant de noter que l'activation consécutive de ce radical cation par CID entraine majoritairement la perte de la chaîne latérale de la leucine, ce qui n'est pas observée par CID du peptide intact et suggère donc un effet du radical. D'une manière similaire, la fragmentation de la gramicidine A (contient quatre résidus de tryptophane) [30] et du pentapeptide AGWLK [167] est dominée par des pertes d'atomes d'hydrogènes et de la chaîne latérale du tryptophane. Cette fragmentation provient d'un transfert d'électron dû à un couplage entre des états excités $\pi\pi^*$ et $\pi\sigma^*$ créé par la proximité du tryptophane et du groupement protoné -NH_3^+ [167]. Ils observent de plus, dans le cas du peptide AGWLK, une diminution de l'efficacité de la fragmentation avec l'augmentation de l'état de charge du peptide, ce qu'ils attribuent à l'éloignement de ces deux groupes avec l'élongation du peptide induit par la répulsion coulombienne des charges.

Plus récemment, M. Girod *et co.* [168] ont étudié la photo-absorption à 213 nm pour des peptides contenant des prolines. Les spectres de masse obtenus présentent des fragments similaires à ceux observés en CID mais des fragments additionnels apparaissent : y_n-2, a_n+2 et b_n+2 Da où n correspond à l'emplacement des prolines dans les peptides. Ces fragments n'apparaissent ni par photo-absorption à 266 nm ni pour des peptides ne contenant pas de proline mais ont également été observés à 157 nm [169]. Ces fragments sont attribués à une excitation des électrons des liaisons C-C et C-N proches des prolines, suivie par des dissociations homolytiques de ces liaisons et un transfert de 2H.

La photo-absorption à 193 nm (6,4 eV) a été étudiée pour la première fois en 1984 par W.D. Bowers *et co.* [170] sur le dipeptide Leu-Ala qui se dissocie par perte de CO_2 et par formation de l'ion a_1. De nombreux travaux sur la substance-P [31, 171, 172] ou sur d'autres peptides de plus grandes tailles [173–177] montrent que la photo-absorption à cette longueur d'onde entraîne une fragmentation importante couvrant l'ensemble de la séquence peptidique. Des ions de tous types sont formés, dont les conventionnels a, b, c, x, y et z, ainsi que ions d, v et w provenant de pertes de chaînes latérales depuis, respectivement, les ions a, y et z. Le groupe de M.S. Kim [174, 175], en étudiant une variété de peptides protonés composés d'une arginine à l'extrémité soit N-terminale soit C-Terminale, conclut grâce au type de fragment observés, que le proton est séquestré par l'arginine et n'est pas impliqué dans ces processus de fragmentation. On peut noter que les études présentant des résultats sur des peptides comportant des prolines montrent des fragments dont les pics les plus intenses correspondent à des dissociation du côté du N-terminal des prolines [176, 177], ainsi que certains fragments internes produits par des ruptures de liaisons peptidiques proches des prolines [173]. Par conséquent, une certaine spécificité de la fragmentation des peptides à proximité des résidus de proline semble se détacher.

La majorité des expériences à 157 nm (7,9 eV) ont été réalisée par le groupe de J.P. Reilly [31, 33, 34, 169, 178–180]. La dissociation des peptides étudiés présente de nombreux

fragments de tous types (a, b, c, x, y, z, v, w) couvrant la majoritée de la séquence peptidique, comme à 193 mn [174,175], mais aussi des pertes de chaînes latérales depuis le peptide parent. Il a notamment été proposé [174, 175, 178] que la formation des ions x+1 soit une première étape menant à celle des fragments x, v et w. Des calculs *ab initio*/DFT ont montré que cette première étape se fait via un processus de haute énergie impliquant une dissociation homolytique de la liaison C_α-CO [34].

Des expériences de dissociation résolue en temps sur des peptides protonés au C-terminal [33], montrent que 300 ns après l'absorption du photon, seuls les ions de type x et les pertes de chaînes latérales depuis le peptide parent sont présents sur les spectres de masse. Les ions de type y, de même que des ions de type a, b et c (nécessitant un transfert de proton du C- vers le N-terminal), apparaissent plusieurs μs après l'absorption du photon, et dépassent en intensité les ions x au bout de 10-15 μs. Ainsi, il semble que les ions de type x, de même que les pertes de chaînes latérales, sont effectivement propres à l'absorption d'un photon de haute énergie et mettent en jeu des processus radicalaires, tandis que les ions de types y, formés dans un second temps, sont propres aux processus d'excitation vibrationnelle comme observé en CID ou IRMPD, et donc formés par transfert de proton.

L'utilisation de lasers pour induire la dissociation de peptides et de protéines est donc possible grâce à l'importante énergie d'excitation électronique transférée à ces systèmes. En comparaison de l'excitation des acides aminés aromatiques qui produit une fragmentation localisée près de ces chromophores, l'excitation des électrons des liaisons peptidiques avec des photons de plus haute énergie produit une bien plus importante variété de fragments. À l'exception de la proline, la fragmentation est en général peu spécifique de l'arrangement des acides aminés et produit des fragments de toute sorte par rupture des liaisons peptidiques tout au long de la séquence. Cependant, les longueurs d'ondes accessibles par les lasers limitent cette technique et, sans laser accordable, ne permettent pas de faire de la spectroscopie en dessous de 210 nm. Des sources de lumière différentes telles que les synchrotrons permettent d'accéder à une gamme d'énergie de photon beaucoup plus grande, jusqu'au keV. L'énergie d'ionisation d'une biomolécule étant de l'ordre de 10 eV, il devient alors possible de transférer, par l'absorption d'un unique photon, une énergie capable de libérer un électron de ces systèmes.

5.1.2.3 Photo-ionisation et photo-excitation par photon VUV et X

La photo-absorption à plus haute énergie requiert des sources de photons différentes des lasers disponibles en laboratoire. C'est pourquoi les récents travaux du groupe de T. Schlathölter [181] et ceux de A. Giuliani et A. Milosavljević [139] ont été réalisés sur les lignes des synchrotrons BESSYII (Allemagne) et SOLEIL (France), respectivement.

L'absorption d'un photon X ou d'un photon VUV suffisamment énergétique peut ioniser une molécule depuis, respectivement, une orbitale atomique ou une orbitale de valence. L'éjection de l'électron laisse la molécule sous forme radicalaire (avec un électron célibataire). La molécule peut alors fragmenter si l'énergie déposée, sous forme d'excitation électronique ou vibrationnelle,

est suffisante. L'excitation ou l'éjection d'un électron d'une orbitale interne peut mener à une relaxation de la molécule par un processus Auger et l'éjection d'un ou plusieurs électrons.

Absorption de photon VUV en couche de valence

Dans des expériences pionnières en 2011, S. Bari *et co.* [182] ont étudié la photo-absorption du peptide leucine-enképhaline protoné sur la gamme 8 - 40 eV, peptide qui fut ensuite étudié par A. Giuliani et A. Milosavljević [45] avec des photons de 6 à 14 eV. En dessous du seuil d'ionisation (calculé à 8,87 eV [182]), les spectres de photo-fragmentation sont similaires à ceux obtenus à 193 nm (6,4 eV) [183], avec une variété d'ions de type a, mais présentent aussi des pertes de molécules neutres depuis le peptide parent (H_2O et chaînes latérales de la tyrosine et de la phénylalanine). Le maximum du rendement de photo-dissociation est observé autour de 20 eV, soit environ 11 eV au dessus du seuil d'ionisation du peptide [182]. L'irradiation de la substance P protonée [44] présente, en-dessous du seuil d'ionisation, des spectres de masse obtenus similaires à ceux obtenus avec des lasers à 193 nm [174] et 157 nm [179], avec une distribution d'ions de type a et une variété de pertes de chaînes latérales neutres. Au-dessus du seuil d'ionisation mesuré à 10,3 eV, et jusqu'à 20 eV, les spectres sont dominés par le peptide photo-ionisé radicalaire intact $M^{2+\bullet}$ et la perte de 74 Da de ce dernier, attribuée à la chaîne latérale de la méthionine. Les seuils d'apparition mesurés pour les pertes de molécules neutres (en majorité attribuées aux chaînes latérales) depuis le peptide parent s'étendent entre 5 et 9,5 eV, tandis que celles depuis $M^{2+\bullet}$ varient de 0,7 et 3 eV au dessus du seuil d'ionisation [44]. Ainsi, au seuil d'ionisation, le photon libère un électron de l'orbitale moléculaire occupée la plus haute (HOMO) et laisse peu d'énergie d'excitation dans le peptide photo-ionisé radicalaire. Lorsque l'énergie du photon dépasse le seuil d'ionisation, le peptide $M^{2+\bullet}$ est porté dans des états électroniques excités et peut alors dissocier par la suite [182].

La photo-absorption de protéines dans cette gamme d'énergie de photon a été étudiée par A. Giuliani et A. Milosavljević [46, 60, 184, 185]. Par exemple pour le cytrochrome C [46], les spectres de photo-absorption présentent la protéine photo-ionisée radicalaire intacte et accompagnée d'une perte de CO_2, mais pas de fragmentation du squelette, ce qui apparaît complètement différent des résultats obtenus sur les plus petits peptides (leucine-enképhaline et substance P). Leurs études ont permis de mettre en avant l'augmentation de l'énergie d'ionisation des protéines avec leur état de charge initial, ce qu'ils ont attribué à une augmentation de l'attraction coulombienne exercée par les protons sur l'électron libéré.

La longueur du peptide semble donc être un facteur important sur le comportement des peptides et des protéines après absorption d'un photon VUV. L'étude des peptides YG_nF ($n = 0, 1, 3, 5, 10$) par absorption de photons de 8 à 30 eV [186] montre que pour $n \leq 5$, les peptides présentent une forte fragmentation impliquant les acides aminés Y et F, sans que le peptide photo-ionisé radicalaire intact ne soit observé. Pour $n = 10$, la fragmentation est réduite et le peptide photo-ionisé radicalaire intact est présent sur le spectre de masse.

Absorption de photon X en couche interne

A. Milosavljević *et co.* ont pour la première fois étudié la photo-absorption en couche interne 1s du carbone, de l'azote et de l'oxygène d'une protéine en phase gazeuse [35] et mesuré ses spectres NEXAFS (*Near Edge X-ray Absorption Fine Structure*). Ces spectres permettent d'identifier les transitions électroniques résonantes des électrons de couche atomique 1s vers des orbitales moléculaires. En particulier pour le cytochrome C, ils attribuent un pic à 288,3 eV à la transition d'un électron 1s du carbone vers un état π^* (C=O) des liaisons peptidiques, notée C 1s$\longrightarrow \pi^*_{C=O}$. De même pour l'azote et l'oxygène, ils identifient les transitions N 1s$\longrightarrow \pi^*_{C=O}$ à 401,4 eV, N 1s$\longrightarrow \sigma^*_{C-N}$ autour de 406 eV et O 1s$\longrightarrow \pi^*_{C=O}$ à 531,4 eV. Cette étude sur le cytochrome C et celle réalisée sur l'ubiquitine [47] montrent que la photo-excitation d'un électron 1s entraîne la formation de la protéine photo-ionisée radicalaire intacte après désexcitation Auger, et accompagnée de la perte de CO_2, sans fragmentation supplémentaire. Lorsque cet électron atteint le continuum (ionisation), cela entraîne majoritairement la formation de la protéine doublement ionisée $M^{(n+2)+\bullet\bullet}$ via une désexcitation Auger, toujours sans fragmentation. Pour chaque protéine, l'observation de la multi-ionisation suggère que des processus Auger simultanés ou en cascade peuvent se produire. Comme mis en avant pour la photo-ionisation par photon VUV, le potentiel d'ionisation de la protéine en couche 1s du carbone augmente avec l'état de charge [47].

La photo-absorption en couche 1s du carbone pour de plus petits peptides comme la leucine-enkephaline [49] présente un spectre NEXAFS similaires aux protéines [35]. En revanche, leurs spectres de masses sont radicalement différents, comme c'est aussi le cas en VUV. Ainsi, dans le cas de la leucine-enképhaline, la photo-excitation d'un électron 1s à 285,5 et 288,5 eV présente principalement des ions de m/q inférieur à 150 et quelques fragments plus gros dans la gamme de m/q entre 150 et 300. Cependant au delà du seuil d'ionisation des couches 1s, la proportion des petits fragments augmente tandis que les ions de m/q $>$ 150 disparaissent.

De manière générale, en dessous du seuil d'ionisation de valence, la fragmentation des peptides est semblable à celle obtenue par laser à 193 nm et 157 nm, et présente des pertes de molécules neutres depuis le peptide parent ainsi qu'une forte fragmentation au niveau des liaisons peptidiques tout au long de la séquence. Au delà du seuil d'ionisation des électrons de valences, les pertes de molécules neutres depuis le peptide photo-ionisé dominent pour des systèmes comme la substance P ou le cytochrome C. En revanche, la leucine-enképhaline, un peptide de plus petite taille, fragmente fortement et l'observation du peptide photo-ionisé intact n'a pas pu être mise en évidence. Après absorption d'un photon X, il apparaît que la taille du peptide joue aussi un rôle important sur la survie ou la dissociation du peptide simplement ou multi-photo-ionisé.

En collaboration avec l'équipe de T. Schlathölter et dans l'objectif d'éclaircir ce dernier point, nous avons récemment publié un article présentant les spectres de photo-absorption en couche 1s du carbone pour une grande variété de peptides et de protéines (masses de 555 à 12kDa) [48]. Nous y proposons que l'énergie électronique du système après émission d'un

électron Auger est entièrement convertie en énergie interne ro-vibrationnelle ce qui induit la fragmentation des petits peptides. La survie après multi-ionisation d'un système par rapport à un autre dépend alors de la taille du système et donc du nombre de degrés de liberté dans lesquels peut être répartie l'énergie.

À la lumière de ces résultats, pour étudier des peptides de collagène par photo-absorption sur une large gamme d'énergie (UV, VUV et X) nous devons utiliser différentes sources de lumière, laser et synchrotron. Nous allons maintenant voir quels sont les dispositifs expérimentaux, couplés à des sources de lumière, qui nous ont permis de réaliser ces études.

5.1.3 Dispositifs expérimentaux

Les deux dispositifs expérimentaux ayant permis l'étude de la photo-absorption des peptides de collagène en phase gazeuse, en collaboration avec le groupe SpectroBio de Philippe Dugourd (Institut Lumière Matière, Lyon, France) et le groupe de Thomas Schlathölter (Zernike Institute for Advanced Materials, université de Groningen, Pays-Bas), ont un fonctionnement assez similaire à celui du dispositif PIBALE (chapitre 4). On retrouve donc la production des ions moléculaires par ESI, la sélection de l'ion cible selon le rapport m/q, le piégeage des ions, l'interaction avec les particules projectiles et l'analyse des produits par spectrométrie de masse. La différence majeure vis-à-vis du dispositif PIBALE est le fait que les interactions sont ici réalisées au sein du piège à ion, ne donnant accès qu'aux spectres de masse de tous les ions présents dans le piège et non à la dynamique de fragmentation. Ces deux dispositifs expérimentaux sont décrits dans cette section.

5.1.3.1 Dispositif pour les expériences de photo-absorption UV

Les expériences d'absorption de photons UV ont été réalisées dans le groupe SpectroBio de l'Institut Lumière Matière, à l'aide d'un spectromètre de masse tandem commercial *LTQ* (*Linear Trap Quadrupole*, Thermo Fischer, San Jose, CA, E-U). Le *LTQ* présenté en figure 5.1.2 utilise une source ESI pour mettre en phase gazeuse des systèmes moléculaires protonés ou déprotonés. Les ions ainsi formés traversent deux quadripôles, et un octopôle jusqu'à un piège à ions quadripolaire (QMS). Avant irradiation, la molécule d'étude est isolée dans le piège par sélection de son rapport m/q selon le principe décrit dans la section 3.2.2. Un gaz d'hélium est injecté dans le piège à une pression de l'ordre de 10^{-3} mbar pour optimiser le piégeage tandis que la pression dans la chambre du piège, au niveau des détecteurs, est de l'ordre de 10^{-5} mbar. L'analyse en masse des ions contenus dans le piège s'effectue en les extrayant au travers de fentes pratiquées dans les électrodes du piège. L'extraction et la sélection en masse se font en appliquant sur les électrodes du piège des tensions RF et DC en résonance avec un rapport m/q donné, de sorte que ces ions aient des trajectoires instables et soient éjectés du piège. Les ions sont ensuite collectés par des plaques de conversion couplées à des multiplicateurs d'électrons (type channeltron). L'analyseur en masse fonctionne sur une gamme de m/q allant de 50 à

4000 pour une résolution m/Δm pouvant s'étendre jusqu'à 30000 [187].

Ce spectromètre de masse est couplé à un faisceau laser introduit le long de l'axe du piège linéaire au travers d'une fenêtre en quartz transmettant 90% du faisceau. Celui-ci est produit par un laser accordable en longueur d'onde composé d'un oscillateur paramétrique optique (OPO) pompé par un laser Nd^{3+} :YAG de fréquence 10 Hz fournissant des impulsions laser de 5 ns. Le système complet permet de couvrir une gamme de longueurs d'ondes s'étendant de 210 à 2200 nm. Un obturateur électromécanique et un générateur de délai permettent de régler le temps d'irradiation des ions dans le piège [187].

Les peptides de collagène étudiés ne contenant pas d'acides aminés aromatiques, il n'est pas possible de les exciter à la longueur d'onde de 260 nm correspondant à une bande d'absorption des cycles aromatiques [30, 162]. Ainsi, pour les expériences de photo-dissociation réalisées, la longueur d'onde du laser a été fixée à $\lambda = 220$ nm ($E_\varphi = 5{,}6$ eV) et à une puissance à 3 mW. Cette longueur d'onde correspond à une bande d'absorption impliquant des transitions électroniques au niveau des liaisons peptidiques [162, 168]. Cette longueur d'onde est de plus caractéristique de la structure tridimensionnelle en triple hélice du collagène [157] et en induit une forte dissociation. Les molécules sont irradiées dans le piège pendant des temps typiques de 500 ms, correspondant à 5 pulses laser. La méthode d'acquisition des données ne nous permet pas ici d'assurer la condition d'absorption d'un seul photon par les molécules. Toutefois, l'analyse des spectres, détaillée plus loin dans la section 5.2.2, permet d'écarter une contribution majoritaire d'absorption multi-photonique.

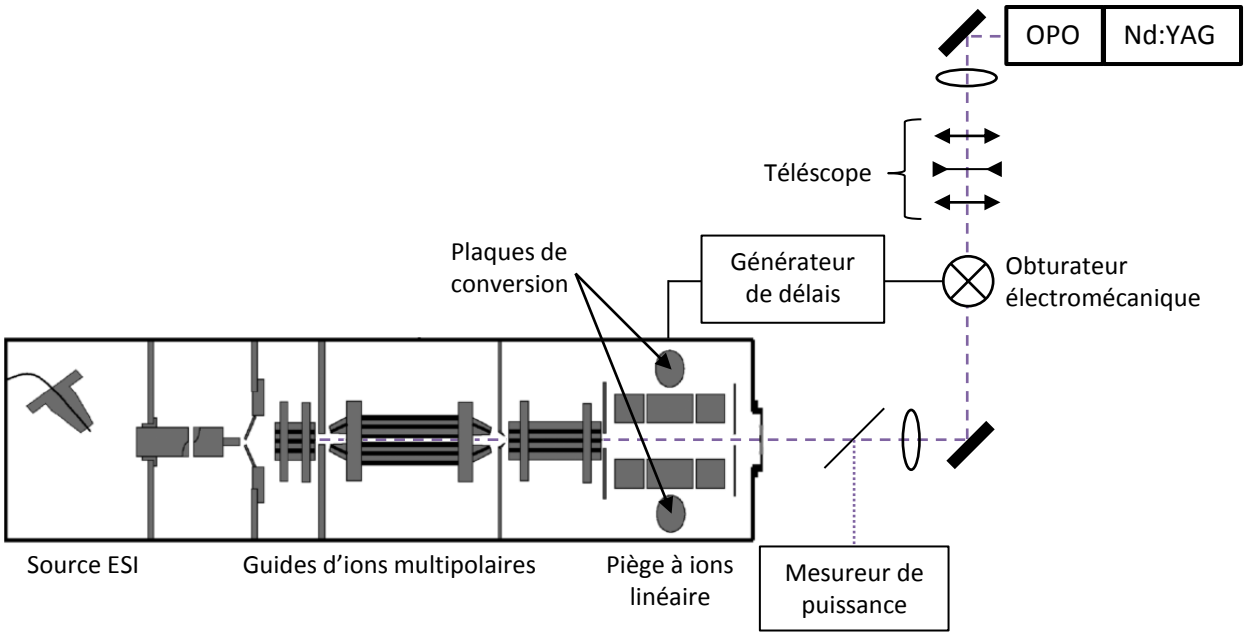


Figure 5.1.2 : *Schéma détaillé du couplage entre le spectromètre de masse commercial LTQ et le laser UV, d'après V. Laraillet et co. [57].*

5.1.3.2 Dispositif pour les expériences de photo-absorption VUV et X

Les expériences de photo-absorption dans l'UV lointain (Vacuum-UV, VUV) et de rayons X (RX) ont été réalisées au synchrotron BESSY II (Helmholtz-Zentrum Berlin), respectivement sur les lignes de faisceaux *U125-2_NIM* et *U49-2_PGM-1*. Le spectromètre de masse tandem *Paultje*, présenté en figure 5.1.3.a a été couplé avec ces lignes pour étudier la photo-absorption des peptides de collagène sur une large gamme d'énergie, de 12 à 540 eV.

Spectromètre de masse tandem *Paultje*

Cet instrument présente de nombreuses similarités avec le dispositif PIBALE et a été précédemment détaillé dans les thèses de S. Bari [188] et O. González-Magaña, [43]. Les ions moléculaires sont produits par une source ESI et entrent dans le dispositif au travers d'un capillaire chauffant. Les ions sont ensuite focalisés dans un funnel, guidés dans un octopôle, sélectionnés selon leur rapport m/q dans un QMS et enfin accumulés dans un piège de Paul. Ils sont alors irradiés dans le piège et les produits cationiques sont extraits avec un fort champ électrique jusqu'à un détecteur à galettes à micro-canaux pour être analysés par spectrométrie de masse à temps de vol. La résolution en masse de ce spectromètre est de $m/\Delta m \sim 400$. Le faisceau de photons traverse le piège en son centre grâce à des trous pratiqués dans l'anneau central. L'intensité relative du flux de photons est mesurée après le piège par une photodiode SXUV à jonction p-n (Opto Diode, Camarillo, E-U). La durée de l'irradiation est réglée par un générateur de cycle et un obturateur électromécanique. On peut noter que la chambre du piège de Paul est refroidie à l'azote liquide pour diminuer la densité du gaz résiduel et donc les sources de bruit de fond.

Le cycle de fonctionnement standard pour ces expériences est décrit par le chronogramme de la figure 5.1.3.b. Les ions moléculaires sont injectés pendant une centaine de millisecondes dans le piège rempli d'un gaz tampon d'hélium pour dissiper l'énergie cinétique des ions. Un délai de plusieurs dizaines de millisecondes permet de pomper le gaz tampon avant l'irradiation du contenu du piège. On peut noter que l'énergie d'ionisation de l'hélium est de 24,6 eV et qu'il est donc important qu'il y ait peu d'hélium dans le piège au moment de l'irradiation. Dans le cas contraire, l'absorption des photons par l'hélium pourrait réduire le nombre de photons pouvant interagir avec les ions moléculaires. De plus, la présence d'un grand nombre d'He^+ dans le piège pourrait altérer les caractéristiques du nuage d'ions par l'effet de la charge d'espace, comme nous l'avons montré pour PIBALE dans la section 4.2.2.

Lors de ces expériences, l'amplitude de la tension RF était de l'ordre de 1000 V, correspondant à un puits de potentiel axial d'environ 20 V. De ces valeurs, nous pouvons estimer d'après l'équation 3.2.25 que les ions de rapport m/q inférieur à ~ 100 ne sont pas piégés. Les fragments dans cette gamme ne pourrons donc pas être observés. De plus, il est probable qu'une dissociation avec un KER élevé provoque la perte des fragments produits. La valeur du KER à partir de laquelle les fragments seraient perdus n'a pas été évaluée, mais pourrait être estimée par des simulations SIMION. Pour dissiper l'énergie cinétique des fragments chauds conservés

dans le piège, une seconde injection d'hélium rempli celui-ci après l'irradiation. Ceci permet de ne pas dégrader la résolution en masse du spectromètre en gardant un paquet d'ions de petite taille. Enfin, un délai de 100 ms est respecté afin de pomper à nouveau l'hélium du piège avant d'extraire les ions et ainsi éviter des collisions avec ce gaz, qui entraîneraient une diminution de la résolution du spectromètre et pourraient conduire à la dissociation des molécules.

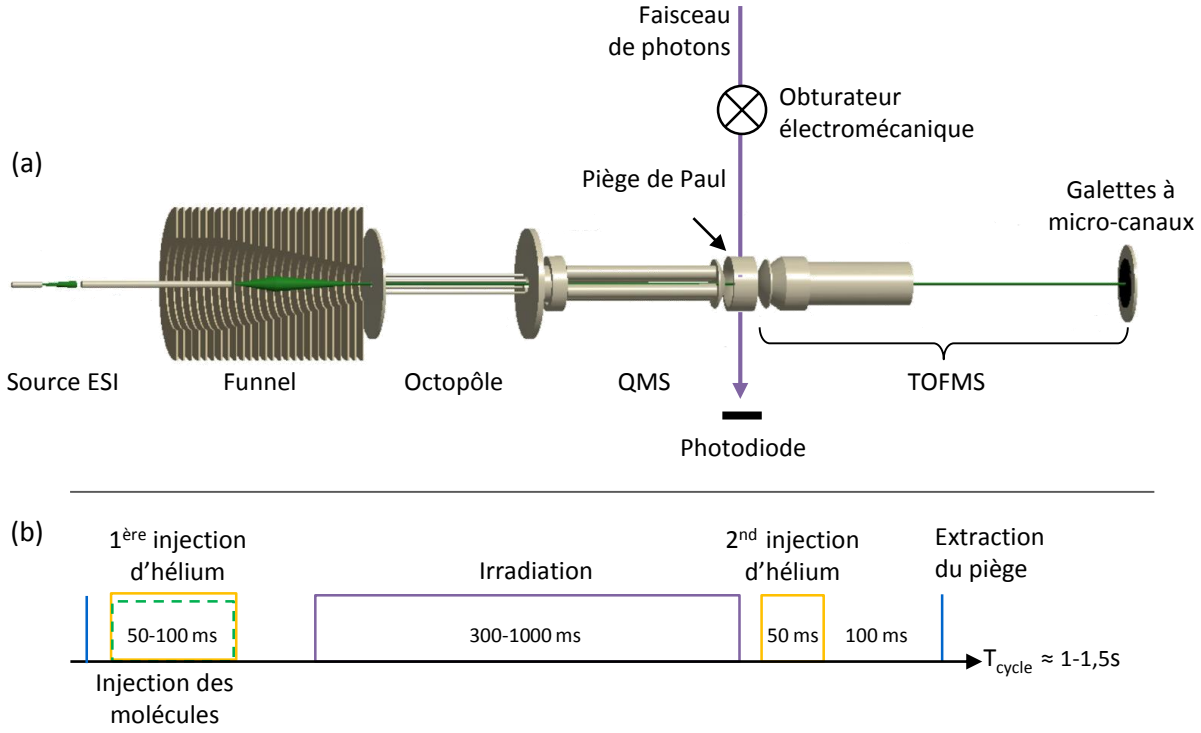


Figure 5.1.3 : ***(a)*** *: Schéma détaillé du couplage entre le spectromètre de masse tandem Paultje et les lignes de faisceaux du synchrotron BESSY II.* ***(b)*** *: Chronogramme d'un cycle de fonctionnement typique du dispositif.*

De même que sur le dispositif PIBALE, les ions moléculaires sont susceptibles de fragmenter par collision avec le gaz tampon à l'injection et à l'extraction du piège. De tels fragments sont détectés sur les galettes à micro-canaux et constituent une source de pollution des spectres de masse. Pour prendre en compte cette éventuelle contribution, un spectre avec le faisceau de photon (spectre de photo-absorption) et un autre sans (spectre témoin) sont acquis consécutivement en laissant l'obturateur électromécanique fermé un cycle sur deux. On soustrait ensuite le spectre témoin de celui de photo-absorption. On peut noter que l'intensité du pic parent dans le spectre de photo-absorption est nécessairement inférieure à l'intensité dans le spectre témoin. Ainsi, la soustraction de ces deux spectres fait apparaître un pic parent négatif dont l'intégrale est proportionnelle à la quantité de molécules ayant absorbé un photon, subi une ionisation et/ou une dissociation. Les différents spectres et résultats obtenus par cette méthode sont normalisés par rapport à l'intégrale de ce pic. De plus, pour identifier et soustraire les pics

de pollutions, nous enregistrons un spectre du bruit de fond, obtenu en irradiant le contenu du piège en l'absence de la molécule cible (source ESI éteinte).

En pratique, la durée de l'irradiation est réglée pour que l'intensité de la perte de l'ion parent soit $\lesssim 10\ \%$. De cette manière en considérant que les absorptions successives de photons sont indépendantes et que la probabilité d'absorption par un fragment est la même que par le parent, les fragments impliquant l'absorption de deux photons représentent moins de 1 $\%$ des fragments détectés. Cela nous permet de considérer que ces expériences sont réalisées dans des conditions d'absorption d'un seul photon. La durée d'irradiation est donc dépendante de la probabilité d'absorption à une énergie de photon donnée, et varie de 300 à 1000 ms sur la gamme d'énergie de photon étudiée. Ainsi la durée totale d'un cycle varie de 1 à 1,5 seconde. De manière générale 500 acquisitions permettent d'obtenir une statistique correcte.

Synchrotron BESSY II

Le synchrotron BESSY II est une source de troisième génération de haute intensité et brillance sur une large gamme d'énergie de photon (6 meV - 150 keV). Les électrons sont injectés dans l'anneau de stockage depuis un accélérateur linéaire à une énergie 1,72 GeV et un courant de l'ordre de 300 mA. Une cinquantaine de lignes de faisceau sont disposées autour du synchrotron.

La ligne *U125-2_NIM* [189–191] produit des photons VUV de 4 à 40 eV à des flux de l'ordre de 10^{12} photons/s. Des fentes permettent d'améliorer la résolution en énergie du faisceau au détriment du flux. Pour ces expériences d'irradiation de molécules en phase gazeuse, une haute intensité de faisceau est primordiale et les fentes restent largement ouvertes. La résolution en énergie dans ces conditions est de $\Delta E_\varphi/E_\varphi = 0{,}04\ \%$, soit une dispersion en énergie de l'ordre de la dizaine de meV. Cette résolution est suffisante car la largeur des bandes correspondant à des transitions électroniques moléculaires est de l'ordre de 1 eV [192]. Dû au fonctionnement de l'ondulateur de cette ligne, on peut noter que pour des photons d'énergie E_φ inférieure à 14 eV, le faisceau est contaminé par des photons d'harmoniques *n* supérieures et d'énergie $n \times E_\varphi$ pouvant perturber nos mesures.

La ligne de photons X *U49-2_PGM-1* [193, 194] propose une large gamme d'énergie, de 85 à 1600 eV pour des flux de l'ordre de 10^{13} photons/s ($E_\varphi \in$ [85-500] eV) à 10^{12} photons/s ($E_\varphi \in$ [500-1600] eV). On peut noter que le flux de photons diminue d'un facteur ~ 10 grandeur dans la gamme d'énergie correspondant au seuil d'ionisation du carbone en couche interne. Ceci est dû à la forte absorption de ces photons dans les matériaux composant les miroirs et le monochromateur de la ligne du faisceau. De même que pour la ligne de photons VUV, des fentes permettent de régler la résolution en énergie du faisceau, mais nous les avons gardées ouvertes pour maximiser le flux de photons. La résolution en énergie est alors de l'ordre de $\Delta E_\varphi/E_\varphi = 0{,}1\ \%$, soit une dispersion en énergie de l'ordre de la centaine de meV.

Comme nous l'avons présenté précédemment dans la section 5.1.2.3, l'absorption par un acide aminé, et plus largement par une protéine, d'un photon X dans cette gamme d'énergie va

porter un électron de couche atomique interne (1s) du carbone, azote ou oxygène vers des états excités moléculaires ou vers le continuum. Pour étudier l'influence du site d'excitation ou d'ionisation sur les voies de dissociation des peptides étudiés, nous avons exploré différentes énergies de photon autour des énergies de liaison des électrons de couches internes 1s du carbone, de l'azote et de l'oxygène. Il est important de noter que nous n'avons pas réalisé de mesure systématique pour obtenir les spectres NEXAFS (*Near Edge X-ray Absorption Fine Structure*) des peptides étudiés par absorption de photon X. Cependant, il a été montré récemment que les spectres NEXAFS de protéines en phase gazeuse sont semblables à celles de protéines en films minces [35, 195, 196]. De plus, Y. Zubavichus, *et co.* ont largement exploré les structures fines pour le carbone, l'azote et l'oxygène des 22 acides aminés (incluant l'hydroxyproline) [195] et de plusieurs protéines (dont une triple hélice de collagène de type I de 300 kDa) [197, 198]. Ils montrent que les spectres NEXAFS de ces protéines sont clairement corrélés avec leur composition en acides aminés. Nous nous sommes donc référés à ces données pour déterminer les différentes énergies de photon correspondant à celles des électrons 1s du carbone, de l'azote et de l'oxygène.

Atome	transition électronique	acides aminés	énergie (eV)
C	1s $\rightarrow \pi^*$(C=O)	tous	288,2
	1s $\rightarrow$ continuum	tous	300
N	1s $\rightarrow \pi^*$(C=O)	tous	401
	1s $\rightarrow \sigma^*$(C-N)	tous	406
	1s $\rightarrow \sigma^*$(C-N)	Pro, Hyp	409,6
	1s $\rightarrow$ continuum	tous	412
O	1s $\rightarrow \pi^*$(C=O)	tous	532
	1s $\rightarrow \sigma^*$(C-OH)	Ser, Thr, Hyp	538
	1s $\rightarrow \sigma^*$(C=O)	tous	545

Table 5.1.1 : *Énergie des photons utilisés pour la photo-ionisation des couches internes du carbone, de l'azote et de l'oxygène. Les transitions électroniques et les acides aminés correspondants sont aussi indiqués.*

Le tableau 5.1.1 regroupe les différentes énergies de photon utilisées et les orbitales moléculaires vers lesquels un électron 1s est excité après absorption du photon. Pour le carbone, E_φ = 288,2 eV correspond à la transition électronique depuis la couche 1s vers l'orbitale π^*(C=O) de la liaison peptidique, tandis que E_φ = 300 eV permet d'éjecter directement un électron de couche 1s du carbone vers le continuum. Pour l'azote, E_φ = 401 eV correspond également à une transition vers l'orbitale π^*(C=O) de la liaison peptidique. E_φ = 406 eV correspond à l'orbitale σ^*(C-N) pour la majorité des acides aminés, tandis que E_φ = 409,6 eV est caractéristique de cette même transition dans le cas de la proline et de l'hydroxyproline dû au cycle pyrrolidine formé par la chaîne latérale [195]. E_φ = 412 eV a été utilisée pour l'ionisation directe depuis la couche 1s de l'azote. Enfin dans le cas de l'oxygène, nous avons utilisé E_φ = 532 eV pour

l'orbitale π^*(C=O) de la liaison peptidique [195]. On peut noter qu'une énergie de 531,4 eV a été mesurée pour le cytochrome c en phase gazeuse [35]. $E_\varphi = 538$ eV est attribuée à la transition σ^*(C-OH) présente dans la sérine, thréonine et hydroxyproline [195]. Enfin $E_\varphi = 545$ eV correpond à une résonance large pour la transition σ^*(C=O) [195].

5.1.4 Nomenclature pour les fragments peptidiques

Dans la suite de ce chapitre et pour nommer les différents fragments peptidiques, nous utiliserons la règle de nomenclature introduite par Rœpstorff & Folhman [11] et Biemann [12, 13], que nous avons détaillée dans la section 2.1.3 du chapitre 2.

Dans la suite, des schémas tels que celui présenté dans la partie inférieure de la figure 5.1.4 pour un peptide [ABCD] sont joints aux spectres de masses de différents peptides étudiés, pour donner une information rapide sur les liaisons peptidiques rompue. Ainsi le symbole ⌋ entre A et B indique une rupture de la liaison entre ces deux acides aminés et la production d'ions a_1, b_1 et/ou c_1. De même le symbole ⌈ entre C et D représente les fragments x_1, y_1 et/ou z_1 et enfin le symbole ⌋⌈entre B et C indique la production d'ions des deux côtés de la liaison rompue.

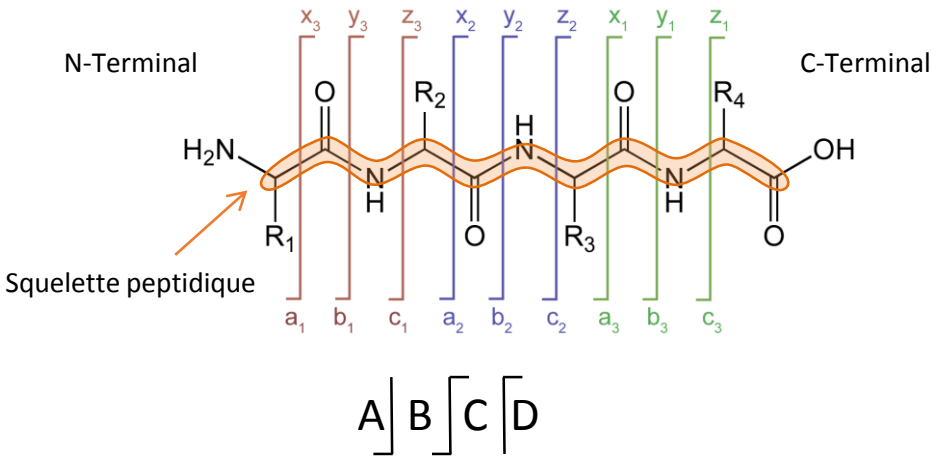


Figure 5.1.4 : *Nomenclature des fragments peptidiques : exemple pour un peptide composé de quatre acides aminés [ABCD], ayant les chaînes latérales R_1, R_2, R_3 et R_4. Chaque carbone relié à ces chaînes est appelé C_α.*

5.2 Stabilité d'une séquence peptidique du collagène

Cette section présente l'étude de la photo-absorption d'un peptide de collagène en phase gazeuse ainsi que l'influence de l'état de charge et de l'hydroxylation du peptide sur ses processus de relaxation. Ce travail a été mené sur une large gamme d'énergie, de 5,6 à 540 eV et n'avait, à notre connaissance, jamais été réalisé auparavant pour des peptides ou protéines.

5.2.1 Séquence peptidique du collagène PK26-P et PK26-Hyp

Le collagène de type I est la protéine de collagène la plus abondante dans le corps. On le trouve notamment dans les tissus cicatriciels, les ligaments et les os et présente donc un intérêt biologique évident. Chaque protéine est composée de trois sous-unités, deux chaînes α-1 et une chaîne α-2, chacune contenant plus de mille acides aminés (m $>$ 100 kDa). De plus, le collagène de type I est le principal composant de modèles tridimensionnels utilisés comme matrice extra-cellulaire pour des chrondrocytes articulaires, dont l'équipe de recherche du LARIA étudie l'irradiation par des ions et des photons [199, 200].

Pour étudier les processus moléculaires de dissociation du collagène sur un système plus simple qu'une protéine entière, nous avons choisi d'étudier la séquence peptidique [423-448] de la chaîne α-1 du collagène de type I et son équivalent hydroxylé. La composition en acides aminés de ce peptide est intéressante car il contient plusieurs sites de protonation ainsi que six prolines. Il est ainsi possible d'étudier l'influence de l'état de charge et de l'hydroxylation sur la photodissociation de ce peptide. Ces deux peptides sont composés de 26 acides aminés (AA) et suivent les séquences suivantes :

— PK26-P : PGG-PPG-PKG-NSG-EPG-APG-SKG-DTG-AK

— PK26-Hyp : PGG-PHypG-PKG-NSG-EHypG-AHypG-SKG-DTG-AK

Dans la suite, nous ferons référence à ces peptides en utilisant les notations PK26-P et PK26-Hyp. Il est à noter que ces peptides respectent la répétition du motif d'acides aminés X-Y-G et que l'hydroxylation du peptide PK26-Hyp n'est effectuée que sur les trois prolines en position -Y-. Ces deux peptides possèdent une forte proportion de glycine (35 $\%$) et de proline (23 $\%$), ce qui est typique des protéines de collagène. On notera la présence d'acides aminés basiques potentiellement protonés, (lysine, K) et acides, potentiellement déprotonés, (acides aspartique, D et glutamique, E) sur leur chaîne latérale respective. La chaîne latérale de la lysine est la plus basique (affinité protonique $\sim$ 988 kJ/mol [201]) pour ces peptides, faisant des trois lysines les sites de protonation les plus probables. De plus, la forte affinité protonique de l'amine secondaire de la proline au N-terminal ($\sim$ 960 kJ/mol [202]) rend également ce site favorable à la protonation.

La figure 5.2.1 montre un exemple de spectre de masse pour le peptide synthétique PK26-P produit par la source ESI du dispositif lyonnais (*LTQ*, voir section 5.1.3.1). Les pics correspondant au peptide trois et quatre fois protonés sont les plus intenses. À droite de ces pics on peut voir les substitutions de proton par des ions sodium et potassium. Ces complexes sont aussi observés dans les spectres de masse fournis par le fabriquant de ces peptides de synthèse (ProteoGenix). On observe aussi à de plus faibles intensités les pics correspondant au peptide deux et cinq fois protonés. L'ajout d'acide en solution permet de largement favoriser la production du $[PK26\text{-}P{+}4H]^{4+}$ au détriment du $[PK26\text{-}P{+}3H]^{3+}$. Cette distribution d'état de charge est cohérente avec les sites de protonation présentés précédemment.

L'encart de la figure 5.2.1 présente un zoom sur la région du pic du $[PK26\text{-}P{+}4H]^{4+}$ acquis sur ce même dispositif. Le spectre expérimental en gris fait apparaître clairement la distribution

isotopique due principalement à la contribution du Carbone-13. L'abondance naturelle du C-13 par rapport au C-12 étant de 1,109 %, la probabilité que le peptide comporte un isotope, et possède une masse augmentée de 1 Da, est donc de 105 %. La courbe rouge montre la distribution isotopique calculée selon ce principe et reproduit correctement le spectre expérimental. L'écart, en masse, entre les pics de la distribution isotopique d'un fragment nous permet d'en définir l'état de charge et donc d'en faciliter l'attribution.

Le tableau 5.2.1 donne les rapports m/q monoisotopiques et moyens pour ces deux peptides en fonction de leur état de charge.

	PK26-P		PK26-Hyp	
	mono	moy	mono	moy
$[M+H]^{+}$	2274.1	2275,4	2322.1	2323,4
$[M+2H]^{2+}$	1137.6	1138,2	1161.6	1162,2
$[M+3H]^{3+}$	758.7	759,1	774.7	775,1
$[M+4H]^{4+}$	569.2	569,6	581.3	581,6
$[M+5H]^{5+}$	455.6	455,9	465.2	465,5

Table 5.2.1 : *Valeurs mono-isotopiques et moyennes des rapports m/q pour les peptides PK26-P et PK26-Hyp en fonction de leur état de charge.*

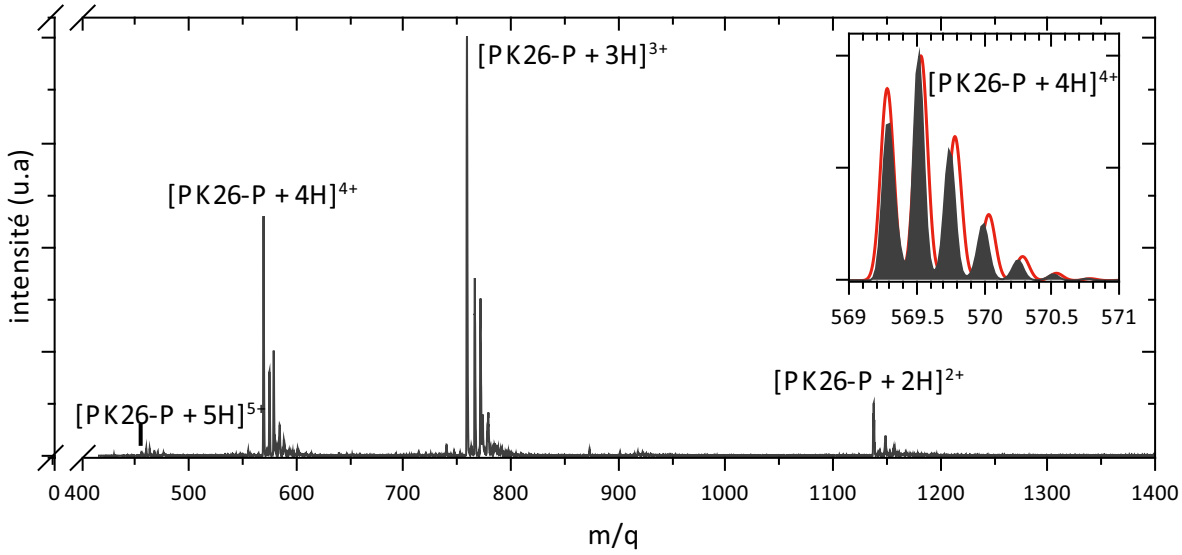


Figure 5.2.1 : *Spectre de masse d'une solution du peptide PK26-P (produit en source ESI) diluée dans un mélange eau/méthanol (50/50) sans ajout d'acide. Les états de charge 2+ à 5+ sont observés. L'encart présente la distribution isotopique du peptide [PK26-P+4H]$^{4+}$ et sa comparaison avec la théorie (courbe rouge).*

5.2.2 Dissociation induite par photon UV

Dans cette section, la dissociation du peptide de collagène PK-26 après absorption d'un photon de 5,6 eV est présentée. Après avoir détaillé le cas du peptide triplement chargé [PK26-P+3H]$^{+}$, nous présenterons l'effet de l'état de charge et de l'hydroxylation des prolines sur la dissociation de ce peptide.

5.2.2.1 Peptide [PK26-P+3H]$^{3+}$

La figure 5.2.2 montre le spectre de masse de photo-dissociation du peptide [PK26-P+3H]$^{3+}$ après absorption d'au moins un photon UV de 5,6 eV (220 nm). Ce spectre est normalisé par rapport à l'intensité du pic parent, indiqué par **M^{3+}** à m/q = 759,1. La fenêtre d'acquisition s'étend ici de m/q = 200 à 2000.

Ce spectre présente de nombreux pics dont la majorité peut être attribuée à des fragments issus de ruptures de liaisons peptidiques, en cohérence avec l'excitation de ces liaisons par les photons de 220 nm. On peut noter qu'aucun fragment n'est observé au delà de m/q = 1400 bien que la masse totale du peptide soit de 2277,3 Da. Ceci nous indique qu'il n'y a pas de grand fragment monochargé, ce qui est cohérent avec la répartition des charges sur le peptide, et donc avec les sites de protonation indiqués précédemment, si l'on suppose que les transferts de proton sont minoritaires.

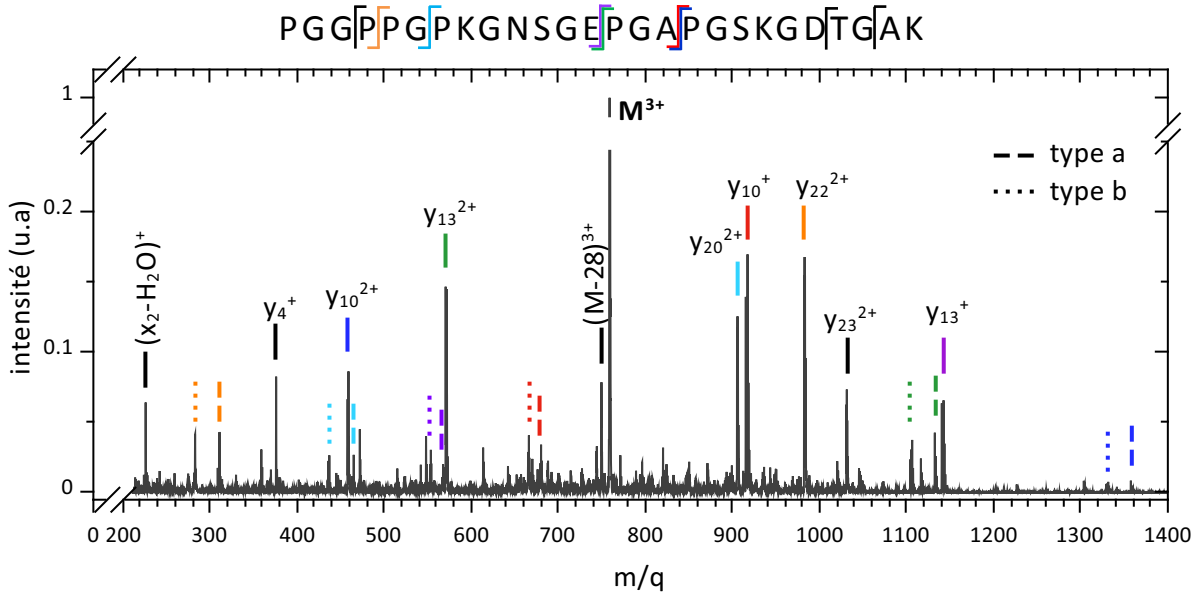


Figure 5.2.2 : *Spectre de masse de photo-dissociation du peptide [PK26-P+3H]$^{3+}$ à 220 nm. Les traits de même couleur correspondent à la rupture de la même liaison peptidique.*

Les pics les plus intenses correspondent à des fragments y_i^{n+} simplement et doublement chargés, formés par des dissociations du côté du N-terminal de chaque proline du peptide. Les deux autres pics remarquables de ce spectre n'impliquent pas les prolines et sont attribués à

y_4^+ et $(x_2\text{-}H_2O)^+$. Nous discuterons séparément de ces différents types de fragments. Nous observons, de plus, une perte de molécule neutre de 28 Da depuis le peptide parent, que nous attribuons à la molécule CO. En revanche, aucune perte de chaîne latérale n'est présente sur le spectre.

Rupture des liaisons peptidiques impliquant les prolines

Pour chacun des fragments y_i^{n+} (indiqués par des traits continus), on observe les fragments complémentaires a_j^{m+} et b_j^{m+} (indiqués respectivement par des traits pointillés et des tirets) tels que i+j = 26 et n+m = 3, avec de plus faibles intensités. On observe ainsi ces fragments pour i = 22, 20, 13, 10 (j = 4, 6, 13, 16). On peut noter que les fragments a_3^+ et b_3^+, complémentaires de l'ion y_{23}^{2+}, ont des masses inférieures à la limite basse de la fenêtre d'acquisition et n'ont pas pu être détectés. Le fait que l'on observe de grands fragments tels que y_{23}^{2+}, y_{22}^{2+} et y_{20}^{2+}, avec de hautes intensités indique que l'absorption de plusieurs photons par le peptide n'est pas un processus majeur ici.

En outre, pour chaque couple de fragments complémentaires, nous observons la formation des fragments y_i-2, a_j+2 et b_j+2 Da, attribuables à des transferts de deux hydrogènes depuis les ions y_i. La figure 5.2.3 présente des zooms sur les régions de l'ion y_{10}^+ et de ses fragments complémentaires a_{16}^{2+} et b_{16}^{2+} où sont clairement observés les fragments $(y_{10}\text{-}2)^+$, $(a_{16}+2)^{2+}$ et $(b_{16}+2)^{2+}$, l'intensité de ces derniers étant même supérieure à celle des ions a_{16}^{2+} et b_{16}^{2+}.

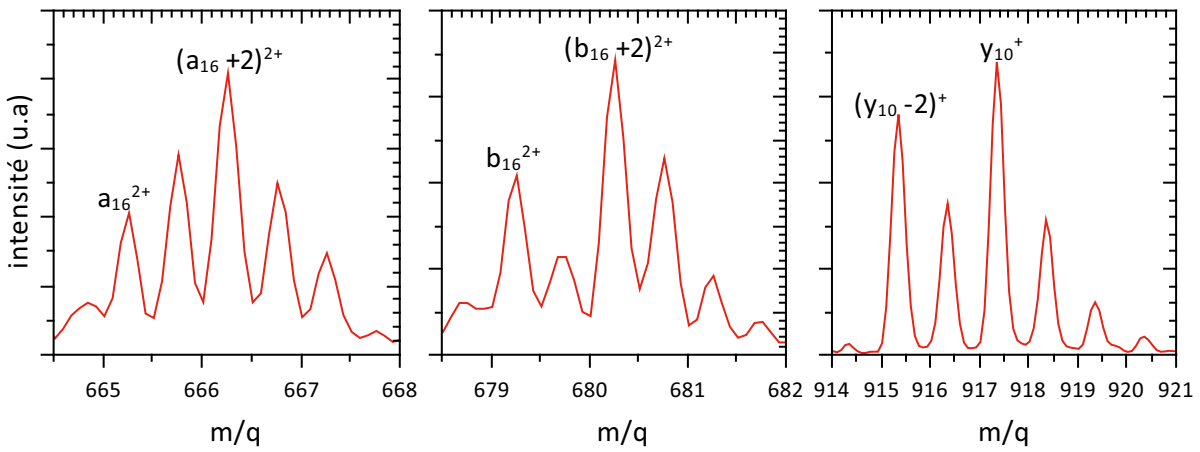


Figure 5.2.3 : *Régions du spectre de photo-dissociation du peptide $[PK26\text{-}P+3H]^{3+}$ à 220 nm correspondant aux fragments complémentaires a_{16}^{2+}, b_{16}^{2+} et y_{10}^+.*

Ces fragments ont déjà été observés pour des peptides contenant des prolines dans le cas de photo-absorption à 157 nm (7,9 eV) par T.Y. Kim *et co.* [169] et à 213 nm (5,8 eV) par M. Girod *et co.* [168] mais ne sont pas formés dans des processus de dissociation induite par collisions [203–205]. Ces deux études proposent des mécanismes de ruptures homolytiques similaires donnant lieu à la formation des fragments après photo-excitation d'un électron d'une liaison C-C ou C-N à proximité d'une proline. Ces mécanismes sont présentés sur la figure 5.2.4.

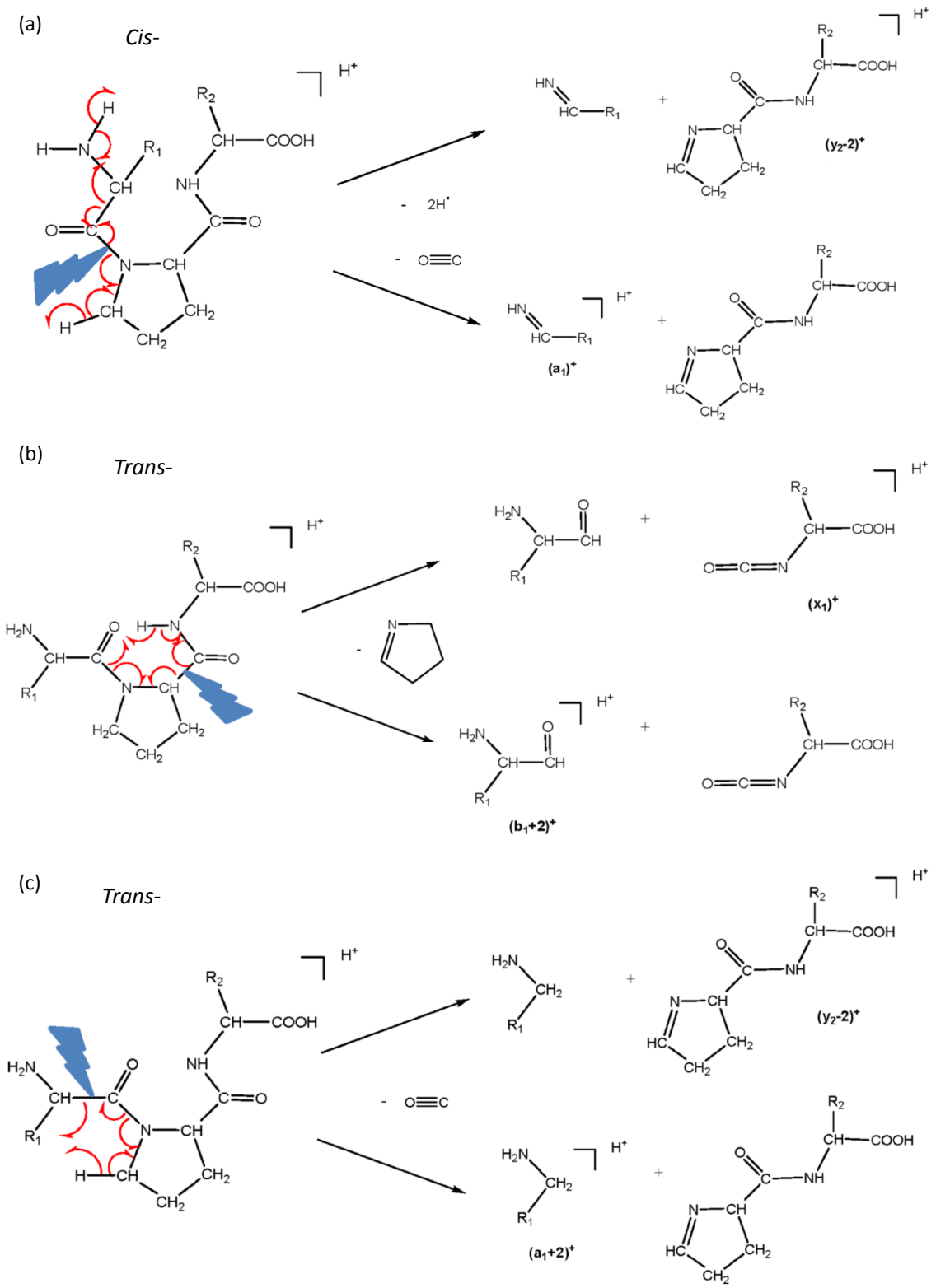


Figure 5.2.4 : *Mécanismes de dissociation d'un tripeptide proposé pour la formation de* ***(a)*** *: y_2-2 Da et a_1,* ***(b)*** *: x_1 et b_1+2 Da, et* ***(c)*** *: y_2-2 Da et a_1+2 Da, d'après M. Girod et co. [168].*

Ces mécanismes dépendent notamment de la conformation *cis* ou *trans* de la proline. T.Y. Kim *et co.* ont montré par photo-dissociation de peptides sélectionnés en conformation que seule la conformation *trans* de la proline mène à la production d'ions a_j+2 et b_j+2 Da (figures 5.2.4.b et 5.2.4.c). Toutefois, les deux conformations *cis* et *trans* de la proline peuvent conduire à la formation d'ions y_i-2 Da (figure 5.2.4.a et 5.2.4.c) après photo-dissociation de la liaison peptidique N-CO du côté N-terminal de la proline. On peut noter que les mécanismes (a) et (c) impliquent la perte du groupement CO. La perte d'une molécule neutre de 28 Da depuis l'ion parent, observée dans le cas du PK26, pourrait être ici un indice en faveur de ces mécanismes. Une telle perte de neutre n'a cependant pas été observée dans les expériences de T.Y. Kim et M. Girod.

Fragmentation n'impliquant pas les prolines

Le spectre de photo-dissociation du $[PK26\text{-}P+3H]^{3+}$ présente aussi deux fragments n'impliquant pas une liaison peptidique avec une proline : y_4^+ (m/q = 376) et $(x_2\text{-}H_2O)^+$ (m/q = 226). Nous les avons observés tous les deux en CID (voir annexes A). Le premier met en jeu la rupture de la liaison peptidique entre un acide aspartique (D) et une thréonine (T). Il a été montré que la rupture de la liaison D-X est une voie de fragmentation très basse en énergie [206] et se trouve favorisée dans les expériences de dissociation induite par collisions (CID) [207–209]. La première étape proposée consiste en un transfert de proton depuis le groupement carboxylique COOH de la chaîne latérale de l'acide aspartique vers l'amide de la liaison peptidique de son côté C-terminal. Ce mécanisme pourrait dans notre cas être amorcé après la redistribution de l'énergie du photon UV parmi les modes d'excitation vibrationnelle du peptide. Différents mécanismes ont été proposés [206, 207, 210] pour expliquer la rupture de la liaison D-X, mais en aucun cas le proton transféré depuis l'acide n'est conservé pour former des fragments y^+ de type NH_3^+-X. Ainsi la présence du fragment y_4^+ est cohérente avec la protonation de la chaîne latérale de la lysine (K) à l'extrémité C-terminale. Enfin, le fragment $(x_2\text{-}H_2O)^+$ pourrait être formé par un transfert de proton de la chaîne latérale de cette lysine vers le C=O de la liaison peptidique Gly-Ala [211] pour former un ion metastable x_2. La perte de H_2O peut ensuite provenir de l'oxygène de cette liaison peptidique ou du groupe COOH du C-terminal [212] après transfert de proton.

Nos observations sont donc cohérentes avec la coexistence de fragmentations spécifiques à l'excitation UV via la dissociation homolytique de la liaison peptidique du côté N-terminal des prolines, et de fragmentations non spécifiques se produisant après redistribution de l'énergie dans les modes de vibration du peptide (IVR).

5.2.2.2 Peptide $[PK26\text{-}P+4H]^{4+}$: influence de l'état de charge

La figure 5.2.5 présente le spectre de photo-dissociation du $[PK26\text{-}P+4H]^{4+}$ dans les mêmes conditions expérimentales. Tous les fragments majoritaires correspondent aux ruptures des

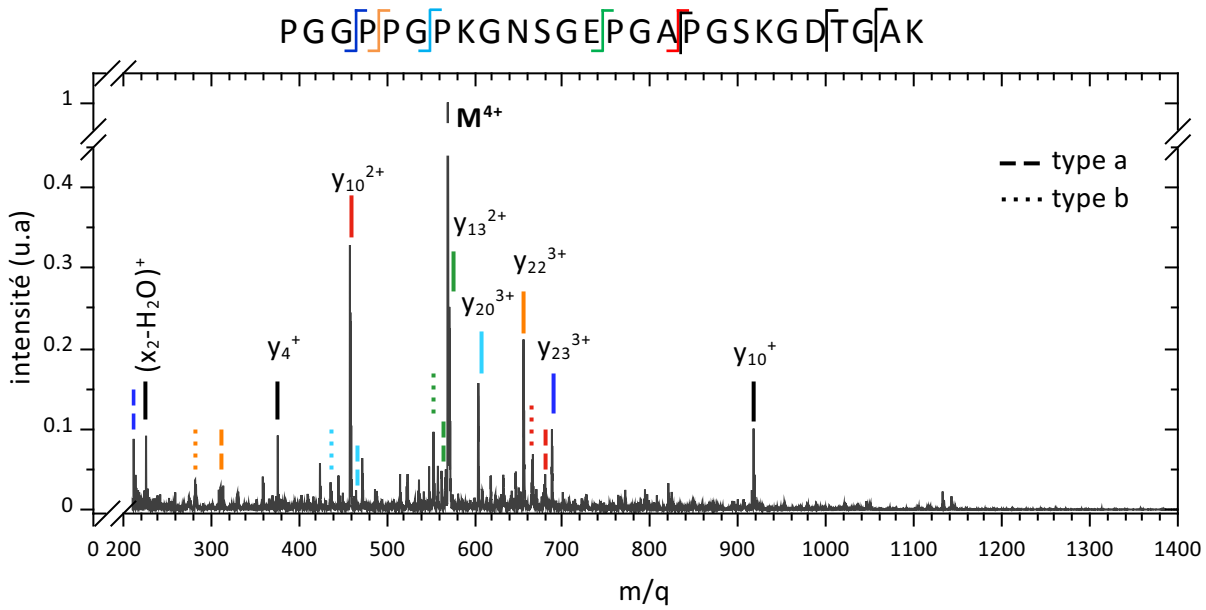


Figure 5.2.5 : *Spectre de masse de photo-dissociation du peptide [PK26-P+4H]$^{4+}$ à 220 nm. Les traits de même couleur correspondent à la rupture de la même liaison peptidique.*

mêmes liaisons peptidiques que dans le cas du peptide triplement protoné. On peut cependant noter que les ions $(a_{13}+2)^{2+}$ et $(b_{13}+2)^{2+}$ ne sont pas formés dans le cas présent. La conformation globale du peptide pourrait être altérée par le proton supplémentaire de telle sorte que la proline #14 (liaison E-P) soit en conformation *cis* dans laquelle les mécanismes de production des ions a+2 et b+2 sont défavorisés [169].

On remarque, comme le présente la figure 5.2.6, que le rapport $y_{10}/(y_{10}\text{-}2)$ est bien plus faible pour l'ion monochargé que pour le doublement chargé. De plus, dans le cas du peptide [PK26-P+4H]$^{4+}$, les deux lysines présentes sur le fragment y_{10} sont selon une très forte probabilité, toujours protonées. Aussi la formation de l'ion y_{10}^{+} implique-t-elle sans doute le transfert du proton d'une lysine vers le fragment complémentaire b_{16}, ce dont les mécanismes de fragmentation présentés en figure 5.2.4 ne parlent pas. Ceci est donc cohérent avec un mécanisme de type CID pour la formation de y_{10}^{+}, qui est effectivement observé dans le spectre de CID (voir annexe A). Après absorption d'un photon, il peut donc y avoir une compétition entre dissociation homolytique produisant des ions y-2 et dissociation induite par un transfert de proton produisant des ions y. On peut noter cependant l'absence du fragment complémentaire b_{16}^{3+} sur ce spectre de masse. Cela pourrait s'expliquer par le fait que le fragment y_{10}^{+} provienne de la dissociation d'ions y metastables plus gros (y_{23}^{3+}, y_{22}^{3+} ou y_{20}^{3+} par exemple) disposant encore d'énergie interne à dissiper, ou par la dissociation secondaire du fragment b_{16}^{3+}. Toutefois, nous n'avons pas pu mettre en évidence de fragments internes des ions y_{23}^{3+}, y_{22}^{3+} et y_{20}^{3+} complémentaires du fragments y_{10}^{+}, qui auraient pu confirmer cette première hypothèse.

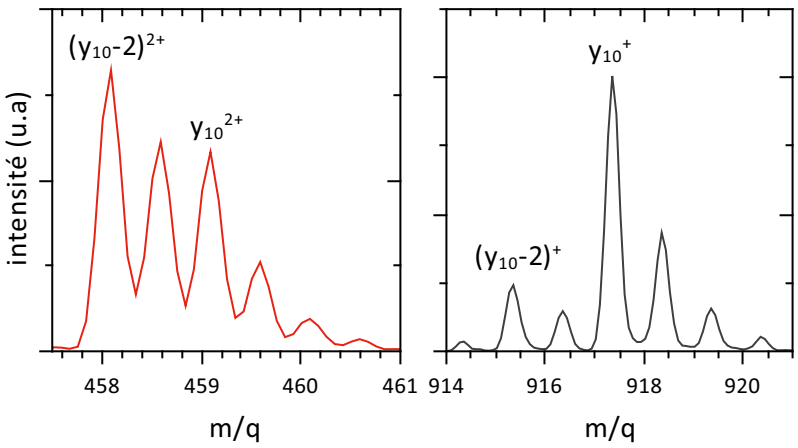


Figure 5.2.6 : *Régions du spectre de photo-dissociation du peptide [PK26-P+4H]$^{4+}$ à 220 nm correspondant aux fragments y_{10}^{2+} et y_{10}^{+}.*

5.2.2.3 Peptides PK26-Hyp : influence de l'hydroxylation

La photo-dissociation des peptides hydroxylés [PK26-Hyp+3H]$^{3+}$ et [PK26-Hyp+4H]$^{4+}$ (spectres de masse présentés en annexe B) montrent exactement les mêmes voies de fragmentation que les peptides [PK26-P+3H]$^{3+}$ et [PK26-P+4H]$^{4+}$. Comme les groupements hydroxyles sont situés sur des prolines, ceci est cohérent avec le fait que les dissociations observées correspondent à des ruptures des liaisons peptidiques et n'impliquent pas les chaînes latérales des acides aminés non-basiques et non-acides. L'hydroxylation n'a donc pas d'effet sur la stabilité ou les voies de relaxation du peptide après irradiation à 220 nm.

En résumé, nous avons observé que la photo-absorption à 220 nm de ces peptides de collagène induit une dissociation des liaisons peptidiques préférentiellement du côté du N-terminal des prolines et produit les ions a, b, y, et a+2, b+2 et y-2 avec différents états de charge. En plus de ces fragments spécifiques à l'absorption d'un photon, des fragments de type CID sont aussi observés, suggérant la cœxistence de différents mécanismes de désexcitation du peptide. Nous avons vu que l'état de charge du peptide pourrait avoir des conséquences sur la conformation des prolines, permettant la formation ou non des ions a+2, b+2 et y-2. Ce point nécessiterait cependant des expériences supplémentaires pour sonder la structure tridimensionnelle des peptides et ainsi tester cette hypothèse. Enfin cette fragmentation systématique observée pour les liaisons peptidiques mettant en jeu chacune des prolines présentes dans le peptide peut être interprétée comme une hyper-sensibilité des protéines de collagène, très riches en prolines, aux photons UV de 220 nm. Ceci pourrait donc être la raison de la forte dégradation du collagène observée par Jariashvili *et co.* [157] en phase liquide à cette même longueur d'onde.

5.2.3 Ionisation et dissociation induites par photon VUV et X

Nous allons discuter dans cette partie de la dissociation du peptide de collagène PK-26 après absorption d'un photon de plus haute énergie, de 14 à 540 eV. Nous allons explorer l'influence de l'énergie du photon absorbé, de l'état de protonation et de l'hydroxylation des prolines sur la dissociation de ce peptide.

5.2.3.1 Peptide [PK26-P+3H]$^{3+}$

La figure 5.2.7 montre les spectres de masse du peptide [PK26-P+3H]$^{3+}$ après absorption d'un photon d'énergie E_φ de 14, 22 ,150, 288 et 538 eV. Comme discuté précédemment dans la section 5.1.3.2, le pic parent noté M^{3+} apparaît négatif. Ces spectres sont clairement différents du spectre de photo-dissociation à 5,6 eV (figure 5.2.2). Contrairement à celui-ci, on observe ici un plus faible nombre de fragments à des rapports m/q inférieurs à celui du M^{3+}. On peut d'ailleurs noter qu'aucun pic n'est observé pour m/q $>$ 759, indiquant qu'aucun grand fragment simplement ou doublement chargé n'est détecté. Pour les photons d'énergie E_φ inférieure à 288 eV, on observe principalement le peptide photo-ionisé radicalaire M$^{4+\bullet}$ (m/q $=$ 569.3) accompagné de pertes de molécules neutres, tandis que des petits fragments a, b, x, y et z du squelette du peptide sont principalement produits dans la gamme des rayons-X ($E_\varphi \geq$ 288 eV). On observe globalement une évolution régulière avec l'énergie du spectre de masse. On peut noter qu'une évolution régulière des spectres de photo-absorption de 10 à 570 eV a également été observée dans le cas de l'oligonucleotide [dGCAT+2H]$^{2+}$ [43] et celui de la vanilline neutre ($C_8H_8O_3$) en phase gazeuse [213].

Composition des spectres de masse

À basse énergie, les pics majoritaires des spectres correspondent au peptide photo-ionisé radicalaire intact M$^{4+\bullet}$ et aux pertes de molécules neutres depuis le peptide parent et le peptide photo-ionisé. Nous observons plusieurs pics à des rapports m/q inférieurs aux peptides M^{3+} et M$^{4+\bullet}$. Ces pics correspondent à -18, -30 et -44 Da pour M^{3+} et -30, -44 et -72 Da pour M$^{4+\bullet}$ et sont cohérents avec des pertes de molécules neutres, comme cela a été observé dans le cas de la substance P [44]. Nous détaillerons l'origine de ces pertes dans la suite. Il n'apparaît qu'une très faible fragmentation du squelette du peptide, représentée par les ions z_1^+ (m/q $=$ 130,2), y_4^+ (m/q $=$ 376,4), z_4^+ (m/q $=$ 359,4), z_{13}^{2+} (m/q $=$ 563,6), b_{13}^{2+} (m/q $=$ 567,1), a_{16}^{2+} (m/q $=$ 665,7) et b_{16}^{2+} (m/q $=$ 679,3).

Pour les photons de plus haute énergie, nous observons principalement la disparition du peptide photo-ionisé intact et une augmentation, avec l'énergie, de l'intensité de petits fragments issus de ruptures de liaisons peptidiques. Le peptide multi-ionisé intact n'est détecté à aucune énergie.

Il est intéressant de noter que malgré l'augmentation de l'intensité des fragments, leur diversité est réduite principalement à quelques ions monochargés composés de 1 à 4 acides

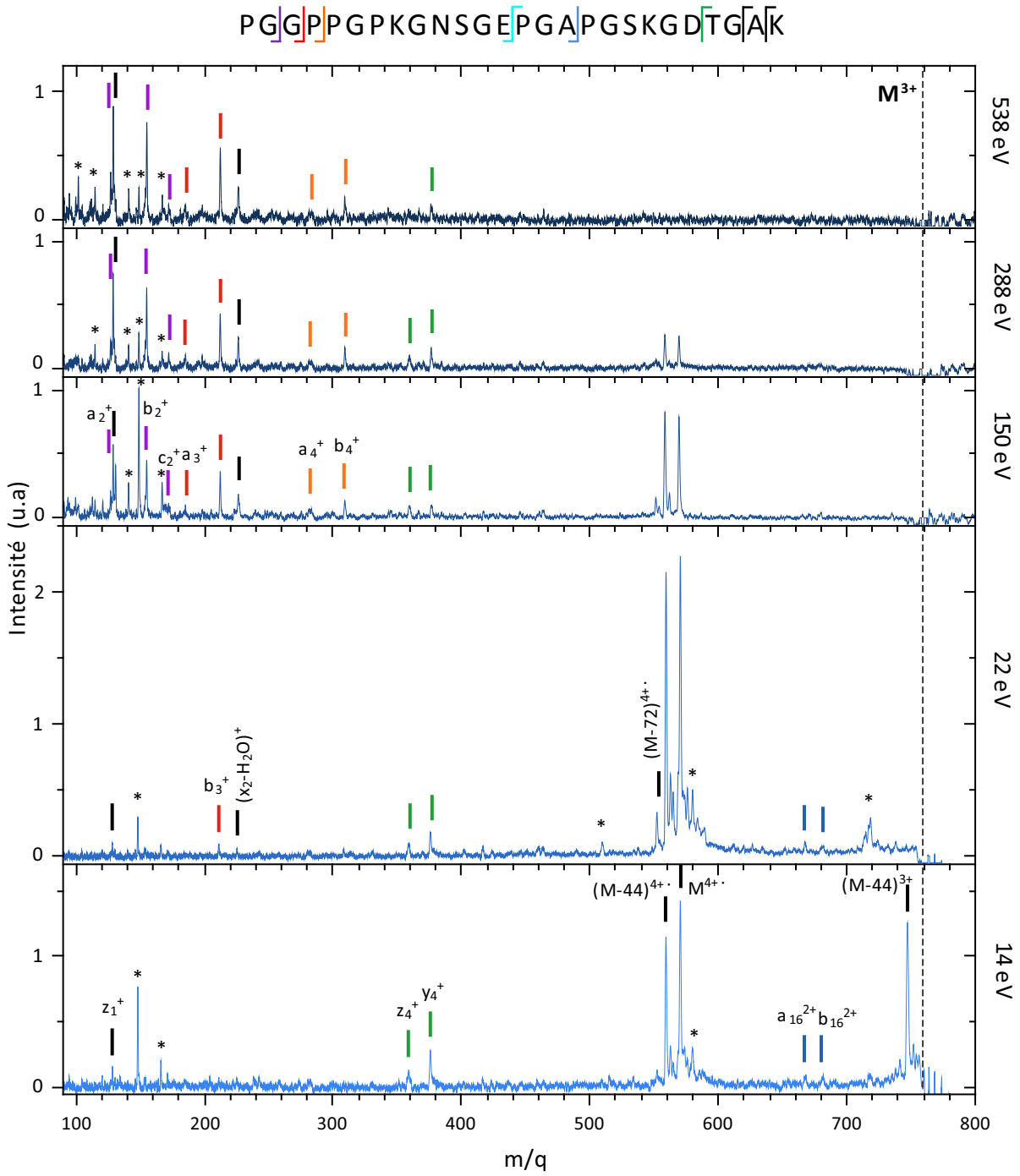


Figure 5.2.7 : *Spectres de masse de photo-absorption du peptide [PK26-P+3H]$^{3+}$ pour 14, 22, 150, 288 et 538 eV. La ligne pointillée représente l'emplacement du pic parent à m/q = 759 d'intensité négative sur ces spectres. Les traits de même couleur correspondent à la rupture de la même liaison peptidique. Les astérisques indiquent des pics de pollutions.*

aminés : les fragments a_2^+ (m/q 127,2), b_2^+ (m/q 155,2), c_2^+ (m/q 172,2), a_3^+ (m/q 184,2), b_3^+ (m/q 212,2), a_4^+ (m/q 281,2), b_4^+ (m/q 309,3), z_1^+ (m/q 130,2), $(x_2\text{-}H_2O)^+$ (m/q

226,3), z_4^+ (m/q 359,4) et y_4^+ (m/q 376,4). Quelle que soit l'énergie du photon absorbé sur la gamme étudiée, nous n'avons observé aucune modification de la nature des fragments produits. Une évolution similaire de la fragmentation avec l'énergie des photons entre 12 et 570 eV a été observée dans le cas de l'oligonucléotide $[dGCAT+2H]^{2+}$ (1175 Da) [43] et de la vanilline neutre (153 Da) [213].

Curieusement, nous pouvons remarquer qu'aucun fragment complémentaire de ces ions n'est présent sur ces spectres. Une raison à cela pourrait être une fragmentation consécutive de ces ions, pouvant produire une variété de fragments neutres et ionisés. Par exemple, les doublets d'acides aminés -Pro-Gly- et -Gly-Pro- apparaissent six fois dans le peptide et la rupture des liaisons C-N de chaque côté forme les ions internes $[C_7N_2O_2H_{10}+H]^+$ (m/q 155,2) qui pourraient contribuer au pic de l'ion b_2^+, qui est de la forme de la forme NH-Pro-Gly-CO $+H^+$. Une autre explication serait que le fait que ces ions, à cause d'une énergie cinétique de recul (KER) trop grande s'échappent du puits de potentiel du piège et soient perdus.

Évolution des voies de relaxation avec l'énergie du photon absorbé

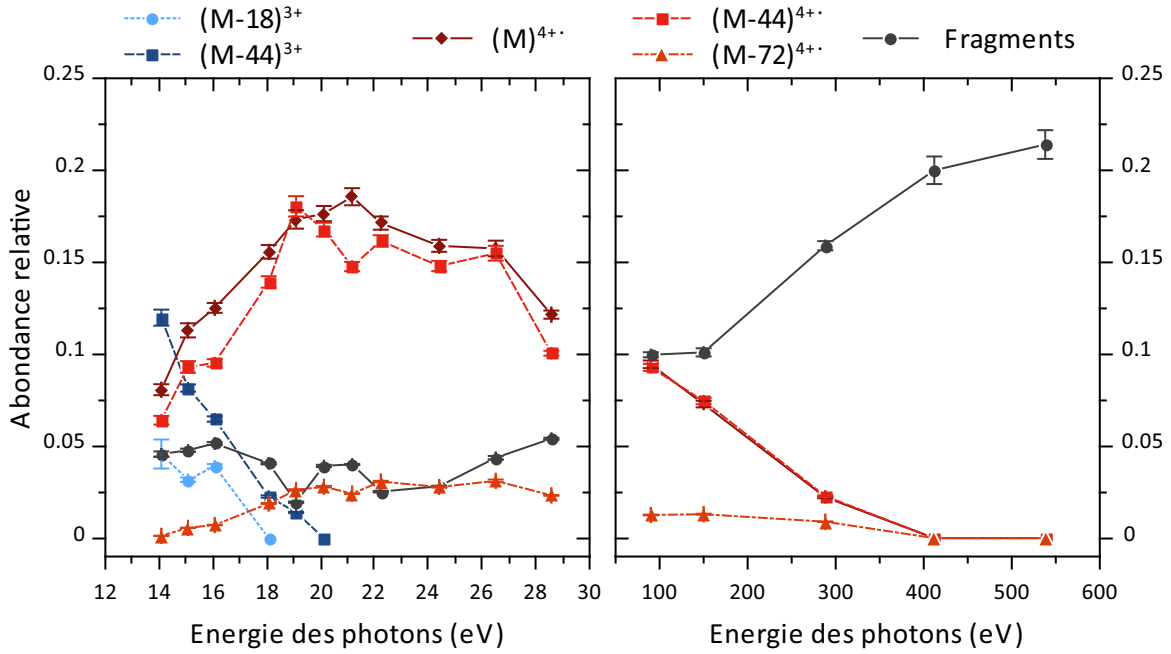


Figure 5.2.8 : *Abondance relative des différents ions formés après absorption d'un photon entre 14 eV et 545 eV par le peptide $[PK26\text{-}P+3H]^{3+}$. L'évolution des fragments représente la somme des fragments majoritaires (z_1^+, a_2^+, b_2^+, b_3^+, $(x_2\text{-}H_2O)^+$, a_4^+, b_4^+, z_4^+ et y_4^+). Les incertitudes sur les aires sont données par ajustement gaussien des pics avec le logiciel Fityk.*

Afin d'avoir une meilleure compréhension des processus menant à la dissociation du peptide, nous allons nous intéresser à l'évolution des voies de relaxation avec l'énergie du photon. La figure 5.2.8 présente les évolutions des intégrales des pics de pertes de molécules neutres depuis

le peptide précurseur $(M\text{-}18)^{3+}$ et $(M\text{-}44)^{3+}$, du peptide photo-ionisé intact $M^{4+\bullet}$ et des pertes de molécules neutres associées $(M\text{-}44)^{4+\bullet}$ et $(M\text{-}72)^{4+\bullet}$, et des fragments de type a, b, x, y et z. Comme les fragments présentent la même évolution, leur somme est représentée sur la figure 5.2.8.

De 14 à 20 eV, on observe la disparition des pertes de molécules neutres depuis l'ion parent, tandis que l'abondance du peptide photo-ionisé $M^{4+\bullet}$ augmente jusqu'à un maximum autour de 21 eV. La perte de 44 Da depuis le peptide photo-ionisé radicalaire intact suit la même évolution que celui-ci, avec un rapport relativement constant quelle que soit l'énergie du photon. Au delà de 22 eV, l'abondance du peptide $M^{4+\bullet}$ diminue doucement jusqu'à disparaître au delà de 300 eV. Les pertes de molécules neutres depuis $M^{4+\bullet}$ suivent cette même tendance. La diminution du pic de photo-ionisation s'accompagne de l'augmentation de l'abondance des fragments peptidiques avec l'énergie du photon. Ce comportement peut avoir au moins deux causes : la première est l'augmentation du dépôt d'énergie interne dans le peptide photo-ionisé $M^{4+\bullet}$ et la seconde est l'apparition de la multi-ionisation du peptide après absorption d'un seul photon énergétique. Nous allons discuter de ces processus par la suite.

Photo-absorption en couche de valence

La composition des spectres de masse à 14 et 22 eV présentés en figure 5.2.7 est globalement en accord avec les spectres de photo-dissociation rapportés pour de plus petits peptides tels que la leucine-enképhaline [45, 182] et la substance P [44] aux mêmes énergies, soit au dessus du seuil d'ionisation. En effet, l'énergie d'ionisation de la leucine-enképhaline a été calculée à 8,87 eV [182], celle de la substance P a été mesurée à 10,3 eV [44]. De plus, les mesures de l'énergie d'ionisation de plus grandes protéines montrent que celle-ci augmente avec l'état de charge du peptide [214], comme dans le cas de l'ubiquitine dont l'énergie d'ionisation est comprise entre $\sim$ 12 et $\sim$ 14 eV pour les états de charge de 4+ à 9+. Le fait que l'on observe le peptide photo-ionisé intact après absorption d'un photon de 14 eV est donc cohérent avec ces résultats. Les études sur la leucine-enképhaline et la substance P révèlent des pertes de molécules neutres depuis l'ion parent et depuis le peptide photo-ionisé intact, ainsi qu'une variété de fragments provenant de ruptures des liaisons peptidiques. Dans le cas de la substance P, les nombreuses pertes de molécules neutres sont attribuées à des pertes de chaînes latérales des différents acides aminés [44]. D'autre part, pour la photo-absorption de la leucine-enképhaline [45], une perte de H_2O de la tyrosine ou du C-terminal, et une perte de 107 Da attribuée à la chaîne latérale de la tyrosine sont observées depuis le peptide parent, pour des photons d'énergie comprise entre 6 et 14 eV. Par conséquent, nous pouvons supposer que les molécules neutres perdues par les peptides M^{3+} et $M^{4+\bullet}$ viennent des chaînes latérales.

Depuis l'ion précurseur M^{3+}, la perte de 18 Da est attribuée à H_2O et peut, dans le cas du peptide PK-26, provenir des chaînes latérales de différents acides aminés contenus dans le peptide (Ser, Thr, Asp et Glu), cependant nous ne pouvons pas écarter ici la possibilité que cette perte provienne du groupe carboxylique de l'extrémité C-terminale. La perte de 44 Da,

attribuée à CO_2, peut quant à elle mettre en jeu les chaînes latérales de l'acide aspartique et/ou de l'acide glutamique. Le fait qu'une telle perte n'ait pas été observée dans le cas de la leucine-enkephaline, qui ne contient pas ces acides aminés, suggère qu'elle ne provient pas du C-terminal. De même, nous attribuons la perte de 30 Da à la molécule CH_2O correspondant à la chaîne latérale de la sérine.

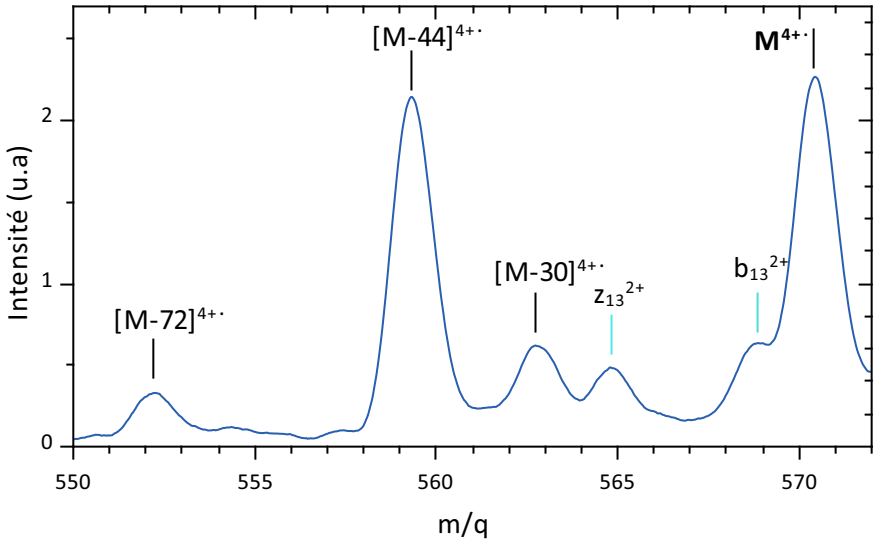


Figure 5.2.9 : *Zoom sur la région de peptide photo-ionisé radicalaire intact $M^{4+\bullet}$ et les pertes de molécules neutres associées pour le spectre de masse obtenu après absorption d'un photon de 22 eV.*

Depuis le peptide photo-ionisé radicalaire (figure 5.2.9), nous pouvons effectuer la même attribution que depuis le peptide parent pour les pertes de 30 et 44 Da. La perte de 72 Da non observée depuis le peptide parent peut correspondre à C_2H_4COO (chaîne latérale de l'acide glutamique) ou à $C_4H_{10}N$ (chaîne latérale de la lysine). Toutefois, on peut noter que la perte de la chaîne latérale de la lysine après photo-ionisation de la substance P n'est pas observée [44], ce qui suggère que cette perte provient de l'acide glutamique.

La diminution rapide de l'abondance des pertes de molécules neutres depuis le peptide parent avec l'augmentation de l'énergie du photon, une tendance opposée à celles depuis le peptide photoionisé, et le fait qu'elles ne soient pas observées ni en CID (voir annexe A) ni à 220 nm, suggère qu'elles sont produites par une photo-excitation dissociative sans ionisation du peptide via des processus hauts en énergie. Cette observation est en accord avec les travaux du groupe J.P. Reilly à 157 nm [31, 33]. À l'inverse, l'abondance de $M^{4+\bullet}$ et des pertes de molécules neutres depuis $M^{4+\bullet}$ suivent la même évolution en fonction de l'énergie du photon absorbé. Ceci suggère plutôt des processus bas en énergie, qui pourraient mettre en jeu le radical créé par l'ionisation du peptide.

A présent, nous allons nous intéresser en particulier à la perte de CO_2 qui est la perte de molécule neutre majoritaire après photo-ionisation. Il a été montré dans le cas des polypeptides radicaux cations $[DGR]^{+\bullet}$ [215] et $[AADAR]^{+\bullet}$ [216] que la perte de CO_2 depuis l'acide

aspartique est la voie de dissociation majoritaire car basse en énergie (la barrière d'énergie potentielle a été calculée à environ 1,3 eV) [215]. De plus, une énergie d'activation de 1,25 eV pour cette voie de dissociation radicalaire, plus basse en énergie que celle de la perte de COOH• et que la fragmentation du squelette du peptide, a été mesurée [217]. Dans le cas du tripeptide radical cation $[DGR]^{+\bullet}$, cette perte de CO_2 est plus abondante depuis la chaîne latérale de l'acide aspartique que depuis le groupe carboxylique de l'extrémité C-terminale [215]. Elle est générée par la migration du radical (électron célibataire) sur le C_α de l'acide aspartique suivie d'un transfert de H depuis le groupement carboxylique de l'acide jusqu'au C_α ou à l'oxygène de la liaison peptidique du côté du N-terminal de l'acide aspartique (figure 5.2.10). On peut noter que cette perte de CO_2 laisse le radical sur le peptide qui peut alors induire de nouvelles réactions radicalaires [218]. Cette perte de CO_2 est aussi observée depuis le peptide radicalaire $[DRVYIHPF+H]^{2+\bullet}$ produit par ionisation du peptide protoné avec un laser IR femtoseconde et est attribuée à une perte de la chaîne latérale de l'acide aspartique [219].

Ainsi, en considérant ces mécanismes de dissociation induits par le radical et compte tenu de l'intensité du pic correspondant observé expérimentalement (figure 5.2.9), l'acide aspartique apparaît comme le site le plus favorable de migration du radical pour le $[PK26\text{-}P+3H]^{4+\bullet}$, pouvant expliquer l'importante abondance de la perte de CO_2 après photo-ionisation, comparable à celle du radical cation intact.

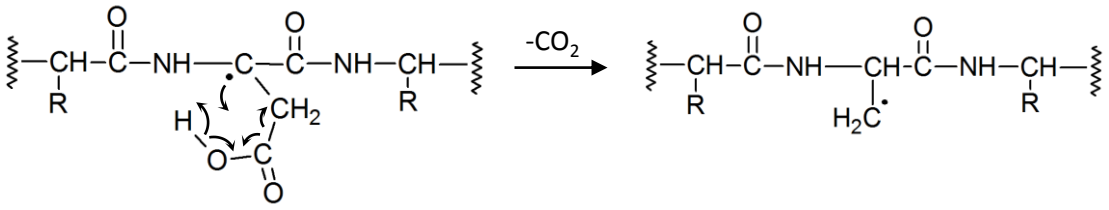


Figure 5.2.10 : *Processus pour la perte de CO_2, depuis la chaîne latérale de l'acide aspartique, initiée par le radical [215].*

Nous pouvons ajouter que dans le cas du peptide radical cation de type z $[H\text{-}AAEEAAR]^{+\bullet}$, les pertes de neutres observées depuis la chaîne latérale de l'acide glutamique correspondent majoritairement aux pertes de $CH_2COOH^\bullet$ (56 Da) et $CH_2CHCOOH$ (72 Da) [216]. Ce dernier est cohérent avec nos observation et donc à notre attribution de la perte de CO_2 à l'acide aspartique. Plusieurs travaux réalisés sur des peptides radicaux cations [220–222] et des peptides ionisés par impact d'électron (20-100 eV) [87] présentent les mêmes pertes de chaînes latérales (Asp, Glu, Ser) que nous observons depuis le peptide PK26 photo-ionisé, ce qui confirme notre hypothèse.

De plus, pour l'attribution de la perte de 72 Da, on peut noter que les pertes de molécules neutres depuis la chaîne latérale de la lysine par des mécanismes radicalaires sont $C_3H_8N^\bullet$ (58 Da) et C_4H_9N(71 Da). Ainsi une perte de 72 Da correspondrait à une perte de la chaîne latérale de la lysine protonée, qui impliquerait une modification de l'état de charge du peptide,

ce qui n'est pas observé. Ceci nous permet de confirmer l'attribution à une perte de la chaîne latérale de l'acide glutamique. On peut aussi noter que dans le cas de l'impact électronique, le peptide ionisé radicalaire perd uniquement des molécules neutres et non des radicaux [87]. Comme les spectres de masse obtenus par ionisation de peptides par photons et par électrons présentent de nombreuses similitudes [44, 87, 88], nous pouvons supposer que des processus similaires ont lieu, ce qui peut expliquer pourquoi nous n'observons pas la perte de $CH_2COOH^{\bullet}$ de l'acide glutamique.

En conclusion, cette analyse suggère que les pertes de chaîne latérale depuis le peptide photo-ionisé impliquent des processus radicalaires. Cette hypothèse est d'ailleurs aussi appuyée par le fait que, dans les expériences d'ionisation de peptides protonés par laser IR femtoseconde, l'observation de pertes de chaîne latérale pour une variété d'acides aminés a également été attribuée à des mécanismes radicalaires [219, 223].

Photo-absorption en couche interne 1s

Le spectre de photo-absorption du $[PK26\text{-}P+3H]^{3+}$ en couche interne du carbone ($E_\varphi =$ 288 eV) ressemble à celui obtenu pour la leucine-enkephaline (557 Da) par O. Gonzalez-Magaña *et co.* [49] à la même énergie. Leurs spectres de masse ne leur permettent pas de différencier le peptide photo-ionisé intact du fragment b_3^+, et ne contiennent pas de pics correspondant au peptide multi-ionisé intact mais présentent une forte proportion de fragments monochargés de petite taille ($m/q < 150$).

En revanche, ces expériences présentent des résultats complètement différents de ceux de A. Milosavljević *et co.* obtenus sur le cytochrome C (12 kDa) [35] et l'ubiquitine (8,5 kDa) [47]. Ces expériences montrent que ces protéines perdent jusqu'à trois électrons après absorption d'un photon et restent majoritairement intactes après photo-ionisation : seules des pertes de CO_2 depuis les protéines photo-ionisées radicalaires ont été observées, mais aucune fragmentation du squelette.

Ainsi, il semble donc que la taille d'une molécule ait un rôle à jouer sur sa stabilité après multi-ionisation par absorption d'un photon X : les plus grands (ubiquitine et cytochrome c) ne fragmentent pas, ce qui peut être dû à leur capacité à répartir l'excès d'énergie dans de plus nombreux degrés de liberté [48] ou à minimiser la répulsion coulombienne induite par l'ionisation multiple, par exemple en se dépliant, de façon plus efficace que pour les plus petits (Leu-enk et PK26-P). Ces observations suggèrent que la production intensive de fragments de faible rapport m/q peut être engendrée par la multi-photo-ionisation. Dans notre cas, comme les fragments observés pour les photons X sont présents dès 25 eV, il est probable que ces fragments proviennent aussi du peptide multi-ionisé. Ces observations font donc apparaître qu'il y a une coexistence des processus d'ionisation simple et multiple sur la large gamme d'énergie de photon étudiée (d'une trentaine à quelques centaines d'eV). Ceci est cohérent avec les résultats de multi-ionisation de protéine par impact d'électrons dans la gamme d'énergie 30 - 100 eV [87, 224] et avec les seuils de double ionisation mesurés pour des petites molécules [225].

En résumé, l'ionisation simple est reflétée dans le cas de ce peptide par la présence du peptide photo-ionisé radicalaire intact accompagné d'une variété de pertes de chaîne latérale, attribuée à des dissociations induites par le radical, dont la perte de CO_2 depuis l'acide aspartique est majoritaire. Toutefois, l'ionisation multiple ne laisse pas ce peptide intact et pourrait se traduire par la formation de fragments de petite taille. De plus, la similitude des fragments produits avec des photons X après excitation des électrons 1s du carbone, de l'azote et de l'oxygène, tend à montrer que le site d'ionisation a peu d'influence sur le type d'ions produits (a, b, c, x, y ou z). C'est donc un effet de l'ajout, par la multi-ionisation, de plusieurs charges positives et/ou sites radicalaires sur le peptide, ainsi que l'augmentation de l'énergie interne déposée avec l'augmentation de l'énergie du photon, qui pourraient être à l'origine de cette fragmentation intense sans mémoire du site d'absorption du photon.

5.2.3.2 Peptide [PK26-P+4H]$^{4+}$: influence de l'état de charge

La figure 5.2.11 présente les spectres de photo-absorption du peptide [PK26-P+4H]$^{4+}$, noté M^{4+}, à 14, 22, 150, 288 et 538 eV. Nous observons le même comportement général que dans le cas du peptide triplement chargé à mesure que l'énergie du photon augmente. À basse énergie on observe majoritairement le peptide photo-ionisé $M^{5+\bullet}$ intact ainsi que les mêmes pertes de molécules neutres depuis les peptides parent et ionisé que pour M^{3+}, la perte de CO_2 étant majoritaire dans tous les cas. Pour des énergies de photon supérieures à 300 eV, $M^{5+\bullet}$ disparaît et les spectres de masse deviennent semblables aux spectres du M^{3+}, avec les fragments majoritaires a_1^+, z_1^+, b_1^+, b_3^+ et $(x_2\text{-}H_2O)^+$.

On observe cependant deux différences notables entre les peptides trois et quatre fois protonés. La première est la plus grande variété de fragments issus de la rupture des liaisons peptidiques. Notamment sur le spectre de photo-absorption à 14 eV, une vingtaine de fragments de types a, b, c, x, y et z sont observés contre seulement cinq fragments sur le spectre de photo-absorption du M^{3+} à la même énergie. La seconde différence est la forte atténuation de la voie de dissociation impliquant la perte de CO_2 depuis le peptide photo-ionisé radicalaire. Comme nous l'avons vu précédemment, la perte de CO_2 depuis la chaîne latérale de l'acide aspartique peut être expliquée par un mécanisme mettant un jeu le radical créé par la photo-ionisation. Dans le cas du M^{4+}, l'ajout d'un proton peut altérer la conformation du peptide, passant d'une structure compacte à une structure plus dépliée. Il a de plus été montré que ce type de modification de structure, liée à l'état de protonation de peptides et de protéines en phase gazeuse, induit une diminution de la capacité de migration des radicaux [226]. Notre observation apparaît donc cohérente avec ce phénomène : la structure dépliée du M^{4+} rendrait le C_α de l'acide aspartique moins accessible au radical et diminuerait donc la probabilité de cette voie de dissociation.

Pour vérifier si la modification de l'état de charge initial du peptide influe effectivement sur sa structure, nous avons réalisé des simulations de dynamique moléculaire par échange de répliques (REMD : *Replica-Exchange Molecular Dynamics* [227]). Les détails de ces simulations sont donnés en annexe C. Les conformations de plus basse énergie obtenues par ces simula-

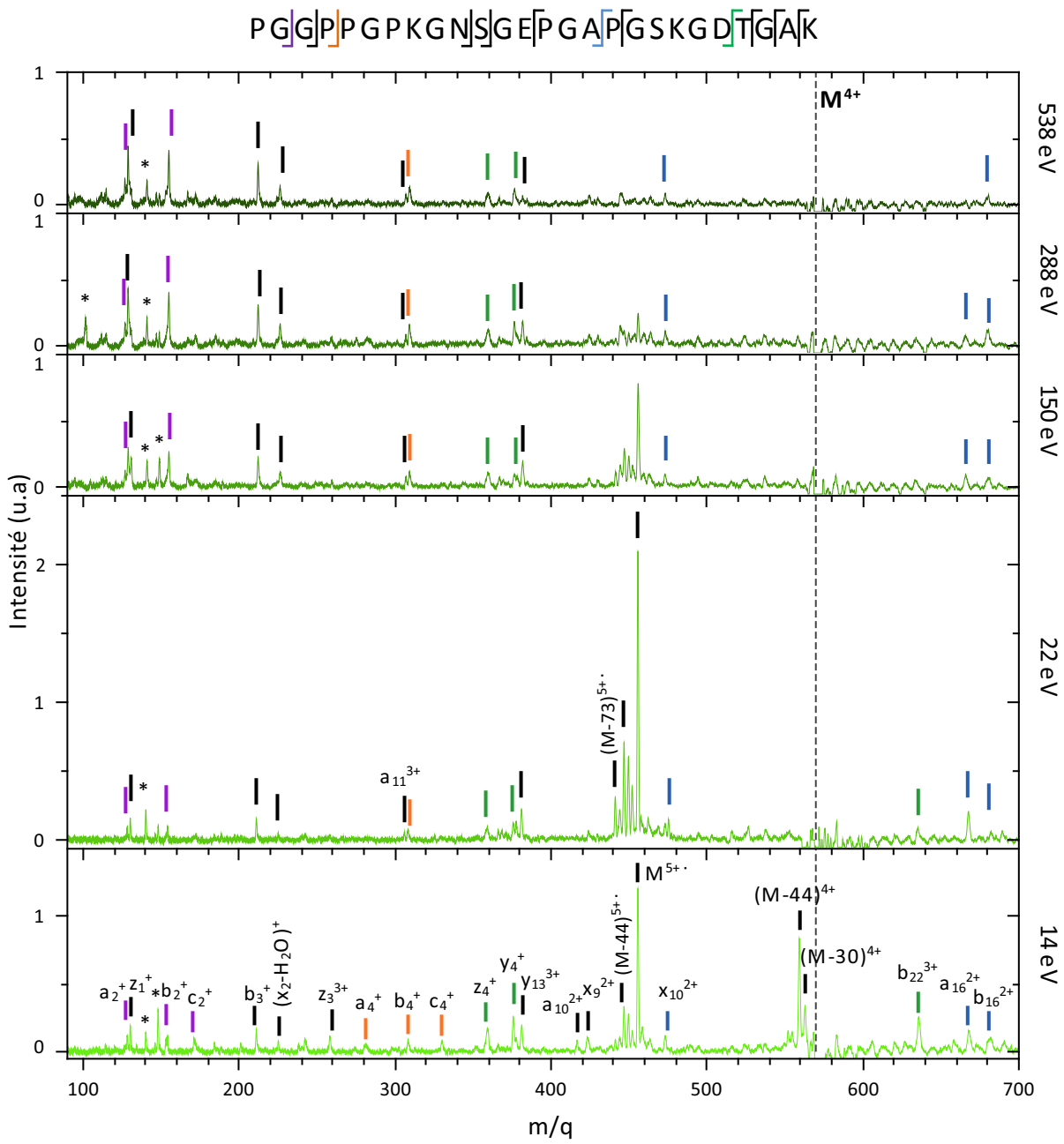


Figure 5.2.11 : *Spectres de masse de photo-absorption du peptide [PK26-P+4H]$^{4+}$ pour 14, 22, 150, 288 et 538 eV. La ligne pointillée représente l'emplacement du pic parent à m/q = 570, apparaissant négatif sur ces spectres. Les traits de même couleur correspondent à la rupture de la même liaison peptidique. Les astérisques indiquent des pics de pollution.*

tions pour les peptides [PK26+3H]$^{3+}$ et [PK26+4H]$^{4+}$, sont présentées dans la figure 5.2.12. La structure de ce dernier apparaît effectivement plus dépliée, confirmant ainsi l'hypothèse précédente.

Il est donc possible ici que le dépliement du peptide par l'ajout d'un proton permette au

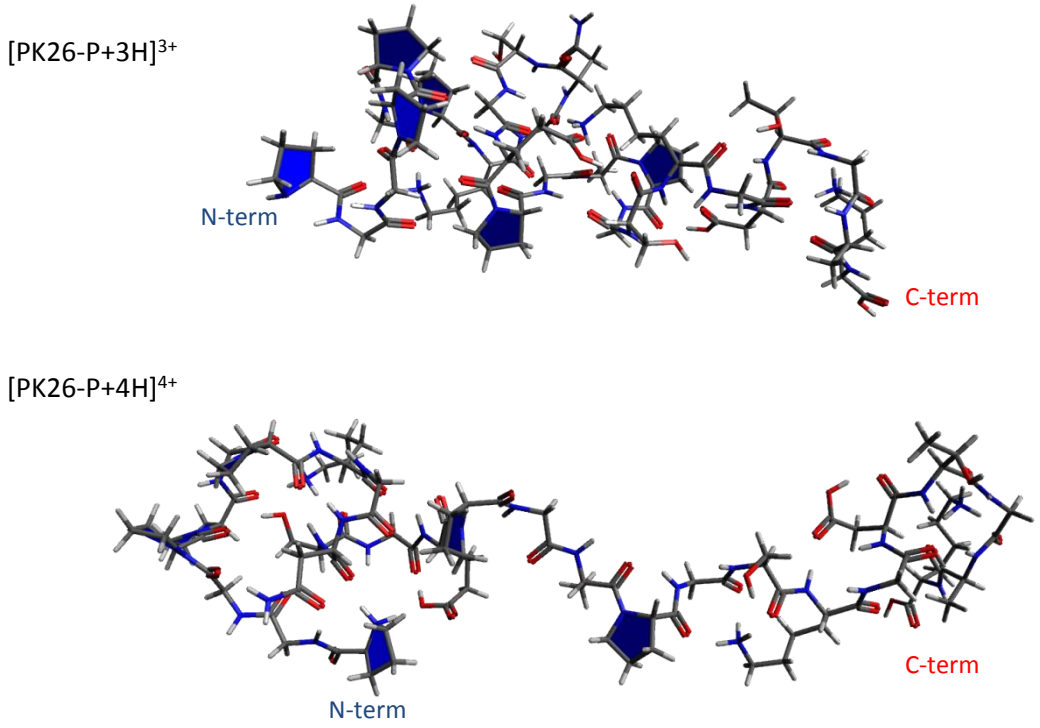


Figure 5.2.12 : *Conformères de plus basse énergie obtenus par calculs REMD. Les trois lysines sont protonées dans le cas du peptide [PK26+3H]$^{3+}$. Le peptide [PK26+4H]$^{4+}$ a un proton supplémentaire sur le N-terminal. Les atomes H, C, N et O sont, respectivement, en blanc, gris, bleu et rouge.*

radical d'accéder à d'autres sites que pour le peptide [PK26-P+3H]$^{3+}$. Ceci pourrait ouvrir de nouvelles voies de dissociation impliquant le radical et être à l'origine de la plus grande variété de fragments observés. Un effet comparable a été observé par Xu *et co.* [215] en substituant, sur le tripeptide [DGR]$^{+\bullet}$, un hydrogène du C_α par un groupement methyl (-CH_3). Cette modification rend le C_α défavorable à la présence du radical et empêche ainsi la perte de CO_2. L'activation (CID) de ce peptide modifié entraîne la formation de l'ion y_2^+ intense, originellement absent du spectre d'activation du peptide [DGR]$^{+\bullet}$.

Un comportement induit par un effet de l'état de charge initial tel que nous l'observons ici, n'a, à notre connaissance, jamais été rapporté dans la littérature dans le cas de la photo-ionisation de peptides dans cette gamme d'énergie.

5.2.3.3 Peptides PK26-Hyp : influence de l'hydroxylation

Comme dans le cas de la photo-absorption dans l'UV à 220 nm, les spectres de masse des peptides hydroxylés [PK26-Hyp+3H]$^{3+}$ et [PK26-Hyp+4H]$^{4+}$ dans la gamme d'énergie des photons VUV et X étudiée, sont globalement similaires à ceux du peptide PK26-P présentés précédemment. Toutefois, les spectres de photo-absorption dans le VUV présentent tout de même

une différence remarquable parmi les pertes de molécules neutres depuis les peptides photo-ionisés : l'augmentation de la perte de H_2O, en particulier pour le peptide $[PK26\text{-}Hyp+4H]^{4+}$.

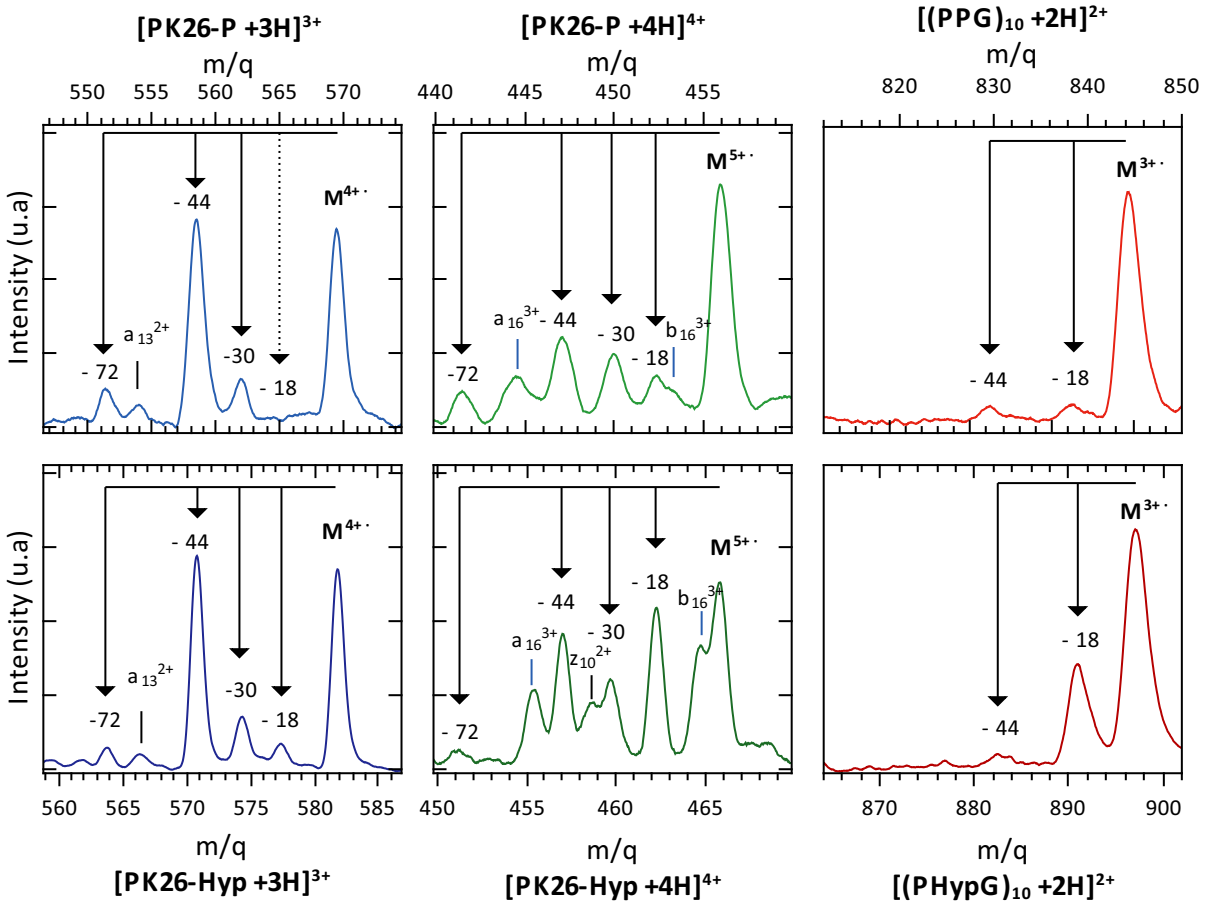


Figure 5.2.13 : *Comparaison des spectres de masse, dans la région du peptide photo-ionisé, pour les peptides $[PK26\text{-}P+3H]^{3+}$, $[PK26\text{-}P+4H]^{4+}$, $[(PPG)_{10}+2H]^{2+}$ et les peptides hydroxylés $[PK26\text{-}Hyp+3H]^{3+}$, $[PK26\text{-}Hyp+4H]^{4+}$, $[(PHypG)_{10}+2H]^{2+}$ après absorption d'un photon de 150 eV.*

Cet effet est mis en évidence dans la figure 5.2.13. Comme décrit précédemment, les spectres de masse des peptides $[PK26\text{-}P+3H]^{3+}$ et $[PK26\text{-}Hyp+3H]^{3+}$ présentent les mêmes pertes de chaînes latérales : CH_2O (30 Da), CO_2 (44 Da) et C_2H_4COO (72 Da), respectivement depuis la sérine, l'acide aspartique et l'acide glutamique. Toutefois, dans le cas du peptide hydroxylé, un pic de faible intensité apparaît et correspond à une perte de H_2O (18 Da) depuis le peptide photo-ionisé radicalaire.

Cet effet est bien plus marqué dans le cas des peptides $[PK26\text{-}P+4H]^{4+}$ et $[PK26\text{-}Hyp+4H]^{4+}$. On peut déjà noter dans le cas du $[PK26\text{-}P+4H]^{4+}$ la présence d'un faible pic attribuable à une perte de molécule d'eau, mais dans le cas du peptide $[PK26\text{-}Hyp+4H]^{4+}$ ce pic devient majoritaire parmi les pertes de molécules neutres depuis le peptide photo-ionisé. Il est aussi intéressant de noter que ceci s'accompagne d'une diminution de l'intensité du peptide ionisé intact, ce qui est cohérent avec sa dissociation. De même que pour les autres pertes de molé-

cules neutres depuis le peptide photo-ionisé, ce pic $[M\text{-}H_2O]^{5+\bullet}$ suit l'évolution avec l'énergie de $M^{5+\bullet}$, ce qui suggère le même type de processus de formation que les autres pertes de chaînes latérales, mettant en jeu le radical formé par la photo-ionisation.

La perte de H_2O par des peptides protonés provient le plus souvent des chaînes latérales de la sérine et de la thréonine, et dans le cas d'activation par CID, implique un transfert de proton qui requiert une certaine mobilité ou proximité de la charge [228–230]. On peut d'ailleurs noter que dans le cas des peptides radicaux cations $GSR^{+\bullet}$ et $GTR^{+\bullet}$ activés par CID, la perte de H_2O est majoritaire devant $OH^\bullet$ (que nous n'observons pas). Cependant, dans notre cas, si ces deux acides aminés étaient impliqués dans la perte de H_2O observée, il ne devrait pas y avoir de différence entre les peptides PK26-P et PK26-Hyp ; cette hypothèse peut donc, a priori, être exclue. De plus, O. González-Magaña *et co.* [186] n'ont pas observé de perte de H_2O par photo-absorption du peptide $YG_{10}F$ au-dessus du seuil d'ionisation, ni depuis les chaînes latérale de ce peptide, ni depuis le groupement carboxyle du C-terminal. D'autre part, K. Gupta *et co.* [231] ont observé une perte de H_2O induite par l'activation (CID) du fragment $[z_{10}+K]^{+\bullet}$ de l'antiamoebine II, contenant deux résidus d'hydroxyproline auxquels ils attribuent cette perte de molécule neutre. Comme ce fragment est chargé positivement par un ion potassium et non par un proton, cette perte est cohérente avec un processus impliquant le radical. Nous pouvons donc faire l'hypothèse que cette perte de molécule d'eau vient de la chaîne latérale de l'hydroxyproline, qui contient un groupement -OH.

Ainsi, l'augmentation de la perte de H_2O lorsque celle de CO_2 diminue entre les peptides $[PK26\text{-}Hyp+3H]^{3+}$ et $[PK26\text{-}Hyp+4H]^{4+}$ peut aussi être attribuée à la diminution de la mobilité du radical. En effet, l'accès à l'une des trois hydroxyprolines réparties dans le peptide devient alors plus probable que l'accès à l'acide aspartique.

Le rôle de l'hydroxyproline dans ce processus a été testé par des expériences supplémentaires réalisées sur les deux peptides modèles $[(PPG)_{10}+2H]^{2+}$ et $[(PHypG)_{10}+2H]^{2+}$, dont la longueur est similaire à celle du peptide PK26 mais ne comprenant que deux chaînes latérales différentes : celles de la proline et de l'hydroxyproline. La figure 5.2.13 présente les spectres de masse de ces deux peptides dans la région du peptide photo-ionisé $M^{3+\bullet}$ obtenus à la même énergie que pour les peptides PK26. Dans le cas du PPG, nous observons deux pics de très faible intensité attribués à des pertes de H_2O et de CO_2 depuis le groupement carboxylique du C-terminal du peptide photo-ionisé puisque seul celui-ci contient un groupement -OH. Dans le cas du PHypG, l'augmentation de la perte d'eau est flagrante, ce qui renforce l'hypothèse formulée précédemment. Il est intéressant de remarquer que malgré les dix hydroxyprolines présentes dans ce peptide, nous n'observons pas la perte de plusieurs molécules d'eau, indiquant que le photon absorbé n'entraîne pas la migration du radical vers un autre site et des dissociations en cascade. Ceci est cohérent avec les résultats de la littérature et ceux obtenus sur le peptide PK26.

Il est intéressant d'interpréter cet effet comme une déshydratation du collagène pouvant déstabiliser sa structure. En effet, l'hydroxyproline est connue pour augmenter la stabilité thermique de la structure en triple hélice du collagène en phase liquide [156,158] (voir section 5.1.1).

La perte du groupement hydroxyle de cet acide aminé peut ainsi entraîner une diminution de la stabilité de la structure et provoquer la désagrégation de l'hélice de collagène. Il serait donc intéressant de pouvoir explorer l'influence de l'hydroxyproline et de sa déshydratation sur la stabilité de la triple hélice en phase gazeuse sur un peptide modèle du collagène. C'est l'objectif d'une étude commencée récemment dans notre groupe.

5.3 Stabilité d'un modèle de la triple hélice du collagène

Pour étudier l'influence de la structure géométrique sur les processus de dégradation du collagène, nous nous sommes récemment intéressés au modèle de la triple hélice du collagène $((PPG)_{10})_3$. Les résultats des expériences d'irradiation par des photons VUV et X sont présentés dans cette section.

5.3.1 Peptide modèle de la triple hélice du collagène $((PPG)_{10})_3$

Comme il a été présenté précédemment dans la section 5.1.1, la protéine de collagène ($\sim$ 300 kDa) est composée de trois sous-unités (monomères) formant une structure hélicoïdale particulière. L'enroulement de cette structure est notamment rendu possible par la répulsion des nombreuses prolines présentes dans les monomères. La répétition de la glycine tous les trois acides aminés permet de créer de nombreuses liaisons hydrogènes entre les monomères, apportant une grande stabilité à la structure entière. On peut ajouter que le fort compactage de cette hélice chasse les chaînes latérales des acides aminés vers l'extérieur de la structure.

Pour étudier les propriétés de la structure particulière en triple hélice du collagène, nous nous sommes intéressés à un peptide modèle de petite taille. Ce modèle de triple hélice, que l'on notera Th par la suite, est un trimère formé de peptides liés de manière non-covalente, chacun étant composé de dix répétitions du motif PPG. Chaque monomère $(PPG)_{10}$ a une masse moyenne de 2531 Da, soit une masse de 7593 Da pour le trimère $((PPG)_{10})_3$. La répétition du motif PPG lui permet de former une structure en triple hélice stable en solution [156–158]. À notre connaissance, ce modèle n'a jamais été étudié en phase gazeuse. On peut noter qu'en l'absence d'acides aminés possédant des chaînes latérales basiques, les azotes des prolines sont les sites de protonation les plus probables.

La figure 5.3.1 présente le spectre de masse en sortie de la source ESI d'une solution du modèle de la triple hélice acquis sur le dispositif *Paultje* (voir section 5.1.3.2). On observe les monomères protonés M^{2+} et M^{3+} aux rapports $m/q = 1266{,}4$ et $844{,}6$ respectivement, ainsi que le trimère protoné Th^{7+} à $m/q = 1085{,}6$. Nous ne pouvons pas être ici certains de la structure du trimère, cependant l'absence de dimère sur ce spectre de masse suggère que ce complexe n'est pas formé par agrégation dans la source. De plus, le fait que la structure en triple hélice de ce peptide soit stable en solution à température ambiante [156] permet de supposer que cette structure est conservée avant le processus de mise en phase gazeuse de la source ESI. On peut rappeler ici que les ions produits dans la source ESI traversent un funnel

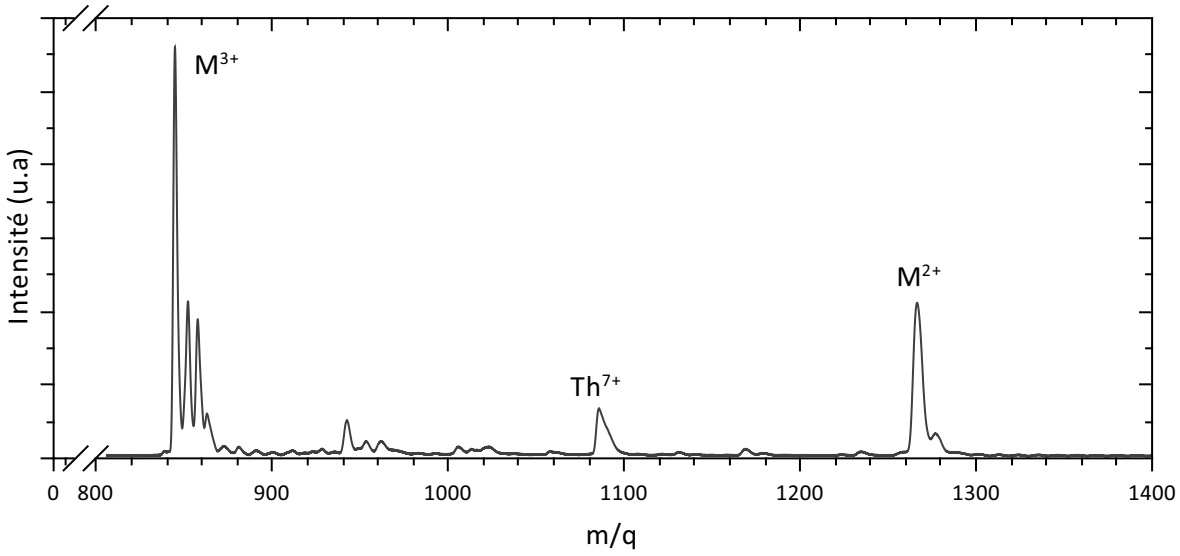


Figure 5.3.1 : *Spectre de masse en sortie de source ESI d'une solution du modèle de la triple hélice $((PPG)_{10})_3$ dans un mélange eau et méthanol (50/50 en volume). Les pics majoritaires correspondent aux monomères deux et trois fois protonés $[(PPG)_{10}+2H]^{2+}$ et $[(PPG)_{10}+3H]^{3+}$ respectivement à m/q = 1266,4 et m/q = 844,6 et noté M^{2+} et M^{3+}. Le modèle de triple hélice protoné $[((PPG)_{10})_3+7H]^{7+}$, noté Th^{7+}, apparaît à m/q = 1085,6.*

à une pression d'environ 0,4 mbar, dans lequel ils subissent un grand nombre de collisions avec le gaz. Ainsi, la présence des monomères sur le spectre de masse nous indique qu'une partie des trimères dissocient en monomères par collisions dans le gaz (CID). Ce type de processus a notamment été décrit dans la littérature pour des complexes non covalents protonés [232–234]. De plus, le fait d'observer les monomères aux états de charge 2+ et 3+ apparaît cohérent avec la distribution statistique la plus probable des protons dans le trimère. On ne peut cependant pas exclure que la dissociation puisse se produire en solution ou pendant la lise en phase gazeuse.

De même que pour le peptide PK26-P présenté précédemment, nous observons distinctement, dans le cas du monomère triplement protoné, les complexes formés par substitution d'un proton par un ion de sodium et de potassium. L'épaulement à la droite du pic correspondant à Th^{7+} suggère que ces complexes sont aussi formés dans le cas du modèle de la triple hélice.

5.3.2 Ionisation et dissociation du monomère $(PPG)_{10}$

Afin de distinguer les effets de la complexation à partir des spectres d'irradiation du modèle de la triple hélice, nous avons réalisé des expériences de photo-absorption sur le peptide isolé $[(PPG)_{10}+3H]^{3+}$ avec des photons VUV de 12 à 28 eV, ainsi qu'à 150 et 288 eV sur le peptide $[(PPG)_{10}+2H]^{2+}$.

5.3.2.1 Peptide $[(PPG)_{10}+3H]^{3+}$, de 12 à 28 eV

La figure 5.3.2 présente les spectres de photo-absorption du peptide triplement protoné pour des photons d'énergies E_φ de 14, 20 et 28 eV. Ces spectres sont similaires à ceux obtenus dans la même gamme d'énergie que pour les peptides $[PK26\text{-}P+3H]^{3+}$ et $[PK26\text{-}P+4H]^{4+}$: nous observons le peptide photo-ionisé radicalaire intact et la fragmentation du squelette.

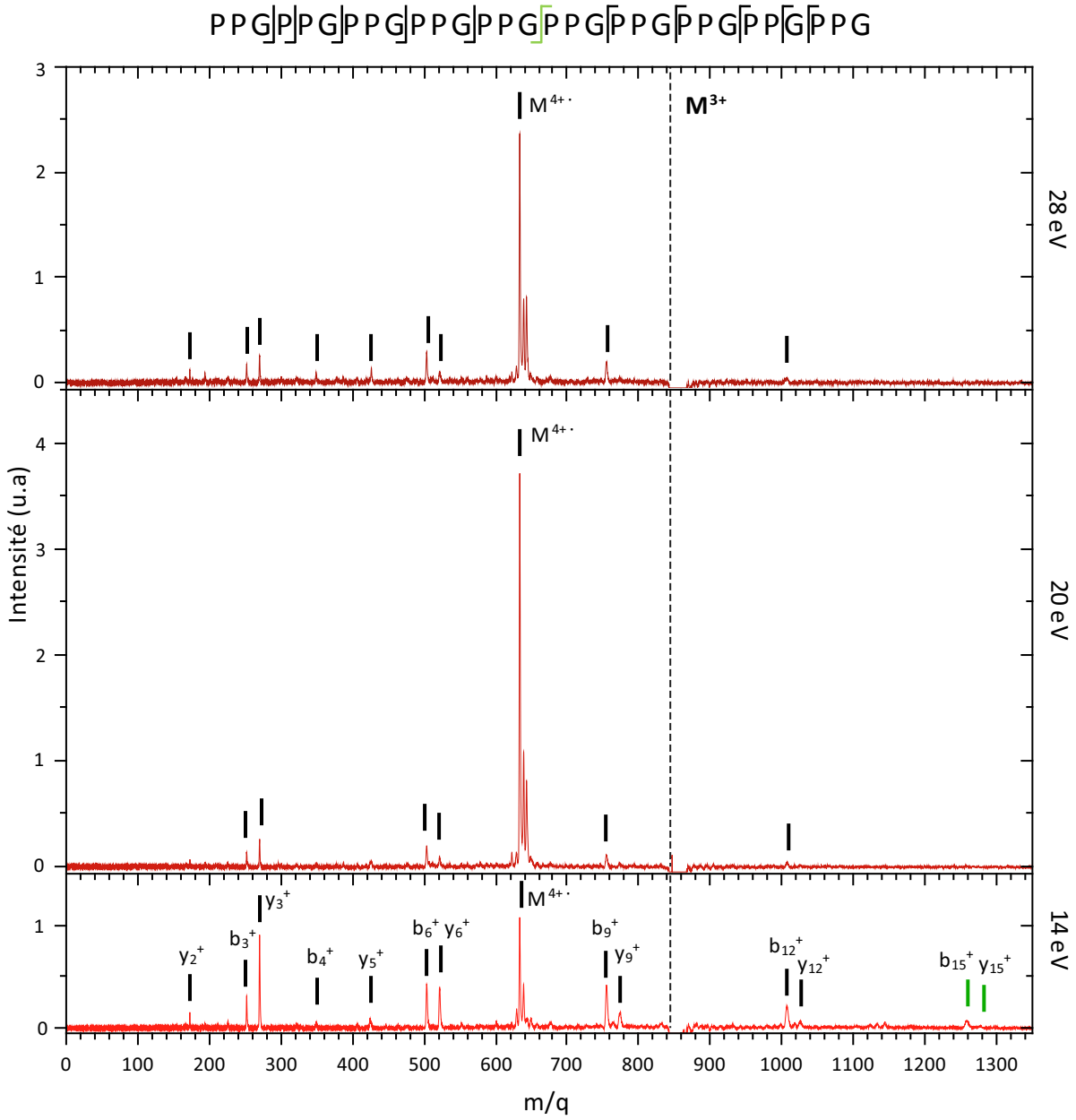


Figure 5.3.2 : *Spectres de masse de photo-absorption du peptide $[(PPG)_{10}+3H]^{3+}$ pour 14, 20 et 28 eV. La ligne pointillée représente l'emplacement du pic parent à $m/q = 844{,}6$ d'intensité négative sur ces spectres. Les traits de même couleur correspondent à la rupture de la même liaison peptidique.*

À 14 eV, le spectre est dominé par des fragments produits par des ruptures de liaisons peptidiques réparties sur l'ensemble du squelette. Nous observons les fragments y_2^+ (m/q = 173), b_4^+ (m/q = 349) et y_5^+ (m/q = 424) peu intenses, venant s'ajouter à une série de fragments, majoritaires, attribués à b_{3n}^+ et y_{3n}^+ (n = 1 à 5), s'étendant sur toute la gamme de m/q présenté. En augmentant l'énergie du photon de 14 à 28 eV, la fragmentation du peptide est réduite et les spectres deviennent fortement dominés par le pic correspondant au peptide photo-ionisé radicalaire intact $M^{4+\bullet}$ à m/q = 663,4. Ce pic est accompagné à sa droite des complexes avec Na, K et/ou H_2O (figure 5.3.3). Les intensités relatives de ces pics par rapport à celle du $M^{4+\bullet}$ sont identiques à celles des complexes avec le peptide parent avant ionisation présentés dans le spectre de la figure 5.3.1, suggérant que la photo-ionisation ne provoque pas la dissociation de ces complexes non-covalents.

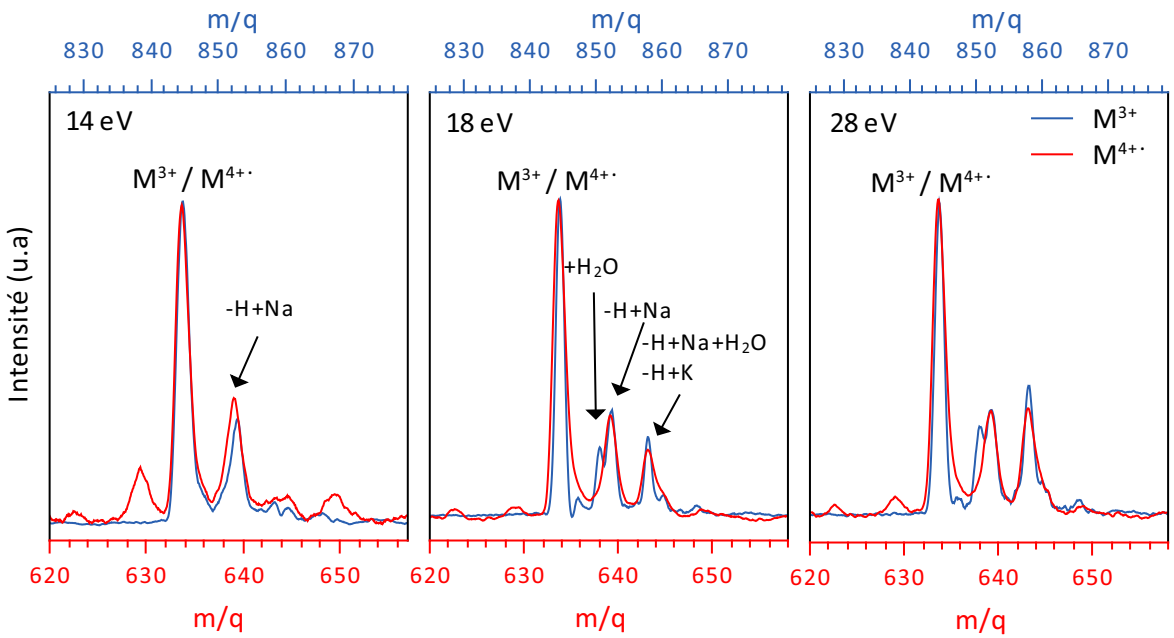


Figure 5.3.3 : *Comparaison des pics correspondants au peptide parent M^{3+} (bleu, abscisse supérieure) et au peptide photo-ionisé intact $M^{4+\bullet}$ (rouge, abscisse inférieure) après absorption d'un photon de 14, 18 et 28 eV.*

Il est intéressant de remarquer que nous observons une perte de H_2O très peu intense depuis le peptide parent sur le spectre à 14 eV (elle est plus intense à 13 eV, voir la figure 5.3.4). De même, nous observons, avec de très faibles abondances, des pertes de molécules neutres depuis le peptide photo-ionisé, correspondant à H_2O et CO_2. Comme ce peptide ne possède pas de chaîne latérale pouvant correspondre à ces pertes de molécules neutres, nous les attribuons au groupe COOH du C-terminal. Ceci est cohérent avec les observations du peptide PK26-P et PK26-Hyp dont les pertes de H_2O et de CO_2 plus intenses ont été attribuées à des pertes de chaînes latérales du peptide et non au C-terminal.

On peut noter que les fragments b_{3n}^+ et y_{3n}^+ peuvent être produits par fragmentation secondaire des ions de types y_{3m}^+ avec m > n. Ceci pourrait expliquer pourquoi nous obser-

vons une augmentation de l'intensité des fragments lorsque n diminue. De plus, à cause de la répétition du motif PPG dans le peptide, les pics correspondant aux fragments b_{3n}^{+} peuvent présenter une contribution des fragments b_{6n}^{2+} qui possèdent des rapports m/q identiques. On note aussi qu'à l'exception du fragment y_3^{+} qui est le fragment majoritaire sur ce spectre, les fragments b_{3n}^{+} sont toujours plus intenses que les y_{3n}^{+}, suggérant une plus faible stabilité de ces derniers et leur fragmentation successive pouvant, au bout du compte, mener à la production de l'ion y_3^{+}. Cette série de fragments est formée par ruptures des liaisons peptidiques Gly-Pro, en accord avec des études menées sur ces peptides irradiés en phase liquide par rayonnement UV [157]. La liaison Gly-Pro semble donc être plus fragile que la liaison peptidique Pro-Gly, ceci étant cohérent avec le site de rupture préférentiel du côté du N-terminal des prolines [204, 205].

Pour obtenir davantage d'informations sur la réponse de ce peptide à l'absorption d'un photon VUV, nous montrons dans la figure 5.3.4 l'évolution de l'abondance du peptide photo-ionisé intact $M^{4+\bullet}$ et des fragments en fonction de l'énergie du photon, de 12 à 28 eV. Comme les différents fragments du squelette du peptide ont la même évolution en fonction de l'énergie, nous présentons également la somme de leurs abondances sur la figure 5.3.4. Pour $E_{\varphi} < 14$ eV, la pollution des photons de plus haute énergie des harmoniques supérieures du rayonnement synchrotron contribue abondamment à la production du peptide photo-ionisé mais est négligeable pour celle des différents fragments. L'abondance du peptide photo-ionisé n'est donc pas représentée sur ce graphique en-deçà de 14 eV.

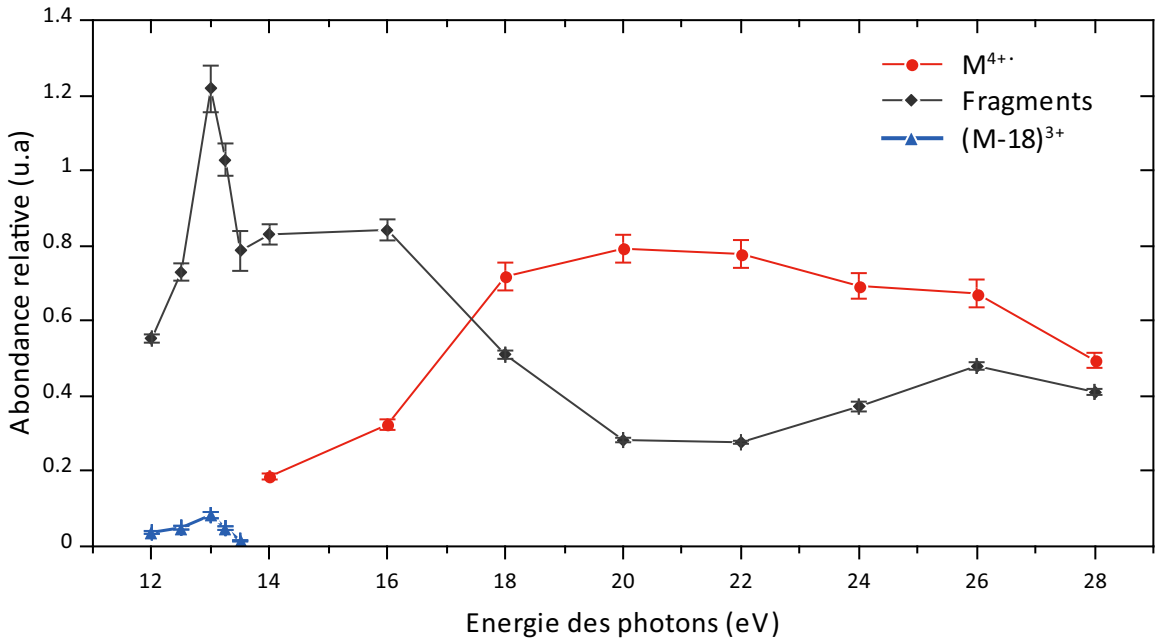


Figure 5.3.4 : *Abondances relatives des différents ions formés après absorption d'un photon entre 12 eV et 28 eV par le peptide $[(PPG)_{10}+3H]^{3+}$.*

Nous observons pour l'évolution du photo-ion intact $M^{4+\bullet}$ la même tendance que dans le cas du peptide $[PK26\text{-}P+3H]^{3+}$: son abondance augmente avec l'énergie du photon jusqu'à

environ 20 eV puis diminue doucement. Pour les fragments, nous observons la tendance inverse : leur abondance diminue avec l'énergie du photon absorbé, les courbes se croisant autour de 17 eV. Ceci suggère que la fragmentation n'est pas due à l'ionisation du peptide pour des photons d'énergie inférieur à 20 eV. Ce comportement est globalement cohérent avec le cas du [PK26-P+3H]$^{3+}$ où la photo-ionisation entraîne majoritairement des pertes de molécules neutres et peu de fragmentation du squelette.

L'évolution de la fragmentation du peptide [(PPG)$_{10}$+3H]$^{3+}$ présente un maximum de production piqué à 13 eV surplombant une structure plus large centrée autour de 15 eV. Comme la fragmentation et la photo-ionisation présentent des dépendances en énergie opposées,nous pouvons attribuer ces structures à des transitions vers de hauts états d'excitation électronique du peptide sans ionisation. De telles structures ont été observées dans le cas de la leucine-enképhaline [182], présentant un maximum local à 15 eV et une structure large centrée autour de 20 eV. Ces structures sont toutefois significativement plus haute en énergie que la transition électronique $\pi - \pi^*$ résonante du squelette peptidique prédite autour 8-9 eV [235, 236]. Un tel pic de photo-dissociation centrée à 13 eV, comme dans notre cas, a été observé dans le cas du cyclopropane neutre par le peuplement d'un état électronique hautement excité via une transition $\pi\sigma^*$ [237–239]. Tout comme le cyclopropane, la chaîne latérale de la proline est cyclique et aliphatique, ce qui suggère qu'une telle transition est à l'origine du pic observé à 13 eV, dont la grande intensité est, de plus, cohérente avec la composition en proline de ce peptide : 20 des 30 acides aminés du peptide sont des prolines.

Il a aussi été observé que le rendement de la photo-dissociation de molécules organiques neutres diminue en même temps que celui de la photo-ionisation augmente dans la gamme d'énergie de photon VUV de 10 à 20 eV, ce qui a été attribué à la convergence des états hautement excités de la molécule neutre vers l'état fondamental de la molécule ionisée [240]. Ainsi, la coexistence à une énergie de photon donnée de l'excitation et de la dissociation du peptide suggère qu'un unique photon peut sonder une gamme d'orbitales moléculaires de valence. Ceci apparaît cohérent avec les résultats expérimentaux de photo-émission de bande de valence de la proline [192] et de dipeptides cycliques contenant une proline [241].

5.3.2.2 Peptide [(PPG)$_{10}$+2H]$^{2+}$, à 150 et 288 eV

Les spectres de la figure 5.3.5 sont, pour l'instant, les seules acquisitions réalisées sur le monomère (PPG)$_{10}$ sur la ligne de photons X *U49-2_PGM-1*, et présentent la photo-absorption du peptide doublement protoné [(PPG)$_{10}$+2H]$^{2+}$ à 150 et 288 eV (électrons 1s du carbone). Ces spectres présentent des similitudes avec ceux des peptides [(PPG)$_{10}$+3H]$^{3+}$ et PK26-P. Nous observons le pic correspondant au peptide photo-ionisé radicalaire intact M$^{3+\bullet}$ (m/q = 844,6), mais n'observons aucun pic correspondant au peptide ionisé plusieurs fois intact. Comme pour le peptide [(PPG)$_{10}$+3H]$^{3+}$ pour des photons VUV, nous observons les fragments b_4^+, y_5^+ et la série b_{3n}^+ et y_{3n}^+ avec n = 1 à 4 ce qui est cohérent avec la fragilité de la liaison Gly-Pro et suggère que l'état de charge n'altère pas la sélectivité de ces sites de fragmentation. Ces

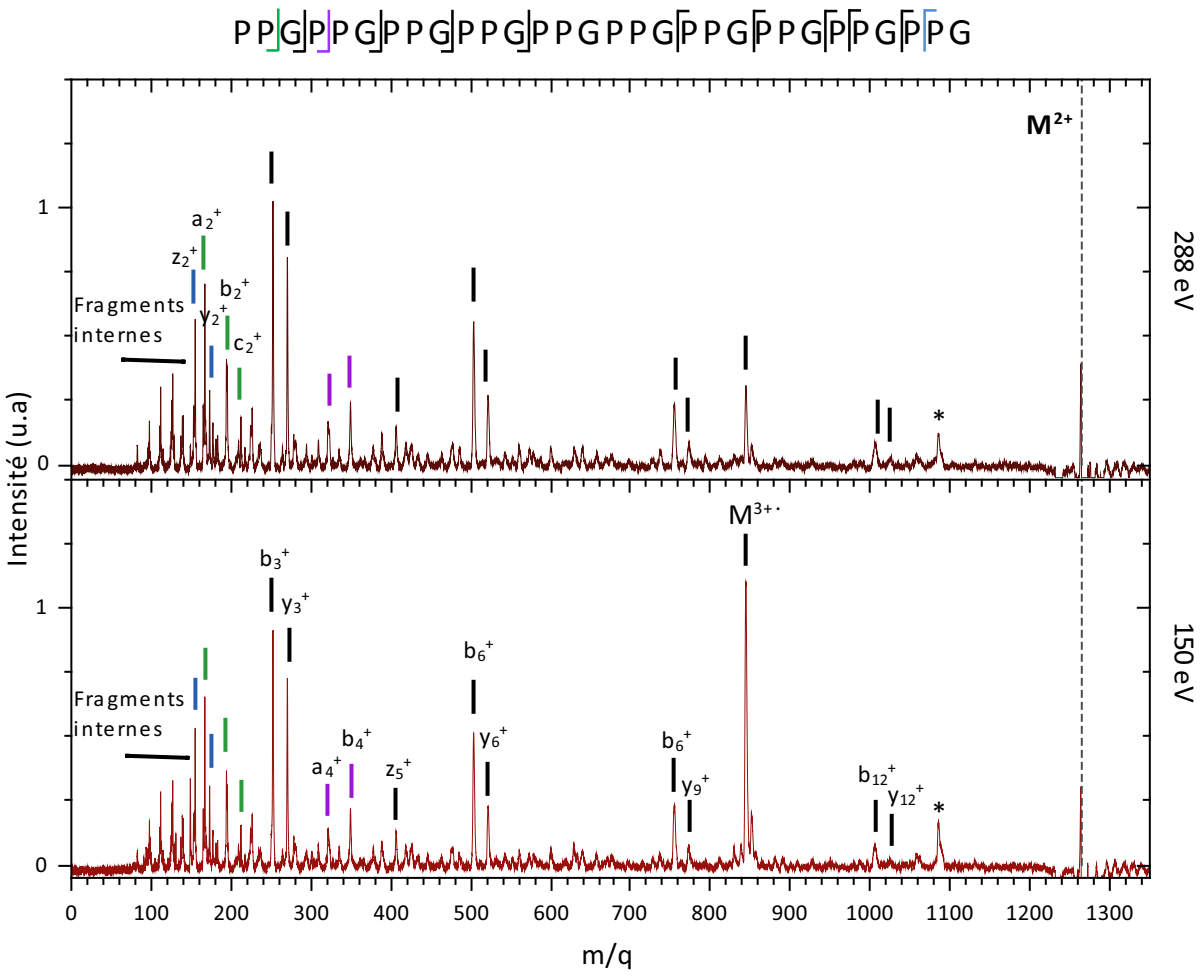


Figure 5.3.5 : *Spectres de masse de photo-absorption du peptide $[(PPG)_{10}+2H]^{2+}$ pour 150 et 288 eV. La ligne pointillée représente l'emplacement du pic parent à m/q = 1266,4, négatif sur ce spectre. Les traits de même couleur correspondent à la rupture de la même liaison peptidique. Les astérisques indiquent des pics de pollutions.*

spectres diffèrent pourtant des spectres VUV par l'apparition de nombreux fragments dans une gamme de m/q inférieure à 250. Nous attribuons ces pics aux fragments z_2^+ (m/q = 156), y_2^+ (m/q = 173), a_2^+ (m/q = 167), b_2^+ (m/q = 195), c_2^+ (m/q = 212) b_1^+ (m/q = 98). Quelques pics à m/q inférieur à 150 correspondent à des fragments internes contenant tous un seul résidu de proline : $z_{3n-1}x_{3n}$ (m/q = 140), $z_{3n-2}x_{3n-1}$ (m/q = 139), $x_{3n-1}z_{3n+1}$ (m/q = 111), et $b_k a_{k-1}$ (m/q = 125) et $b_k a_{k+2}$ (m/q = 126), où k n'est pas un multiple de 3. Ces petits fragments proviennent de ruptures des liaisons peptidiques Pro-Pro et Pro-Gly. Cet aspect de la fragmentation du peptide est tout à fait cohérent avec nos observations sur le peptide PK26, dont la taille est comparable à celle de $(PPG)_{10}$, après absorption d'un photon de 150 eV ou d'énergie supérieure. Le fait que nous n'observions pas ici non plus le peptide intact plusieurs fois ionisé suggère que ces fragments proviennent également de la dissociation du peptide après multi-ionisation et par l'augmentation de l'énergie déposée par le photon.

5.3.3 Ionisation et dissociation du modèle de triple hélice $((PPG)_{10})_3$

Pour étudier le rôle de la complexation sur l'ionisation et la fragmentation du modèle de la triple hélice du collagène $((PPG)_{10})_3$ (noté Th) en phase gazeuse, nous avons réalisé des expériences de photo-absorption sur une gamme d'énergie de photon s'étendant de 14 à 288 eV. Les résultats présentés dans cette section ont été obtenus par irradiation du trimère isolé $[((PPG)_{10})_3+7H]^{7+}$ de rapport m/q = 1085,6.

La figure 5.3.6 présente les spectres de masse acquis pour E_φ = 14, 22, 150 et 288 eV. D'un point de vue général, le comportement du trimère modèle de la triple hélice après photo-absorption suit celui observé pour les différents peptides présentés jusque là. À basse énergie, le trimère photo-ionisé intact $Th^{8+\bullet}$ (m/q = 950) domine, alors qu'à haute énergie, pour des photons de 150 et 288 eV, les spectres de masse présentent une forte fragmentation donnant principalement des ions de faible masse. Nous observons également les pics de m/q = 1266,4, 844,6 et 663,4 et attribués, respectivement, aux monomères M^{2+}, M^{3+} et M^{4+}.

De la même façon que pour le monomère $(PPG)_{10}$, la fragmentation intra-moléculaire du trimère produit les ions b_{3n}^+ et y_{3n}^+ (n = 1 à 5), par rupture des liaisons Gly-Pro le long du peptide. À 150 et 288 eV, nous observons aussi l'apparition de nombreux fragments correspondant à des ruptures de liaisons Pro-Pro et Pro-Gly à des rapports m/q inférieurs à 250. Ces fragments sont, là aussi, les mêmes que ceux observés dans le cas du monomère, et sont attribués aux ions b_1^+, z_2^+, y_2^+, a_2^+ , b_2^+, c_2^+, a_4^+, b_4^+, z_5^+ et y_5^+ ainsi qu'aux fragments internes $z_{3n-1}x_{3n}$, $z_{3n-2}x_{3n-1}$, $x_{3n-1}z_{3n+1}$, et $b_k a_{k-1}$ et $b_k a_{k+2}$, où k n'est pas un multiple de 3. Cependant malgré la similarité des spectres de photo absorption du trimère et du monomère à 150 et 288 eV, on peut noter que les intensités relatives de ces petits fragments est réduite dans le cas du trimère.

On remarque que comme dans le cas du monomère $(PPG)_{10}$, les complexes non covalents entre le trimère et des ions de sodium et potassium restent intacts après ionisation. Ceci est illustré par la figure 5.3.7 dans laquelle sont superposés les pics Th^{7+} et $Th^{8+\bullet}$ pour 14, 22 et 150 eV, et confirme que l'ionisation n'entraîne pas la dissociation de ces complexes. La présence du peptide photo-ionisé $Th^{8+\bullet}$ dès 14 eV est cohérente avec le seuil d'ionisation mesurée à environ 13 eV de l'ubiquitine sept fois chargée, une protéine de taille similaire [60].

La présence des monomères M^{2+} et M^{3+} sur le spectre de masse obtenu à 14 eV est cohérente avec le spectre de masse en sortie de la source ESI présenté précédemment en figure 5.3.1, dans lequel nous attribuons la présence de M^{2+} et M^{3+} à une dissociation de la triple hélice par collisions avec le gaz dans le funnel. Il est donc probable que ces monomères observés après photo-absorption résultent de la dissociation inter-moléculaire du peptide.

À 288 eV, le spectre est dominé par la photo-dissociation. Nous observons des pics intenses correspondant aux monomères M^{2+}, M^{3+} et M^{4+}. En supposant que le trimère est effectivement composé de monomères doublement et triplement protonés, la présence du monomère M^{4+} peut s'expliquer par la dissociation de $Th^{8+\bullet}$ en monomères après ionisation d'un peptide M^{3+} au sein du trimère. De même, nous n'observons pas de monomère M^{5+} qui serait formé par la double-

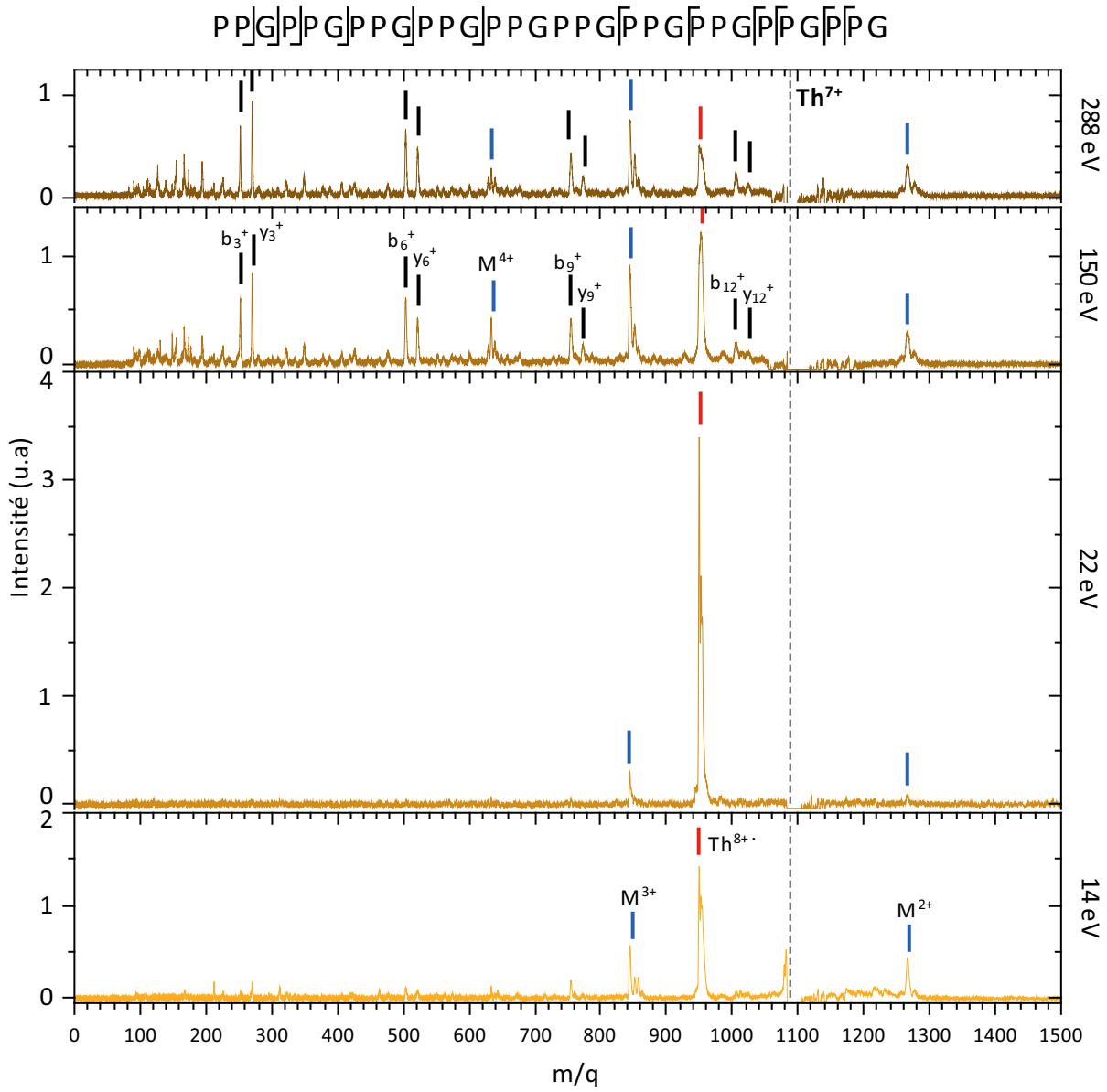


Figure 5.3.6 : *Spectres de masse de photo-absorption du modèle de la triple hélice du collagène $[((PPG)_{10})_3+7H]^{7+}$ pour 14, 22, 150 et 288 eV. La ligne pointillée indique l'emplacement du pic parent Th^{7+} à $m/q = 1085{,}6$, apparaissant négatif sur ces spectres. Le complexe photo-ionisé intact $Th^{8+\bullet}$ est indiqué par un trait rouge à $m/q = 950$. Les monomères M^{2+} ($m/q = 1266{,}4$), M^{3+} ($m/q = 844{,}6$) et M^{4+} ($m/q = 633{,}7$) sont repérés par des traits bleus. Les fragments autres que les séries b_{3n}^+ et y_{3n}^+ ne sont pas identifiés sur les spectres mais sont notés sur le schéma en entête (voir dans le texte).*

ionisation de M^{3+}, nous pouvons donc supposer que la double photo-ionisation du peptide M^{2+} ne contribue pas au pic du M^{4+}. Ceci serait dû à un processus de dissociation précédent une multi-ionisation. Toutefois, il est surprenant de ne pas observer de trimère doublement ionisé $Th^{9+\bullet\bullet}$ compte tenu de la masse de ce système (7,6 kDa), relativement proche de celle de

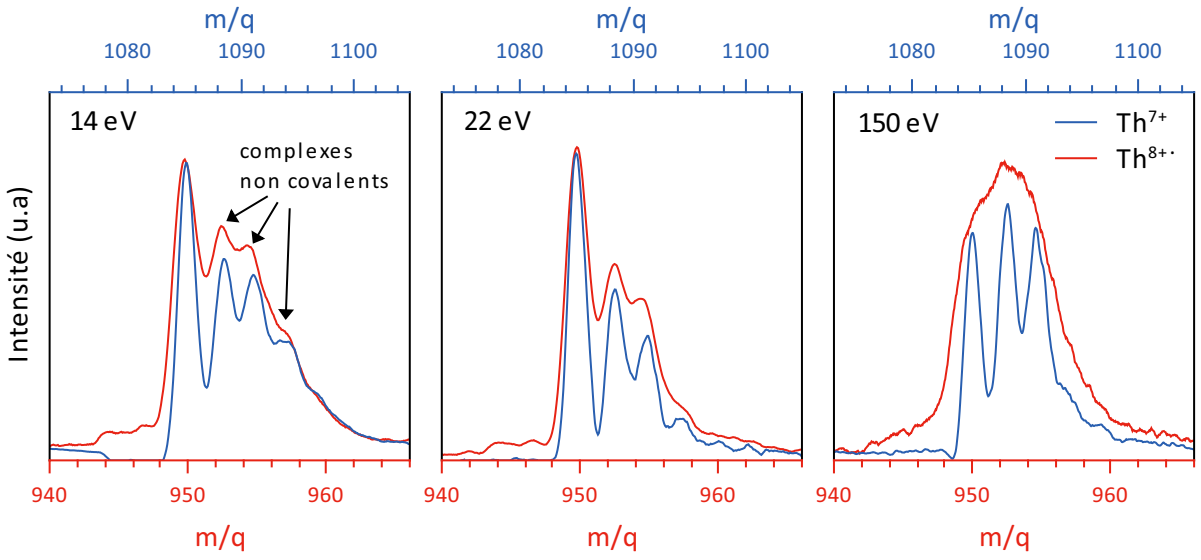


Figure 5.3.7 : *Comparaison des pics correspondant au peptide parent Th^{7+} (bleu, abscisse supérieure) et au peptide photo-ionisé intact $Th^{8+\bullet}$ (rouge, abscisse inférieure) après absorption d'un photon de 14, 22 et 150 eV.*

l'ubiquitine (8,5 kDa), une protéine qui, elle, survit à la multi-photo-ionisation [47]. Cela pourrait être dû au fait que la double ionisation dépose systématiquement beaucoup d'énergie interne dans le système, dont les liaisons hydrogènes sont alors rompues. Ceci entraîne la dissociation en monomères d'un trimère, tandis que les protéines peuvent rester intactes, même sans leurs liaisons hydrogènes.

La figure 5.3.8 permet de rendre compte de l'évolution des processus d'ionisation et de dissociation du système en fonction de l'énergie du photon absorbé, entre 14 et 288 eV. Comme détaillé précédemment, à 14 eV, la photo-ionisation est le processus dominant face aux fragmentations inter- et intra-moléculaire. Lorsque l'énergie du photon absorbé augmente jusqu'à 20-22 eV, le rendement de la photo-ionisation augmente jusqu'à un maximum tandis que les fragmentations inter- et intra-moléculaires diminuent, en accord avec les observations faites dans le cas du monomère $[(PGG)_{10}+3H]^{3+}$. Ainsi, entre 14 et 22 eV, la fragmentation inter et intra-moléculaire de la triple hélice peut être attribuée à une photo-excitation du peptide sans ionisation, après conversion de l'énergie du photon en énergie interne ro-vibrationnelle. Au delà de 22 eV, le rendement de la photo-ionisation décroît tandis que la fragmentation augmente progressivement jusqu'à devenir le processus dominant dans la gamme des photons X. Ceci suggère que l'énergie interne déposée dans le peptide ionisé $Th^{8+\bullet}$ augmente avec l'énergie du photon et entraîne sa fragmentation inter- et intra-moléculaire. De manière intéressante, la dissociation de la triple hélice en monomères ré-apparaît vers 26 eV, à plus basse énergie que les processus de dissociation intra-moléculaire. Cette tendance est cohérente avec la séparation du trimère en monomères, suivie de leur fragmentation. De plus, le fait qu'aucune fragmentation intra-moléculaire ne soit observée entre 20 et 30 eV est une différence notable avec le cas du

monomère $[(PGG)_{10}+3H]^{3+}$, suggérant un effet de la taille et de la complexation du système. En effet, le système a trois fois plus de degrés de liberté et possède de nombreuses liaisons hydrogènes qui doivent être brisées pour séparer les trois peptides, deux caractéristiques qui augmentent l'énergie de dissociation du trimère par rapport au monomère.

De plus, il est intéressant de noter que nous n'observons pas de dimère de $(PPG)_{10}$ intact, ni, contrairement au cas du dimère de leucine-enképhaline [242, 243], de pic attribuable à des fragments du squelette partiellement liés à un monomère. Ceci suggère que le complexe non covalent de la triple hélice n'est stable qu'avec trois brins intacts.

Enfin, alors que la taille de ce complexe est proche de celle de l'ubiquitine, nous n'observons pas le trimère multi-ionisé intact à 150 et 288 eV. À ces énergies, il apparaît sur les spectres de masse les mêmes petits fragments que nous attribuons à la multi-ionisation d'un monomère. Ceci pourrait suggérer que la fragmentation du monomère doublement ionisé au sein du trimère se produit avant la répartition de l'énergie dans les modes de vibrations du trimère.

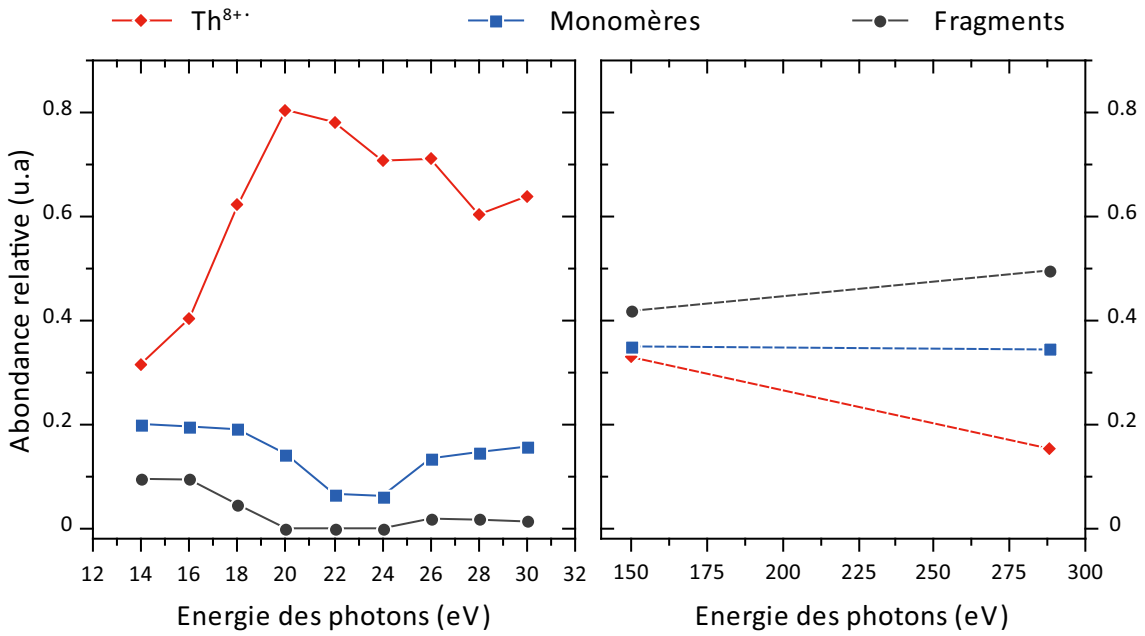


Figure 5.3.8 : *Abondance relative des différents ions formés après absorption d'un photon entre 14 eV et 288 eV par le peptide modèle de la triple hélice Th^{7+}. La courbe notée « Monomères » est la sommes des abondances des peptides M^{2+}, M^{3+} et $M^{4+\bullet}$, celle notée « Fragments » représente la somme de tous les fragments évoqués dans le texte.*

5.4 Conclusion

Les résultats présentés dans ce chapitre s'inscrivent dans le contexte large d'un projet collaboratif multidisciplinaire visant à explorer les effets de l'environnement des cellules sur leur survie, lors de leur irradiation dans le cadre du traitement de cancers par rayonnements ionisants. Nous avons entrepris l'étude de l'irradiation de peptides de collagène, une protéine constituant la matrice extra-cellulaire de différents tissus du corps humain, tels que les os ou le cartilage. Nous avons ainsi réalisé des expériences dans le but d'étudier la réponse à la photo-absorption pour différents peptides de collagène protonés en phase gazeuse, PK26 (m $\simeq$ 2300 Da), $(PPG)_{10}$ (m $\simeq$ 2500 Da) et $((PPG)_{10})_3$ (m $\simeq$ 7500 Da), sur une large gamme d'énergie de photon allant de 5,6 à 540 eV. Elles font partie des premières expériences de photo-absorption sur des peptides de masse intermédiaire entre les petits peptides (leucine-enképhaline, 555 Da, substance P, 1348 Da) et les protéines (cytochrome C, 12 kDa, ubiquitine, 8,5 kDa) étudiées jusque là par le groupe de T. Schlathölter et l'équipe de A. Giuliani et A. Milosavljević. En complément, nous avons sondé l'effet de l'état de charge et de l'hydroxylation des prolines, une modification post-traductionnelle typique du collagène, connue pour stabiliser la structure en triple hélice de cette protéine, sur les voies de relaxation des différents peptides étudiés. Enfin nous avons étudié pour la première fois la photo-absorption d'un modèle de la triple hélice de collagène en phase gazeuse, ce qui constitue les résultats préliminaires de notre étude menée sur ce complexe à la structure particulière.

Nous avons observé que l'excitation des liaisons peptidiques par des photons UV de 5,6 eV (220 nm) mène majoritairement à la fragmentation de ces liaisons du côté du N-terminal des prolines, par des mécanismes spécifiques à l'excitation UV (faisant intervenir les états excités), mais aussi, dans une moindre mesure, de type CID (dans l'état fondamental).

La photo-excitation sans ionisation induite par l'absorption d'un photon VUV proche du seuil d'ionisation des peptides (12-20 eV) génère des pertes de molécules neutres depuis le peptide parent ainsi qu'une fragmentation du squelette produisant une variété d'ions de type a, b, c, x, y et z. À ces énergies, la fragmentation des peptides est donc différente de l'UV, suggérant que d'autres états excités sont atteints. Les voies de dissociation majoritaires depuis le peptide photo-ionisé sont les pertes de molécules neutres associées aux chaîne latérales, qui sont sans doute initiées par le radical créé par l'ionisation.

Pour tous les peptides étudiés, nous avons observé un maximum du rendement de photo-ionisation autour de 20 eV, soit plus de 6 eV au dessus du seuil d'ionisation. À cette énergie, la fragmentation des peptides est minimale. Ces résultats suggèrent que dans cette gamme d'énergie, il y a cœxistence des processus de photo-excitation dissociative et de photo-ionisation dans l'état fondamental, et donc qu'une gamme d'orbitales de valence est sondée par un seul photon. Une transition progressive entre excitation et ionisation se produit lorsque l'énergie du photon augmente.

À haute énergie (150 - 550 eV), quand le photon peut ioniser ou exciter des électrons de couches de valences profondes ou de couches internes 1s, les spectres sont alors dominés par une forte fragmentation, produisant des ions de faible rapport m/q (< 200), non observés à plus basse énergie de photon. Toutefois, alors qu'il est certain, d'après la littérature, que des processus Auger entraînent la multi-ionisation des peptides à ces énergies, nous n'avons pas observé de peptides intacts après multi-ionisation, quel que soit le système étudié. Ces résultats nous amènent à proposer que la multi-ionisation de ces peptides entraîne leur fragmentation et est à l'origine de ces petits fragments. De plus, dans le cas du peptide PK26, nos résultats suggèrent que le site d'ionisation (orbitales 1s du carbone, de l'azote ou de l'oxygène) n'a pas d'influence sur les voies de fragmentation du peptide. De plus, à partir des différents résultats de la littérature, il apparaît que l'observation d'un peptide multi-ionisé intact dépend fortement de sa taille ; les grandes protéines pouvant rester intactes contrairement aux peptides de plus petite taille. Dans un article publié récemment, nous avons interprété cet effet dans le cadre d'une conversion totale de l'énergie laissée dans le système par le départ de l'électron Auger en énergie interne ro-vibrationnelle, induisant une fragmentation dans l'état fondamental. Ceci pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas observé le trimètre $((PPG)_{10})_3$ multi-ionisé intact malgré sa masse similaire aux protéines apparaissant intactes après ce processus.

L'effet de l'hydroxylation des prolines a été mis en évidence par l'observation de la perte de H_2O significativement plus abondante pour les peptides photo-ionisés radicalaires hydroxylés PK26-Hyp et $(PHypG)_{10}$ que pour les peptides PK26-P et $(PPG)_{10}$. En prenant en compte les différentes origines possibles de la perte de H_2O dans les peptides, nous avons identifié que cette perte d'eau provient de la chaîne latérale de l'hydroxyproline et l'attribuons à un mécanisme radicalaire, de même que pour les autres pertes de chaîne latérale observées après photo-ionisation.

Un résultat intéressant observé en modifiant l'état de charge initial du peptide PK26 est la diminution importante de la perte de CO_2 après ionisation, tandis que la perte de H_2O augmente et devient majoritaire dans le cas du PK26-HyP. Cet effet a été attribué à une modification de la structure géométrique du peptide : un plus grand état de charge favorise une structure dépliée du peptide et réduit la mobilité du radical. Dans le cas de la protéine de collagène en phase condensée, la structure en filament, donc complètement dépliée, de la protéine pourrait avoir le même type de conséquence sur la mobilité d'un radical et donc sur les voies de fragmentation.

L'étude de la photo-absorption de la triple hélice modèle du collagène $((PPG)_{10})_3$ a montré une fragmentation intramoléculaire réduite par rapport au monomère $(PPG)_{10}$. Ceci s'explique par une répartition de l'énergie interne dans de plus nombreux degrés de liberté. Une certaine quantité d'énergie est requise pour séparer, dans un premier temps, le trimère en monomères qui peuvent ensuite fragmenter indépendamment, produisant les mêmes fragments que ceux observés par photo-absorption du monomère isolé. Ceci nous montre qu'il est pertinent d'étudier la photo-absorption de sous-unités (monomères) du collagène pour en identifier les mécanismes de dissociation et les différents fragments produits.

Conclusion et perspectives | 6

Le travail réalisé pendant cette thèse et présenté dans ce manuscrit a eu pour objectif d'étudier les mécanismes de relaxation de systèmes moléculaires d'intérêt biologique en phase gazeuse, par collision avec des ions et absorption de photons. Deux grandes parties peuvent être distinguées.

La première est dédiée au développement et à la caractérisation du dispositif expérimental PIBALE. Cet instrument doit permettre l'étude des collisions entre un faisceau projectile d'ions atomiques d'une énergie cinétique de l'ordre du keV et un faisceau cible de molécules de basse énergie (15-20 eV) sélectionnées en taille, en réalisant une analyse des fragments en coïncidence. Ces caractéristiques en font un instrument unique au monde mais représente un vrai défi expérimental.

La seconde présente les résultats d'expériences de photo-excitation et de photo-ionisation de peptides de collagène protonés en phase gazeuse. D'une part, ces expériences ont permis d'étudier les mécanismes de dissociation de ces peptides en fonction de l'énergie du photon absorbé, ainsi que l'influence de leur état de charge initial et de l'hydroxylation des prolines sur la fragmentation. D'autre part, nous avons étudié un modèle de la triple hélice de collagène de manière à explorer l'effet de cette structure particulière sur les processus induits par la photo-absorption.

Développement du dispositif PIBALE

Cet instrument a été conçu dans l'objectif d'étudier des systèmes moléculaires sélectionnés en taille dans des expériences de faisceaux croisés avec des ions atomiques. Une source d'ionisation par électronébulisation permet de mettre en phase gazeuse les biomolécules cibles protonées. Elles sont ensuite sélectionnées selon leur rapport masse-sur-charge et accumulées dans un piège à ions pour obtenir un paquet dense d'ions cibles de quelques eV d'énergie cinétique. Ce paquet croise un faisceau d'ions projectiles dans la zone d'extraction d'un spectromètre de masse à temps de vol. La détection des fragments en coïncidence et la mesure de leur point d'impact sur un détecteur sensible en position permettra l'analyse de la cinématique de fragmentation des molécules. Une grande partie de ce travail de thèse s'est portée sur l'amélioration de la source de molécule cible par le développement d'un funnel, l'optimisation des caractéristiques et de la pureté des paquets d'ions au travers des paramètres de piégeage, les

propriétés du spectromètre de masse à temps de vol et la synchronisation des faisceaux cible et projectile.

L'amélioration de la géométrie du funnel permet la production de différentes biomolécules avec une intensité de 15 à 30 pA. Grâce à ces performances, le remplissage du piège au maximum de sa capacité est obtenu en une centaine de millisecondes. Le nombre de molécules pouvant ainsi y être accumulées est d'environ 10^5 ions et est limité par l'augmentation de la taille du nuage et le déconfinement des ions provoqués par la charge d'espace. Les propriétés de ce nuage (volume, température) et les paramètres d'extraction du piège conditionnent la densité d'ions cible dans la zone d'interaction. Cette dernière a été estimée de l'ordre de 6.10^4 ions/cm^3 et implique un faible taux d'événement attendu d'environ 0,2 coups par seconde pour les expériences de collision. Lors de ces expériences, les impuretés du paquet d'ions cibles formées par CID à l'injection et à l'extraction des ions du piège, constituent la principale source de pollution des spectres limitant le rapport signal/bruit. Par conséquent, afin de soustraire les différentes sources de bruit et d'accéder aux produits de la collision, il est nécessaire de faire l'acquisition des spectres dans quatre configurations différentes (cible, projectile, neutre et collision).

Les plus récentes expériences sur ce dispositif ont été réalisées avec un faisceau projectile d'He^+ de 7 keV d'énergie cinétique et une cible de kanamycine protonée. L'analyse des spectres obtenus a révélé la présence d'une structure qui pourrait être attribuée à NH_3^+ et/ou OH^+ produits lors de la collision. De nouvelles expériences dans de meilleures conditions seront bientôt réalisées dans le but de confirmer ce résultat.

Des améliorations du dispositif PIBALE sont déjà en cours de développement dans le but d'améliorer les conditions expérimentales pour les collisions. Celles-ci permettront d'augmenter la production de molécule cible, d'améliorer la pureté du paquet d'ions cibles et d'en accroître la densité dans la zone d'interaction. Avec ces modifications, nous espérons pouvoir élever le rapport signal/bruit d'un ordre de grandeur.

La principale modification de la source de biomolécules cibles envisagée pour augmenter l'intensité disponible avant le piège, consiste à élargir le diamètre intérieur du capillaire chauffant de la source ESI. De cette façon, un flux de molécules plus important peut traverser le capillaire jusqu'à la chambre du funnel. Cette modification s'accompagne de la mise en place d'une pompe primaire plus performante car il est nécessaire de maintenir la pression dans cette chambre à celle optimale pour le fonctionnement de notre funnel. La refonte complète de ce funnel, notamment avec un espacement plus fin entre les électrodes, est une autre modification qui pourrait être entreprise pour augmenter l'intensité du faisceau disponible.

Améliorer la pureté du paquet d'ions cibles consiste principalement à minimiser les collisions énergétiques avec le gaz tampon du piège, à l'injection comme à l'extraction. Optimiser les paramètres d'injection et d'extraction du piège pour réduire cette fragmentation peut se faire via les éléments de l'optique de guidage en amont et en aval du piège, mais entraîne une diminution souvent importante de l'efficacité de transmission. L'application d'une excitation dipolaire pendant la durée du piégeage permettrait de supprimer la contribution des fragments

créés à l'injection du piège. Diminuer la pression du gaz résiduel dans le piège au moment de l'extraction des ions est un moyen de limiter la production de pollution par collisions à l'extraction. Ceci peut-être obtenu en augmentant le temps de pompage (au détriment du rapport cyclique) ou en améliorant les capacités du pompage de la chambre du piège. La modification du circuit d'injection de l'hélium dans le piège devrait permettre, dans cet objectif, de diminuer le volume du gaz à pomper et d'atteindre un meilleur vide avant l'extraction des ions.

Enfin, l'augmentation de la densité du paquet d'ions cibles dans la zone d'interaction peut être obtenue en diminuant la dispersion en énergie des ions. Un « regroupeur » a été développé et récemment mis en place dans cet objectif. Il permet de compenser la dispersion en énergie des ions en appliquant, à un instant donné, un champ électrique qui ralentit les ions les plus rapides à l'avant du paquet et accélère les plus lents à l'arrière. Les premiers tests ont montré qu'une diminution d'un facteur trois de la longueur du paquet d'ions cibles peut être obtenu de cette manière.

En conclusion, ces nouvelles modifications du dispositif PIBALE devraient permettre d'augmenter d'un facteur deux la fréquence du cycle et d'un facteur trois la densité du paquet cible, soit l'augmentation d'un facteur six du taux de comptage. Dans tous les cas, le rapport signal-sur-bruit resterait faible et l'acquisition en quatre temps sera toujours nécessaire pour différencier les fragments « réels » et le bruit. Toutefois, ces améliorations devraient permettre de valider le fonctionnement de ce dispositif et ainsi d'étudier une variété de systèmes moléculaires d'intérêt biologique. Pour des petites molécules telles que les nucléobases ou les acides aminés, nous pourrons étudier dans un premier temps l'effet de la protonation sur leur fragmentation et comparer ces résultats à ceux obtenus sur des systèmes neutres. Sur des systèmes plus gros comme les oligonucléotides ou les peptides, la détection des fragments en coïncidence permettra d'explorer en détail leurs mécanismes de dissociation après interaction avec des ions. Il sera notamment possible de comparer ces futures résultats avec ceux qui sont exposés dans la seconde partie de cette thèse.

Dommages radio-induits du collagène

Pour explorer les mécanismes de relaxation intrinsèques du collagène après irradiation, nous nous sommes intéressés à la photo-absorption de différents peptides de collagène protonés en phase gazeuse sur une large gamme d'énergie de photon allant de 5,6 à 540 eV.

Nous avons notamment observé que la dissociation de ces peptides après absorption d'un photon UV de 5,6 eV (220 nm) se fait principalement à proximité des prolines. Autour du seuil d'ionisation de ces systèmes, la perte de molécules depuis les chaînes latérales de certains acides aminés des peptides est la voie de dissociation majoritaire. Ces pertes impliquent probablement l'action du radical créé par l'ionisation dont la mobilité semble dépendante de la structure du peptide (repliée ou dépliée). La perte du groupement OH des hydroxyprolines est attribuée à un mécanisme similaire et pourrait déstabiliser la structure de la triple hélice du collagène.

Dans le cas du modèle de la triple hélice du collagène, l'énergie du photon absorbée peut entraîner sa séparation en monomères intacts et donc la perte de la structure initiale. Si suffisamment d'énergie est apportée par le photon, la fragmentation d'un ou des monomères est observée, produisant des fragments de séquences $(PPG)_i$ (i = 1 à 4) de différentes longueurs. Lorsque l'énergie du photon est plus haute (150-500 eV), la multi-ionisation devient un processus possible. Toutefois, les peptides que nous avons étudiés ne sont pas observés intacts si plus d'un électron leur sont arrachés. Une forte fragmentation produisant des ions de faible rapport m/q se produit alors. Ceci pourrait être expliqué par le fait qu'une grande quantité d'énergie est déposée dans le peptide ou que celui-ci ne supporte pas les charges additionnelles. Nos expériences de photo-absorption ont, de manière générale, montré que plusieurs orbitales moléculaires de valence peuvent être sondées par un seul photon, et qu'une transition progressive de l'excitation vers l'ionisation se produit autour du seuil d'ionisation des peptides et qu'au-delà, lorsque l'ionisation simple ou multiple se produit, l'excédent d'énergie est redistribué dans les degrés de liberté internes ro-vibrationnels et induit une fragmentation inter-, puis intramoléculaire.

Différentes études supplémentaires nous permettraient d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes de fragmentation de ces peptides. Nous nous interrogeons notamment sur la raison de la plus favorable rupture de la liaison Gly-Pro, l'origine précise du pic de photo-dissociation observé à 13 eV pour le peptide $(PPG)_{10}$, l'absence des fragments complémentaires de ceux détectés et aussi le rôle de l'énergie d'excitation et l'ajout des charges dans la fragmentation intensive observée pour des hautes énergies de photons.

De nouvelles expériences de photo-absorption sur synchrotron nous permettraient d'explorer l'effet de l'hydroxylation sur la fragmentation du monomère $(PHypG)_{10}$ et sur la stabilité du trimère de la triple hélice $((PHypG)_{10})_3$. De plus, la différenciation entre les fragments internes et les fragments de types b/y pourrait être obtenue en modifiant les acides aminés présents aux extrémités des peptides.

Bien que nos résultats suggèrent que la structure de la triple hélice est conservée en phase gazeuse, il serait particulièrement intéressant de réaliser des expériences de mobilité ionique pour étudier la conformation du trimère $((PPG)_{10})_3$ et s'en assurer. De même, mesurer les spectres de masse par CID et après photo-absorption à 220 nm permettrait de connaître les voies de dissociation de basse énergie de ces systèmes et en particulier de voir si les mêmes fragments $(PPG)_i$ de types b/y sont formés.

Par ailleurs, des calculs de chimie quantique nous permettraient d'explorer les niveaux d'énergies des différentes orbitales moléculaires du peptide, son énergie d'ionisation et les origines de la fragilité de la liaison Gly-Pro observée expérimentalement. Le peptide $(PPG)_{10}$ étant composé de la répétition du même motif de trois acides aminés, il serait envisageable d'étudier ces propriétés sur un modèle plus petit comme le peptide $(PPG)_2$, et ainsi de mener les calculs à un niveau fiable, par exemple avec des méthodes *ab initio*.

La mesure des fragments cationiques en coïncidence nous permettraient d'obtenir des informations supplémentaires sur les processus de relaxation. De cette façon et dans le cas du

trimère modèle de la triple hélice, nous pourrions identifier le monomère d'origine des différents fragments observés et déterminer si chacun d'entre eux, ou seulement le monomère ionisé, fragmente après séparation du trimère.

Tous les résultats présentés ici pourront être comparés à ceux obtenus sur le dispositif PIBALE par collision avec des ions atomiques simplement et multi-chargés. De plus, dans le cadre du projet sur les effets des rayonnements sur le cartilage, nous avons pour objectif d'étudier l'irradiation d'une protéine de collagène complète en phase gazeuse. Ces résultats seront à comparer avec ceux obtenus en phase condensée par le groupe de l'équipe MADIR. Les autres protéines contenues dans le cartilage, telles que les agrécans, sont aussi des candidats à l'étude des effets de l'irradiation de l'environnement cellulaire sur le devenir des cellules auxquels nous pourrons nous intéresser.

Vers la dynamique de fragmentation des peptides

De manière plus générale, les résultats obtenus pendant cette thèse et ceux de la littérature nous montrent que l'évolution des voies de dissociation des peptides se fait de manière progressive avec l'augmentation de l'énergie du photon absorbée. La cœxistence à une énergie donnée des processus d'excitation et d'ionisation ou d'ionisation simple et multiple traduit le fait que dans ces systèmes, un photon d'énergie donnée est capable de sonder une gamme d'orbitales moléculaires et déclencher différents processus. À basse énergie, ces photons provoquent principalement la rupture des liaisons peptidiques et des pertes de molécules neutres des chaînes latérales lorsque l'énergie se rapproche du seuil d'ionisation. Après l'ionisation, la majeure partie de la fragmentation est provoquée par l'action du radical via des pertes de molécules neutres des chaînes latérales. Enfin, au delà du seuil d'ionisation, l'augmentation de l'énergie du photon induit une dissociation de plus en plus forte des peptides en produisant de nombreux petits fragments.

Pour mieux appréhender la dynamique et les mécanismes de la fragmentation des peptides, des informations plus précises sont nécessaires. L'état de charge avant la fragmentation, l'énergie d'excitation ou encore la coïncidence des fragments sont autant de données qui permettraient une analyse plus fine des processus impliqués dans la dissociation de ces systèmes.

En particulier, la mesure des fragments cationiques en coïncidence pourrait être réalisée sur le dispositif PIBALE. Toutefois, dans son état actuel, cet instrument ne possède pas une résolution en masse suffisante pour l'étude de systèmes de cette taille. Une résolution au moins égale à celle du dispositif « Paultje » (voir section 5.1.3.2) est nécessaire pour attribuer les plus grands fragments. Une résolution encore supérieure (> 1000) nous permettrait de distinguer la distribution isotopique des fragments et de déterminer leur état de charge. La mise en place du mode réflectron du spectromètre de PIBALE permettra d'en améliorer la résolution et d'atteindre de telles performances.

Pour aller encore plus loin, la mesure du nombre et de l'énergie des photo-électrons permettrait de connaître l'énergie d'excitation du système après ionisation et de savoir si c'est

cette énergie ou la multi-ionisation du peptide qui est responsable de sa forte fragmentation. De même, des expériences pompe-sonde résolues en temps grâce aux sources XFEL (Laser à électrons libres) permettrait de décrire la dynamique des transferts de charge au sein de la molécule jusqu'à sa fragmentation.

Bibliographie

[1] Rudy Delaunay. *Croissance moléculaire dans des agrégats d'hydrocarbures aromatiques polycycliues induite par des collisions avec des ions*. PhD thesis, 2016.

[2] Florent Moisy. *Étude des modifications induites dans les semiconducteurs AlxGa1-xN par irradiation aux ion lourds de haute énergie*. PhD thesis, 2016.

[3] Louis Decoster. *Contribution à l'étude et à la modélisation du dépôt des suies lors d'un incendie*. PhD thesis, 2017.

[4] Antoine de Roubin. *Mass measurements of neutron-rich strontium and rubidium isotopes in the $A = 100$ region and development of an electrospray ion source*. PhD thesis, 2016.

[5] D. Schardt, T. Elsässer, and D. Schulz-Ertner. Heavy-ion tumor therapy : Physical and radiobiological benefits. *Rev. Mod. Phys.*, 82 :383–425, 2010.

[6] C. von Sonntag. *The Chemical Basis for Radiation Biology*. London, 1987.

[7] T. Helleday, E. Petermann, C. Lundin, B. Hodgson, and R.A. Sharma. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 8 :193–204, 2008.

[8] S. Boiteux and J.P. Radicella. The human OGG1 gene : structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 377 :1–8, 2000.

[9] G. Kraft, M. Scholz, and U. Bechthold. Tumor therapy and track structure. *Radiat. Environ. Biophys.*, 38 :229–237, 1999.

[10] J.D. Watson and F.H.C. Crick. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature*, 171 :964–967, 1953.

[11] P. Roepstorff and J. Fohlman. Proposal for a Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass Spectra of Peptides. *Biomed. Mass Spectrom.*, 11(11) :601, 1984.

[12] K. Biemann. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, 16(1-12) :99–111, 1988.

[13] K. Biemann. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). In *Methods Enzymol.*, volume 193, pages 886–887. 1990.

[14] F. Hillenkamp and M. Karas. Mass Spectrometry of Peptides and Proteins by Matrix-Assisted Ultraviolet Laser Desorption/Ionization. *Methods Enzymol.*, 193 :280–295, 1990.

[15] V.V. Golovlev, S.L. Allman, W.R. Garrett, N.I. Taranenko, and C.H. Chen. Laser-induced acoustic desorption. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, 169/170 :69–78, 1997.

[16] S.A. McLuckey and M. Mentinova. Ion/neutral, ion/electron, ion/photon, and ion/ion interactions in tandem mass spectrometry : Do we need them all ? Are they enough ? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 22(1) :3–12, 2011.

[17] J. Michael Hollas. *Modern Spectroscopy*. 2004.

[18] C.E. Crespo-Hernández, B. Cohen, P.M. Hare, and B. Kohler. Ultrafast excited-state dynamics in nucleic acids. *Chem. Rev.*, 104(4) :1977–2019, 2004.

[19] H. Satzger, D. Townsend, M.Z. Zgierski, S. Patchkovskii, S. Ullrich, and A. Stolow. Primary processes underlying the photostability of isolated DNA bases : adenine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103(27) :10196–10201, 2006.

[20] M. Zierhut, W. Roth, and I. Fischer. Dynamics of H-atom loss in adenine. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 6(22) :5178–5183, 2004.

[21] S.B. Nielsen, J.U. Andersen, J.S. Forster, P. Hvelplund, B. Liu, U.V. Pedersen, and S. Tomita. Photodestruction of Adenosine 5-Monophosphate (AMP) Nucleotide Ions in vacuo : Statistical versus Nonstatistical Processes. *Phys. Rev. Lett.*, 91(4) :2–5, 2003.

[22] J.C. Marcum, A. Halevi, and J.M. Weber. Photodamage to isolated mononucleotides–photodissociation spectra and fragment channels. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 11(11) :1740–51, 2009.

[23] D. Creed. The Photophysics and Photochemistry of the Near-UV Absorbing Amino Acids-I. Tryptophan and Its Simple Derivatives. *Photochem. Photobiol.*, 39(4) :537–562, 1984.

[24] D. Creed. The Photophysics and Photochemistry of the Near-UV Absorbing Amino Acids-II. Tyrosine and Its Simple Derivatives. *Photochem. Photobiol.*, 39(4) :563–575, 1984.

[25] L.B. Clark. Polarization assignments in the vacuum UV spectra of the primary amide, carboxyl, and peptide groups. *J. Am. Chem. Soc.*, 117 :7974–7986, 1995.

[26] J.A. Stearns, S. Mercier, C. Seaiby, M. Guidi, O.V. Boyarkin, and T.R. Rizzo. Conformation-specific spectroscopy and photodissociation of cold, protonated tyrosine and phenylalanine. *J. Am. Chem. Soc.*, 129(38) :11814–11820, 2007.

[27] M. Pérot, B. Lucas, M. Barat, J. A. Fayeton, and C. Jouvet. Mechanisms of UV photodissociation of small protonated peptides. *J. Phys. Chem. A*, 114(9) :3147–3156, 2010.

[28] J.Y. Oh, J.H. Moon, and M.S. Kim. Sequence- and site-specific photodissociation at 266 nm of protonated synthetic polypeptides containing a tryptophanyl residue. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18(22) :2706–2712, 2004.

[29] J.Y. Oh, J.H. Moon, and M.S. Kim. Chromophore effect in photodissociation at 266 nm of protonated peptides generated by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI). *J. Mass Spectrom.*, 40(7) :899–907, 2005.

[30] T. Tabarin, R. Antoine, M. Broyer, and P. Dugourd. Specific photodissociation of peptides with multi-stage mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19(20) :2883–2892, 2005.

[31] J.P. Reilly. Ultraviolet Photofragmentation of Biomolecular Ions. *Mass Spectrom. Rev.*, 28 :425–447, 2009.

[32] M.C. Crowe and J.S. Brodbelt. Infrared multiphoton dissociation (IRMPD) and collisionally activated dissociation of peptides in a quadrupole ion trap with selective IRMPD of phosphopeptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 15(11) :1581–1592, 2004.

[33] T.Y. Kim, J.C. Schwartz, and J.P. Reilly. Development of a linear ion trap/orthogonal-time-of-flight mass spectrometer for time-dependent observation of product ions by ultraviolet photodissociation of peptide ions. *Anal. Chem.*, 81(21) :8809–8817, 2009.

[34] R. Parthasarathi, Y. He, J.P. Reilly, and K. Raghavachari. New insights into the vacuum UV photodissociation of peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, 132(5) :1606–1610, 2010.

[35] A.R. Milosavljević, F. Canon, C. Nicolas, C. Miron, L. Nahon, and A. Giuliani. Gas-phase protein inner-shell spectroscopy by coupling an ion trap with a soft X-ray beamline. *J. Phys. Chem. Lett.*, 3(9) :1191–1196, 2012.

[36] O. Travnikova, C. Miron, M. Bässler, R. Feifel, M.N. Piancastelli, S.L. Sorensen, and S. Svensson. Resonant Auger decay study of C1s - pi* core-excited OCS. *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena*, 174(1-3) :100–106, 2009.

[37] A. Sanchez-Gonzalez, T.R. Barillot, R.J. Squibb, P. Kolorenč, M. Agaker, V. Averbukh, M.J. Bearpark, C. Bostedt, J.D. Bozek, S. Bruce, S.C. Montero, R.N. Coffee, B. Cooper, J.P. Cryan, M. Dong, J.H.D. Eland, L. Fang, H. Fukuzawa, M. Guehr, M. Ilchen, A.S. Johnsson, C. Liekhus-S, A. Marinelli, T. Maxwell, K. Motomura, M. Mucke, A. Natan, T. Osipov, C. Östlin, M. Pernpointner, V.S. Petrovic, M.A. Robb, C. Sathe, E.R. Simpson, J.G. Underwood, M. Vacher, D.J. Walke, T.J.A. Wolf, V. Zhaunerchyk, J.E. Rubensson, N. Berrah, P. H. Bucksbaum, K. Ueda, R. Feifel, L.J. Frasinski, and J.P. Marangos. Auger electron and photoabsorption spectra of glycine in the vicinity of the oxygen K-edge measured with an X-FEL. *J. Phys. B At. Mol. Opt. Phys.*, 48(23) :234004, 2015.

[38] L. Journel, R. Guillemin, A. Haouas, P. Lablanquie, F. Penent, J. Palaudoux, L. Andric, M. Simon, D. Céolin, T. Kaneyasu, J. Viefhaus, M. Braune, W.B. Li, C. Elkharrat, F. Catoire, J.C. Houver, and D. Dowek. Resonant double Auger decay in carbon K -shell excitation of CO. *Phys. Rev. A - At. Mol. Opt. Phys.*, 77(4) :1–14, 2008.

[39] J.H.D. Eland, P. Linusson, L. Hedin, E. Andersson, J.E. Rubensson, and R. Feifel. Triple ionisation of methane by double Auger and related pathways. *Chem. Phys. Lett.*, 485(1-3) :21–25, 2010.

[40] S. Pilling, D.P.P. Andrade, R.B. de Castilho, R.L. Cavasso-Filho, A.F. Lago, L.H. Coutinho, G.G.B. de Souza, H.M. Boechat-Roberty, and A. Naves de Brito. Survival of gas

phase amino acids and nucleobases in space radiation conditions. *Proc. Int. Astron. Union*, 4(S251) :371–376, 2008.

[41] M. Schwell, H.W. Jochims, H. Baumgartel, F. Dulieu, and S. Leach. VUV photochemistry of small biomolecules. *Planet. Space Sci.*, 54(11) :1073–1085, 2006.

[42] A.R. Milosavljević, V.Z. Cerovski, F. Canon, M.L. Rankovic, N. Skoro, L. Nahon, and A. Giuliani. Energy-dependent UV photodissociation of gas-phase adenosine monophosphate nucleotide ions : The role of a single solvent molecule. *J. Phys. Chem. Lett.*, 5(11) :1994–1999, 2014.

[43] O. Gonzalez-Magaña, M. Tiemens, G. Reitsma, L. Boschman, M. Door, S. Bari, P. O. Lahaie, J.R. Wagner, M.A. Huels, R. Hoekstra, and T. Schlathölter. Fragmentation of protonated oligonucleotides by energetic photons and Cq+ ions. *Phys. Rev. A - At. Mol. Opt. Phys.*, 87(3) :1–13, 2013.

[44] F. Canon, A.R. Milosavljević, L. Nahon, and A. Giuliani. Action spectroscopy of a protonated peptide in the ultraviolet range. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17(17) :25725–25733, 2015.

[45] M.L. Ranković, F. Canon, L. Nahon, A. Giuliani, and A.R. Milosavljević. VUV action spectroscopy of protonated leucine-enkephalin peptide in the 6-14 eV range. *J. Chem. Phys.*, 143(244311), 2015.

[46] A.R. Milosavljević, C. Nicolas, J. Lemaire, C. Dehon, R. Thissen, J.M. Bizau, M. Réfrégiers, L. Nahon, and A. Giuliani. Photoionization of a protein isolated in vacuo. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13(34) :15432–15436, 2011.

[47] A.R. Milosavljević, C. Nicolas, M.Lj. Ranković, F. Canon, C. Miron, and A. Giuliani. K-Shell Excitation and Ionization of a Gas-Phase Protein : Interplay between Electronic Structure and Protein Folding. *J. Phys. Chem. Lett.*, 6(16) :3132–3138, 2015.

[48] D. Egorov, L. Schwob, M. Lalande, R. Hoekstra, and T. Schlathölter. Near edge X-ray absorption mass spectrometry of gas phase proteins : the influence of protein size. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18 :26213–26223, 2016.

[49] O. Gonzalez-Magaña, G. Reitsma, M. Tiemens, L. Boschman, R. Hoekstra, and T. Schlathölter. Near-edge X-ray absorption mass spectrometry of a gas-phase peptide. *J. Phys. Chem. A*, 116(44) :10745–10751, 2012.

[50] C. Brunet, R. Antoine, P. Dugourd, D. Duflot, F. Canon, A. Giuliani, and L. Nahon. Valence shell direct double photodetachment in polyanions. *New J. Phys.*, 15(063024), 2013.

[51] R. Antoine and P. Dugourd. Visible and ultraviolet spectroscopy of gas phase protein ions. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13(37) :16494–509, 2011.

[52] V. Gabelica, F. Rosu, T. Tabarin, C. Kinet, R. Antoine, M. Broyer, E. De Pauw, and P. Dugourd. Base-dependent electron photodetachment from negatively charged DNA strands upon 260-nm laser irradiation. *J. Am. Chem. Soc.*, 129(15) :4706–4713, 2007.

[53] V. Gabelica, T. Tabarin, R. Antoine, F. Rosu, I. Compagnon, M. Broyer, E. De Pauw, and P. Dugourd. Electron photodetachment dissociation of DNA polyanions in a quadrupole ion trap mass spectrometer. *Anal. Chem.*, 78(18) :6564–6572, 2006.

[54] F. Rosu, V. Gabelica, E. De Pauw, R. Antoine, M. Broyer, and P. Dugourd. UV spectroscopy of DNA duplex and quadruplex structures in the gas phase. *J. Phys. Chem. A*, 116(22) :5383–5391, 2012.

[55] M.A. Halim, M. Girod, L. MacAleese, J. Lemoine, R. Antoine, and P. Dugourd. 213 nm Ultraviolet Photodissociation on Peptide Anions : Radical-Directed Fragmentation Patterns. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, pages 474–486, 2015.

[56] S.I. Smith and J.S. Brodbelt. Characterization of oligodeoxynucleotides and modifications by 193 nm Photodissociation and electron photodetachment dissociation. *Anal. Chem.*, 82(17) :7218–7226, 2010.

[57] V. Larraillet, R. Antoine, P. Dugourd, and J. Lemoine. Activated-electron photodetachment dissociation for the structural characterization of protein polyanions. *Anal. Chem.*, 81(20) :8410–8416, 2009.

[58] C. Brunet, R. Antoine, P. Dugourd, F. Canon, A. Giuliani, and L. Nahon. Photo-induced electron detachment of protein polyanions in the VUV range. *J. Chem. Phys.*, 138(6) :5–9, 2013.

[59] R. Antoine, Q. Enjalbert, L. MacAleese, P. Dugourd, A. Giuliani, and L. Nahon. Multiple electron ejection from proteins resulting from single-photon excitation in the valence shell. *J. Phys. Chem. Lett.*, 5 :1666–1671, 2014.

[60] A. Giuliani, A.R. Milosavljević, K. Hinsen, F. Canon, C. Nicolas, M. Réfrégiers, and L. Nahon. Structure and charge-state dependence of the gas-phase ionization energy of proteins. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 51 :9552–9556, 2012.

[61] B. Boudaïffa, P. Cloutier, D. Hunting, M.A. Huels, and L. Sanche. Resonant Formation of DNA Strand Breaks by Low-Energy (3 to 20 eV) Electrons. *Science (80-.).*, 287(5458) :1658–1660, 2000.

[62] L. Sanche. Low energy electron-driven damage in biomolecules. *Eur. Phys. J. D*, 35 :367–390, 2005.

[63] I. Baccarelli, I. Bald, F.A. Gianturco, E. Illenberger, and J. Kopyra. Electron-induced damage of DNA and its components : Experiments and theoretical models. *Phys. Rep.*, 508(1-2) :1–44, 2011.

[64] H. Abdoul-Carime, S. Gohlke, and E. Illenberger. Site-specific dissociation of DNA bases by slow electrons at early stages of irradiation. *Phys. Rev. Lett.*, 92(16) :168103–1, 2004.

[65] S. Ptasinska, S. Denifl, P. Scheier, E. Illenberger, and T.D. Märk. Bond- and site-selective loss of H atoms from nucleobases by very-low-energy electrons (< 3 eV). *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 44(42) :6941–6943, 2005.

[66] S. Ptasińska, S. Denifl, V. Grill, T.D. Märk, P. Scheier, S. Gohlke, M.A. Huels, and E. Illenberger. Bond-selective H- ion abstraction from thymine. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 44(11) :1647–1650, 2005.

[67] S. Denifl, S. Ptasińska, M. Probst, J. Hrušák, P. Scheier, and T.D. Märk. Electron attachment to the gas-phase DNA bases cytosine and thymine. *J. Phys. Chem. A*, 108(31) :6562–6569, 2004.

[68] S. Ptasińska, S. Denifl, S. Gohlke, P. Scheier, E. Illenberger, and T.D. Märk. Decomposition of thymidine by low-energy electrons : Implications for the molecular mechanisms of single-strand breaks in DNA. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 45(12) :1893–1896, 2006.

[69] I. Bald, I. Dabkowska, and E. Illenberger. Probing biomolecules by laser-induced acoustic desorption : Electrons at near zero electron volts trigger sugar-phosphate cleavage. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 47(44) :8518–8520, 2008.

[70] S. Ptasińska, S. Denifl, A. Abedi, P. Scheier, and T.D. Märk. Dissociative electron attachment to gas-phase glycine. *Anal. Bioanal. Chem.*, 377(7-8) :1115–1119, 2003.

[71] S. Ptasińska, S. Denifl, P. Candori, S. Matejcik, P. Scheier, and T.D. Märk. Dissociative electron attachment to gas phase alanine. *Chem. Phys. Lett.*, 403(1-3) :107–112, 2005.

[72] P. Papp, J. Urban, S. Matejcík, M. Stano, and O. Ingolfsson. Dissociative electron attachment to gas phase valine : a combined experimental and theoretical study. *J. Chem. Phys.*, 125(20) :204301, 2006.

[73] P. Sulzer, E. Alizadeh, A. Mauracher, T.D. Märk, and P. Scheier. Detailed dissociative electron attachment studies on the amino acid proline. *Int. J. Mass Spectrom.*, 277(1-3) :274–278, 2008.

[74] J. Kočišek, P. Papp, P. Mach, Y.V. Vasil'ev, M.L. Deinzer, and Š. Matejčík. Resonance electron capture by Serine. *J. Phys. Chem. A*, 114(4) :1677–1683, 2010.

[75] Y.V. Vasilev, B.J. Figard, J. Morr, and M.L. Deinzer. Fragmentation of peptide negative molecular ions induced by resonance electron capture. *J. Chem. Phys.*, 131(4) :1–11, 2009.

[76] R.A. Zubarev, K.F. Haselmann, B. Budnik, F. Kjeldsen, and F. Jensen. Towards an understanding of the mechanism of electron-capture dissociation : a historical perspective and modern ideas. *Eur. J. Mass Spectrom.*, 8(5) :337–349, 2002.

[77] K. Håkansson, R.R. Hudgins, A.G. Marshall, and R.A.J. O'Hair. Electron Capture Dissociation and Infrared Multiphoton Dissociation of Oligodeoxynucleotide Dications. *J. Am Soc Mass Spectrom*, 14(02) :23–41, 2003.

[78] K.N. Schultz and K. Håkansson. Rapid electron capture dissociation of mass-selectively accumulated oligodeoxynucleotide dications. *Int. J. Mass Spectrom.*, 234(1-3) :123–130, 2004.

[79] R.A. Zubarev, N.A. Kruger, E.K. Fridriksson, M.A. Lewis, D.M. Horn, B.K. Carpenter, and F.W. McLafferty. Electron Capture Dissociation of Gaseous Multiply-charged Proteins is Favored at Disulfide Bonds and Other Sites of High Hydrogen Atom Affinity. *J. Am. Chem. Soc.*, 121(12) :2857–2862, 1999.

[80] D.M. Horn, K. Breuker, A.J. Frank, and F.W. McLafferty. Kinetic intermediates in the folding of gaseous protein ions characterized by electron capture dissociation mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.*, 123(40) :9792–9799, 2001.

[81] V. Larraillet, A. Vorobyev, C. Brunet, J. Lemoine, Y.O. Tsybin, R. Antoine, and P. Dugourd. Comparative dissociation of peptide polyanions by electron impact and photo-induced electron detachment. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 21(4) :670–680, 2010.

[82] B.A. Budnik, K.F. Haselmann, and R.A. Zubarev. Electron detachment dissociation of peptide di-anions : An electron-hole recombination phenomenon. *Chem. Phys. Lett.*, 342(3-4) :299–302, 2001.

[83] F. Kjeldsen, O.A. Silivra, I.A. Ivonin, K.F. Haselmann, M. Gorshkov, and R.A. Zubarev. Cα-C backbone fragmentation dominates in electron detachment dissociation of gas-phase polypeptide polyanions. *Chem. - A Eur. J.*, 11(6) :1803–1812, 2005.

[84] J. Yang, J. Mo, J.T. Adamson, and K. Håkansson. Characterization of oligodeoxynucleotides by electron detachment dissociation fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 77(6) :1876–1882, 2005.

[85] B.A. Budnik and R.A. Zubarev. MH2+. ion production from protonated polypeptides by electron impact : observation and determination of ionization energies and a cross-section. *Chem. Phys. Lett.*, 316(1-2) :19–23, 2000.

[86] B.A. Budnik, Y.O. Tsybin, P. Häkansson, and R.A. Zubarev. Ionization energies of multiply protonated polypeptides obtained by tandem ionization in Fourier transform mass spectrometers. *J. Mass Spectrom.*, 37(11) :1141–1144, 2002.

[87] Y.M.E. Fung, C.M. Adams, and R.A. Zubarev. Electron ionization dissociation of singly and multiply charged peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(29) :9977–9985, 2009.

[88] M.L. Ranković, A. Giuliani, and A.R. Milosavljević. Electron impact action spectroscopy of mass/charge selected macromolecular ions : Inner-shell excitation of ubiquitin protein. *Appl. Phys. Lett.*, 108(6), 2016.

[89] F. Alvarado, S. Bari, R. Hoekstra, and T. Schlathölter. Interactions of neutral and singly charged keV atomic particles with gas-phase adenine molecules. *J. Chem. Phys.*, 127(2007), 2007.

[90] S. Maclot, D.G. Piekarski, A. Domaracka, A. Méry, V. Vizcaino, L. Adoui, F. Martin, M. Alcami, B.A. Huber, P. Rousseau, and S. Díaz-Tendero. Dynamics of Glycine Dications in the Gas Phase : Ultrafast Intramolecular Hydrogen Migration versus Coulomb Repulsion. *J. Phys. Chem. Lett.*, 4 :3903–3909, 2013.

[91] J. Bernard, R. Brédy, L. Chen, S. Martin, and B. Wei. Relative partial cross-sections and target fragmentation in ion-adenine collisions at 56 keV. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*, 245(1) :103–107, 2006.

[92] B. Li, X. Ma, X.L. Zhu, S.F. Zhang, H.P. Liu, W.T. Feng, D.B. Qian, D.C. Zhang, L. Chen, R. Brédy, G. Montagne, J. Bernard, and S. Martin. High negative ion production yield in 30 keV F 2+ + adenine (C5H5N5) collisions. *J. Phys. B At. Mol. Opt. Phys.*, 42(7) :075204, 2009.

[93] J. Tabet, S. Eden, S. Feil, H. Abdoul-Carime, B. Farizon, M. Farizon, S. Ouaskit, and T.D. Märk. Mass spectrometry (fragmentation ratios) of DNA base molecules following 80 keV proton impact with separation of direct ionization and electron capture processes. *Int. J. Mass Spectrom.*, 292(1-3) :53–63, 2010.

[94] J. Tabet, S. Eden, S. Feil, H. Abdoul-Carime, B. Farizon, M. Farizon, S. Ouaskit, and T.D. Märk. 20-150-keV proton-impact-induced ionization of uracil : Fragmentation ratios and branching ratios for electron capture and direct ionization. *Phys. Rev. A - At. Mol. Opt. Phys.*, 81(1), 2010.

[95] R. Brédy, J. Bernard, L. Chen, B. Wei, A. Salmoun, T. Bouchama, M.C. Buchet-Poulizac, and S. Martin. Fragmentation of adenine induced by collision with slow F2+ ions. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. B*, 235 :392–396, 2005.

[96] R. Brédy, J. Bernard, L. Chen, M.C. Buchet-Poulizac, and S. Martin. Dissociation of charge selected biomolecules induced by electronic capture processes in collisions with positive ions. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*, 261 :114–117, 2007.

[97] R. Brédy, J. Bernard, L. Chen, G. Montagne, B. Li, and S. Martin. Fragmentation of adenine under energy control. *J. Chem. Phys.*, 130(114305), 2009.

[98] F. Alvarado, J. Bernard, B. Li, R. Brédy, L. Chen, R. Hoekstra, S. Martin, and T. Schlathölter. Precise determination of 2-deoxy-D-ribose internal energies after keV proton collisions. *ChemPhysChem*, 9(9) :1254–1258, 2008.

[99] S. Maclot, D.G. Piekarski, R. Delaunay, A. Domaracka, A. Méry, V. Vizcaino, J.Y. Chesnel, F. Martín, M. Alcamí, B.A. Huber, L. Adoui, P. Rousseau, and S. Díaz-Tendero. Stability of the glycine cation in the gas phase after interaction with multiply charged ions. *Eur. Phys. J. D*, 68(6) :1–7, 2014.

[100] S. Bari, R. Hoekstra, and T. Schlathölter. Peptide fragmentation by keV ion-induced dissociation. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12 :3376–3383, 2010.

[101] S. Bari, R. Hoekstra, and T. Schlathölter. Fast side-chain losses in keV ion-induced dissociation of protonated peptides. *Int. J. Mass Spectrom.*, 299(1) :64–70, 2011.

[102] S. Martin, C. Ortega, L. Chen, R. Brédy, A. Vernier, P. Dugourd, R. Antoine, J. Bernard, G. Reitsma, O. Gonzalez-Magaña, R. Hoekstra, and T. Schlathölter. Electron capture and

deprotonation processes observed in collisions between Xe 8 + and multiply protonated cytochrome-C. *Phys. Rev. A - At. Mol. Opt. Phys.*, 89(1) :1–8, 2014.

[103] F. Alvarado, S. Bari, R. Hoekstra, and T. Schlathölter. Quantification of ion-induced molecular fragmentation of isolated 2-deoxy-D-ribose molecules. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 8(16) :1922–8, 2006.

[104] T. Schlathölter, F. Alvarado, S. Bari, and R. Hoekstra. Ion-induced ionization and fragmentation of DNA building blocks. *Phys. Scr.*, 73 :C113–C117, 2006.

[105] S. Bari, F. Alvarado, J. Postma, P. Sobocinski, R. Hoekstra, and T. Schlathölter. Kinetic energy releases of small amino acids upon interaction with keV ions. *Eur. Phys. J. D*, 51(1) :81–87, 2009.

[106] B. Coupier, B. Farizon, M. Farizon, M.J. Gaillard, F. Gobet, N.V. De Castro Faria, G. Jalbert, S. Ouaskit, M. Carré, B. Gstir, G. Hanel, S. Denifl, L. Feketeova, P. Scheier, and T. D. Märk. Inelastic interactions of protons and electrons with biologically relevant molecules. *Eur. Phys. J. D*, 20(3) :459–468, 2002.

[107] A.N. Agnihotri, S. Kasthurirangan, S. Nandi, A. Kumar, M.E. Galassi, R.D. Rivarola, O. Fojón, C. Champion, J. Hanssen, H. Lekadir, P.F. Weck, and L.C. Tribedi. Ionization of uracil in collisions with highly charged carbon and oxygen ions of energy 100 keV to 78 MeV. *Phys. Rev. A*, 85(032711), 2012.

[108] Sylvain Maclot. *Stabilité de systèmes complexes d'intérêt biologique sous rayonnements ionisants*. PhD thesis, 2014.

[109] J.C. Poully, J. Miles, S. De Camillis, A. Cassimi, and J.B. Greenwood. Proton irradiation of DNA nucleosides in the gas phase. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17 :7172–7180, 2015.

[110] Michael Capron. *Etude de l'interaction entre ions multichargés et systèmes complexes d'intérêt biologique : effets de l'environnement à l'échelle moléculaire*. PhD thesis, 2011.

[111] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, and C.M. Whitehouse. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science (80-.).*, 246(4926) :64–71, oct 1989.

[112] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, and C.M. Whitehouse. Electrospray ionization-principles and practice. *Mass Spectrom. Rev.*, 9(1) :37–70, jan 1990.

[113] A.J.R. Heck. Native mass spectrometry : a bridge between interactomics and structural biology. *Nat. Methods*, 5(11) :927–933, 2008.

[114] T.C. Rohner, N. Lion, and H.H. Girault. Electrochemical and theoretical aspects of electrospray ionisation. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 6(12) :3056, jun 2004.

[115] J.V. Iribarne. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.*, 64(6) :2287, 1976.

[116] M. Dole. Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.*, 49(5) :2240, 1968.

[117] D. Gerlich. *Inhomogeneous RF-fields - A versatile tool for the study of processes with slow ions*, volume 82. 1992.

[118] R.T. Kelly, A.V. Tolmachev, J.S. Page, K. Tang, and R.D. Smith. The ion Funnel : Theory, Implementations and Applications. *Mass Spectrom. Rev.*, 29 :294–312, 2010.

[119] R.R. Julian, S.R. Mabbett, and M.F. Jarrold. Ion funnels for the masses : Experiments and simulations with a simplified ion funnel. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 16 :1708–1712, 2005.

[120] M.E. Belov, M.V. Gorshkov, H.R. Udseth, G.A. Anderson, A.V. Tolmachev, D.C. Prior, R. Harkewicz, and R.D. Smith. Initial Implementation of an Electrodynamic Ion Funnel with Fourier Transfrom Ion Cyclotron REsonance Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 11 :19–23, 2000.

[121] T. Kim, A.V. Tolmachev, R. Harkewicz, D.C. Prior, G. Anderson, H.R. Udseth, R.D. Smith, T.H. Bailey, S. Rakov, and J.H. Futrell. Design and implementation of a new electrodynamic ion funnel. *Anal. Chem.*, 72(10) :2247–2255, 2000.

[122] A. Luca, S. Schlemmer, I. Čermák, and D. Gerlich. On the combination of a linear field free trap with a time-of-flight mass spectrometer. *Rev. Sci. Instrum.*, 72 :2900–2908, 2001.

[123] J.S. Page, A.V. Tolmachev, K. Tang, and R.D. Smith. Theoretical and experimental evaluation of the low m/z transmission of an electrodynamic ion funnel. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 17 :586–592, 2006.

[124] M. Abramowitz, I. A. Stegun, and D. Miller. *Handbook of Mathematical Functions With Formulas, Graphs and Mathematical Tables*. 1964.

[125] W. Paul. Electromagnetic Traps For charged And Neutral Particles. *Rev. Mod. Phys.*, 62(3) :531–542, 1990.

[126] D.R. Denison. Operating Parameters of a Quadrupole in a Grounded Cylindrical Housing. *J. Vac. Sci. Technol.*, 8(1) :266, 1971.

[127] F.G. Major, V.N. Gheorghe, and G. Werth. *Charged Particke Traps, Physics and Techniques of Charged Particle Field Confinement*. Springer, 2005.

[128] R.E. March. An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 32 :351–369, 1997.

[129] R. Ifflander and G. Werth. Optical detection of ions confined in a rf quadrupole trap. *Metrologia*, 170(13) :167–170, 1977.

[130] D.J. Douglas and J.B. French. Collisional focusing effects in radio frequency quadrupoles. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 3(4) :398–408, 1992.

[131] S. Guan and A.G. Marshall. Equilibrium space charge distribution in a quadrupole ion trap. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 5(2) :64–71, 1994.

[132] W.C. Wiley and I.H. McLaren. Time-of-flight mass spectrometer with Improved Resolution. *Rev. Sci. Instrum.*, 26(12) :1150–1157, 1955.

[133] F. Chandezon, B.A. Huber, and C. Ristori. A new-regime Wiley-McLaren time-of-flight mass spectrometer. *Rev. Sci. Instrum.*, 65(11) :3344–3353, 1994.

[134] J. Laskin and C. Lifshitz. Kinetic energy release distributions in mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 36(5) :459–478, 2001.

[135] E. Liénard, M. Herbane, G. Ban, G. Darius, P. Delahaye, D. Durand, X. Fléchard, M. Labalme, F. Mauger, A. Méry, O. Naviliat-Cuncic, and D. Rodríguez. Performance of a micro-channel plates position sensitive detector. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. A*, 551 :375–386, 2005.

[136] G.W. Fraser. The ion detection efficiency of microchannel plates. *Int. J. Mass Spectrom.*, 215 :13–30, 2002.

[137] I.S. Gilmore and M.P. Seah. Ion detection efficiency in SIMS : dependecies on energy, mass and composition for microchannel plates used in mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.*, 202 :217–229, 2000.

[138] J. Oberheide, P. Wilhelms, and M. Zimmer. New results on the absolute ion detection efficiencies of a microchannel plate. *Meas. Sci. Technol.*, 8(4) :351–354, 1999.

[139] A. Giuliani, A.R. Milosavljević, F. Canon, and L. Nahon. Contribution of Synchrotron Radiation to Photoactivation Studies of Biomolecular Ions in the Gas Phase. *Mass Spectrom. Rev.*, 33 :424–441, 2014.

[140] H. Lioe and R.A.J. O'Hair. Comparison of collision-induced dissociation and electron-induced dissociation of singly protonated aromatic amino acids, cystine and related simple peptides using a hybrid linear ion trap-FT-ICR mass spectrometer. *Anal. Bioanal. Chem.*, 389(5) :1429–1437, 2007.

[141] M.J. Van Stipdonk, E.a. Schweikert, and M.a. Park. Coincidence measurements in mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 32(11) :1151–1161, 1997.

[142] P. Jardin, C. Barue, C. Canet, M. Dupuis, J. L. Flambard, G. Gaubert, N. Lecesne, P. Leherissier, F. Lemagnen, R. Leroy, J.-Y. Pacquet, F. Pellemoine, J.-P. Rataud, M.G. Laurent, and A.C.C. Villari. Mono 1000 : A simple and efficient 2.45 GHz electron cyclotron resonance ion source using a new magnetic structure concept. *Rev. Sci. Instrum.*, 73(2) :789, 2002.

[143] C.C. Nelson and J.A. McCloskey. Collision-Induced Dissociation of Adenine. *J. Am. Chem. Soc.*, 114(22) :3661–3668, 1992.

[144] R.R. Wu, Y. Chen, and M.T. Rodgers. Mechanisms and energetics for N-glycosidic bond cleavage of protonated 2-deoxyguanosine and guanosine. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18(4) :2968–2980, 2016.

[145] S.I. Kotretsou and V. Constantinou-Kokotou. Mass spectrometric studies on the fragmentation and structural characterization of aminoacyl derivatives of kanamycin A. *Carbohydr. Res.*, 310(1-2) :121–127, 1998.

[146] T.W. Knapman, J.T. Berryman, I. Campuzano, S.A. Harris, and A.E. Ashcroft. Considerations in experimental and theoretical collision cross-section measurements of small molecules using travelling wave ion mobility spectrometry-mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.*, 298(1-3) :17–23, 2010.

[147] A.A. Shvartsburg and M.F. Jarrold. An exact hard-spheres scattering model for the mobilities of polyatomic ions. *Chem. Phys. Lett.*, 261(1-2) :86–91, 1996.

[148] M.F. Mesleh, J.M. Hunter, A.A. Shvartsburg, G.C. Schatz, and M.F. Jarrold. Structural Information from Ion Mobility Measurements : Effects of the Long-Range Potential. *J. Phys. Chem.*, 100(40) :16082–16086, 1996.

[149] M. Wojdyr. Fityk : A general-purpose peak fitting program. *J. Appl. Crystallogr.*, 43 :1126–1128, 2010.

[150] K. Rinn, F. Melchert, and E. Salzborn. Measurements of charge transfer in H+-He+ collisions. *J. Phys. B At. Mol. Phys.*, 18 :3783–3795, 1985.

[151] M.E. Rudd, T.V. Goffe, A. Itoh, and R.D. DuBois. Cross sections for ionization of gases by 102000-keV He+ ions and for electron capture and loss by 5350-keV He+ ions. *Phys. Rev. A*, 32(2) :829–835, 1985.

[152] Y. Saintigny, S. Cruet-Hennequart, D.H. Hamdi, F. Chevalier, and J.L. Lefaix. Impact of Therapeutic Irradiation on Healthy Articular Cartilage. *Radiat. Res.*, 183(2) :135–146, 2015.

[153] M. Maldonado and J. Nam. The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis. *Biomed Res. Int.*, 2013, 2013.

[154] D.H. Vynios. Metabolism of cartilage proteoglycans in health and disease. *Biomed Res. Int.*, 2014, 2014.

[155] F.W. Kotch, I.A. Guzei, and R.T. Raines. Stabilization of the Collagen Triple Helix by O-Methylation of Hydroxyproline Residues. *J. Am. Chem. Soc.*, 130 :2952–2953, 2008.

[156] S. Sakakibara, K. Inouye, K. Shudo, Y. Kishida, Y. Kobayashi, and D.J. Prockop. Synthesis of (Pro-Hyp-Gly)n of defined molecular weights Evidence for the stabilization of collagen triple helix by hydroxypyroline. *BBA - Protein Struct.*, 303(1) :198–202, 1973.

[157] K. Jariashvili, B. Madhan, B. Brodsky, A. Kuchava, L. Namicheishvili, and N. Metreveli. Uv damage of collagen : Insights from model collagen peptides. *Biopolymers*, 97(3) :189–198, 2012.

[158] J. Bella, M. Eaton, B. Brodsky, and H.M. Berman. Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 A resolution. *Science (80-.).*, 266(5182) :75–81, 1994.

[159] D.P. Little, J.P. Speir, M.W. Wenko, P.B. O'Connor, and F.W. McLafferty. Infrared Multiphoton Dissociation of Large Multiply Charged Ions for Biomolecule Sequencing. *Anal. Chem.*, 66(18) :2809–2815, 1994.

[160] J.A. Madsen and J.S. Brodbelt. Comparison of Infrared Multiphoton Dissociation and Collision-Induced Dissociation of Supercharged Peptides in Ion Traps. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 20(3) :349–358, 2009.

[161] B. Paizs and S. Suhai. Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrom. Rev.*, 24(4) :508–548, 2005.

[162] S.M. Kelly, T.J. Jess, and N.C. Price. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, 1751(2) :119–139, 2005.

[163] W. Gabryelski and L. Li. Photo-induced dissociation of electrospray generated ions in an ion trap/time-of-flight mass spectrometer. *Rev. Sci. Instrum.*, 70 :4192, 1999.

[164] L. Joly, R. Antoine, M. Broyer, P. Dugourd, and J. Lemoine. Specific UV photodissociation of tyrosyl-containing peptides in multistage mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 42 :818–824, 2007.

[165] R.W. Woody and A. Koslowski. Recent developments in the electronic spectroscopy of amides and alpha-helical polypeptides. *Biophys. Chem.*, 101-102 :535–551, 2002.

[166] J. Lemoine, T. Tabarin, R. Antoine, M. Broyer, and P. Dugourd. UV photodissociation of phospho-seryl-containing peptides : Laser stabilization of the phospho-seryl bond with multistage mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20(3) :507–511, 2006.

[167] R. Antoine, M. Broyer, J. Chamot-Rooke, C. Dedonder, C. Desfrançois, P. Dugourd, G. Grégoire, C. Jouvet, D. Onidas, P. Poulain, T. Tabarin, and G. van der Rest. Comparison of the fragmentation pattern induced by collisions, laser excitation and electron capture. Influence of the initial excitation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20 :1648–1652, 2006.

[168] M. Girod, Z. Sanader, M. Vojkovic, R. Antoine, L. MacAleese, J. Lemoine, V. Bonacic-Koutecky, and P. Dugourd. UV photodissociation of proline-containing peptide ions : Insights from molecular dynamics. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 26(3) :432–443, 2015.

[169] T.Y. Kim, S.J. Valentine, D.E. Clemmer, and J.P. Reilly. Gas-phase conformation-specific photofragmentation of proline-containing peptide ions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 21(8) :1455–1465, 2010.

[170] W.D. Bowers, S.S. Delbert, R.L. Hunter, and R.T. Mciver. Fragmentation of Oligopeptide Ions Using Ultraviolet Laser Radiation and Fourier Transform Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.*, 106 :7288–7289, 1984.

[171] D.C. Barbacci and D.H. Russell. Sequence and side-chain specific photofragment (193 nm) ions from protonated substance P by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 10(10) :1038–1040, 1999.

[172] J.M. Hettick, D.L. McCurdy, D.C. Barbacci, and D.H. Russell. Optimization of sample preparation for peptide sequencing by MALDI-TOF photofragment mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 73(22) :5378–5386, 2001.

[173] D.F. Hunt, J. Shabanowitz, I. Yates John R, P.R. Griffin, and N.Z. Zhu. Tandem quadrupole spectrometry fourier transform mass. *Anal. Chlmxa Acta*, 225 :1–10, 1989.

[174] J.H. Moon, S.H. Yoon, and M.S. Kim. Photodissociation of singly protonated peptides at 193 nm investigated with tandem time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19 :3248–3252, 2005.

[175] S.H. Yoon, J.He. Moon, and M.S. Kim. Dissociation mechanisms and implication for the presence of multiple conformations for peptide ions with arginine at the C-terminus : Time-resolved photodissociation study. *J. Mass Spectrom.*, 45(7) :806–814, 2010.

[176] J.A. Madsen, D.R. Boutz, and J.S. Brodbelt. Ultrafast ultraviolet photodissociation at 193 nm and its applicability to proteomic workflows. *J. Proteome Res.*, 9(8) :4205–4214, 2010.

[177] J.B. Shaw and J.S. Brodbelt. Analysis of protein digests by transmission-mode desorption electrospray ionization mass spectrometry with ultraviolet photodissociation. *Int. J. Mass Spectrom.*, 308(2-3) :203–208, 2011.

[178] M.S. Thompson, W. Cui, and J.P. Reilly. Fragmentation of singly charged peptide ions by photodissociation at lambda = 157 nm. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 43(36) :4791–4794, 2004.

[179] T.Y. Kim, M.S. Thompson, and J.P. Reilly. Peptide photodissociation at 157 nm in a linear ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19(12) :1657–1665, 2005.

[180] L. Zhang and J.P. Reilly. Radical-Driven Dissociation of Odd-Electron Peptide Radical Ions Produced in 157 nm Photodissociation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 20(7) :1378–1390, 2009.

[181] T. Schlathölter and R. Hoekstra. Action Spectroscopy of Gas-Phase Peptide ions with Energetic Photons. *Photophysics Ion. Biochromophores*, pages 155–180, 2013.

[182] S. Bari, O. Gonzalez-Magaña, G. Reitsma, J. Werner, S. Schippers, R. Hoekstra, and T. Schlathölter. Photodissociation of protonated leucine-enkephalin in the VUV range of 8-40 eV. *J. Chem. Phys.*, 134(024314), 2011.

[183] J.H. Moon, S.H. Yoon, Y.J. Bae, and M.S. Kim. Dissociation kinetics of singly protonated leucine enkephalin investigated by time-resolved photodissociation tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 21(7) :1151–1158, 2010.

[184] A.R. Milosavljević, C. Nicolas, J.F. Gil, F. Canon, M. Réfrégiers, L. Nahon, and A. Giuliani. VUV synchrotron radiation : A new activation technique for tandem mass spectrometry. *J. Synchrotron Radiat.*, 19(2) :174–178, 2012.

[185] F. Canon, A.R. Milosavljević, G. Van Der Rest, M. Réfrégiers, L. Nahon, P. Sarni-Manchado, V. Cheynier, and A. Giuliani. Photodissociation and dissociative photoionization mass spectrometry of proteins and noncovalent protein-ligand complexes. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 52(32) :8377–8381, 2013.

[186] O. Gonzalez-Magaña, G. Reitsma, S. Bari, R. Hoekstra, and T. Schlathölter. Length effects in VUV photofragmentation of protonated peptides. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 14(13) :4351–4, 2012.

[187] Claire Brunet. *Photodétachement d'électron de polyanions : aspects fondamentaux et applications en spéctrométrie de masse*. PhD thesis, 2012.

[188] Sadia Bari. *The influence of peptide structure on fragmentation pathways*. PhD thesis, 2010.

[189] J. Bahrdt, W. Frentrup, A. Gaupp, M. Scheer, W. Gudat, G. Ingold, and S. Sasaki. A quasi-periodic hybrid undulator at BESSY II. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip.*, 467-468 :130–133, 2001.

[190] G. Reichardt, J. Bahrdt, J.S. Schmidt, W. Gudat, A. Ehresmann, R. Müller-Albrecht, H. Molter, H. Schmoranzer, M. Martins, N. Schwentner, and S. Sasaki. A 10 m-normal incidence monochromator at the quasi-periodic undulator U125-2 at BESSY II. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip.*, 467-468 :462–465, 2001.

[191] Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie. The U125-2 NIM beamline at BESSY II. *J. large-scale Res. Facil.*, 2 :A53, 2016.

[192] O. Plekan, V. Feyer, R. Richter, M. Coreno, M. De Simone, K.C. Prince, and V. Carravetta. Investigation of the Amino Acids Glycine , Proline , and Methionine by Photoemission Spectroscopy. *J. Phys. Chem. A*, 111 :10998–11005, 2007.

[193] K.J.S. Sawhney, F. Senf, and W. Gudat. PGM beamline with constant energy resolution mode for U49-2 undulator at BESSY-II. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip.*, 467-468 :466–469, 2001.

[194] Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie. The plane grating monochromator beamline U49/2 PGM1 at BESSY II. *J. large-scale Res. Facil.*, 2 :A72, 2016.

[195] Y. Zubavichus, A. Shaporenko, M. Grunze, and M. Zharnikov. Innershell Absorption Spectroscopy of Amino Acids at All Relevant Absorption Edges. *J. Phys. Chem. A*, 109 :6998–7000, 2005.

[196] O. Plekan, V. Feyer, R. Richter, M. Coreno, M. de Simone, K. C. Prince, and V. Carravetta. An X-ray absorption study of glycine, methionine and proline. *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena*, 155(1-3) :47–53, 2007.

[197] Y. Zubavichus, A. Shaporenko, M. Grunze, and M. Zharnikov. Is X-ray absorption spectroscopy sensitive to the amino acid composition of functional proteins ? *J. Phys. Chem. B*, 112(15) :4478–4480, 2008.

[198] Y. Zubavichus, A. Shaporenko, M. Grunze, and M. Zharnikov. NEXAFS spectroscopy of biological molecules : From amino acids to functional proteins. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. A*, 603 :111–114, 2009.

[199] D.H. Hamdi, S. Barbieri, F. Chevalier, J.E. Groetz, F. Legendre, M. Demoor, P. Galera, J.L. Lefaix, and Y. Saintigny. In vitro engineering of human 3D chondrosarcoma : a preclinical model relevant for investigations of radiation quality impact. *BMC Cancer*, 15(1) :579, 2015.

[200] D.H. Hamdi, F. Chevalier, J.E. Groetz, F. Durantel, J.Y. Thuret, C. Mann, and Y. Saintigny. Comparable Senescence Induction in Three-dimensional Human Cartilage Model by Exposure to Therapeutic Doses of X-rays or C-ions. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 95(1) :139–146, 2016.

[201] Z. Wu, C. Fenselau, and R. Graham Cooks. Gas-phase basicities and proton affinities of lysine and histidine measured from the dissociation of proton-bound dimers. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 8(9) :777–780, 1994.

[202] S. Mezzache, C. Pepe, P. Karoyan, F. Fournier, and J.C. Tabet. Proton affinity of diastereoisomers of modified prolines using the kinetic method and density functional theory calculations : Role of the cis/trans substituent on the endo/exo ring conformation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19(16) :2279–2283, 2005.

[203] J.A. Loo, C.G. Edmonds, and R.D. Smith. Tandem mass spectrometry of very large molecules. 2. Dissociation of multiply charged proline-containing proteins from electrospray ionization. *Anal. Chem.*, 65(4) :425–38, 1993.

[204] T. Vaisar and J. Urban. Probing the proline effect in CID of protonated peptides. *J. Mass Spectrom. Lett.*, 31 :1185–1187, 1996.

[205] R.N. Grewal, H. El Aribi, A.G. Harrison, K.W.M. Siu, and A.C. Hopkinson. Fragmentation of Protonated Tripeptides : The Proline Effect Revisited. *J. Phys. Chem. B*, 108(15) :4899–4908, 2004.

[206] H. Lioe, J. Laskin, G.E. Reid, and R.A.J. O'Hair. Energetics and dynamics of the fragmentation reactions of protonated peptides containing methionine sulfoxide or aspartic acid via energy- and time-resolved surface induced dissociation. *J. Phys. Chem. A*, 111(42) :10580–10588, 2007.

[207] W. Yu, J.E. Vath, M.C. Huberty, and S.a. Martin. Identification of the facile gas-phase cleavage of the Asp-Pro and Asp-Xxx peptide bonds in matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 65(21) :3015–3023, 1993.

[208] R. Bakhtiar, Q. Wu, S.A. Hofstadler, and R.D. Smith. Charge State Specific Facile Gas-phase Cleavage of Asp 75-Met 76 Peptide Bond in the a-Chain of Human Apohemoglobin Probed by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.*, 23 :707–710, 1994.

[209] J. Qin and B.T. Chait. Preferential Fragmentation of Protonated Gas-Phase Peptide Ions Adjacent to Acidic Amino Acid Residues. *J. Am. Chem. Soc.*, 117(12) :5411–5412, 1995.

[210] W.D. Price, Paul .D. Schnier, R.A. Jockusch, E.F. Strittmatter, and E.R. Williams. Unimolecular reaction kinetics in the high-pressure limit without collisions. *J. Am. Chem. Soc.*, 118(43) :10640–10644, 1996.

[211] T. Yalcin and A.G. Harrison. Ion chemistry of protonated lysine derivatives. *J. Mass Spectrom.*, 31(11) :1237–1243, 1996.

[212] B. Balta, V. Aviyente, and C. Lifshitz. Elimination of water from the carboxyl group of GlyGlyH+. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 14(10) :1192–1203, 2003.

[213] A.M. Betancourt, L.H. Coutinho, R.B. Bernini, C.E.V. de Moura, A.B. Rocha, and G.G.B. de Souza. VUV and soft x-ray ionization of a plant volatile : Vanillin (C8H8O3). *J. Chem. Phys.*, 144(11) :114305, 2016.

[214] A. Giuliani, A.R. Milosavljević, K. Hinsen, F. Canon, C. Nicolas, M. Réfrégiers, and L. Nahon. Structure and charge-state dependence of the gas-phase ionization energy of proteins. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 51(38) :9552–9556, 2012.

[215] M. Xu, W.K. Tang, X. Mu, Y. Ling, C.K. Siu, and I.K. Chu. α-Radical-induced CO2 loss from the aspartic acid side chain of the collisionally induced tripeptide aspartylglycylarginine radical cation. *Int. J. Mass Spectrom.*, 390 :56–62, 2015.

[216] T.W. Chung, R. Hui, A. Ledvina, J.J. Coon, and F. Turecek. Cascade dissociations of peptide cation-radicals. Part 1. Scope and effects of amino acid residues in penta-, nona-,and decapeptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 23(8) :1336–1350, 2012.

[217] J. Laskin, J.H. Futrell, and I.K. Chu. Is dissociation of peptide radical cations an ergodic process ? *J. Am. Chem. Soc.*, 129(31) :9598–9599, 2007.

[218] M.M. Savitski, M.L. Nielsen, and R.A. Zubarev. Side-chain losses in electron capture dissociation to improve peptide identification. *Anal. Chem.*, 79(6) :2296–2302, 2007.

[219] C.L. Kalcic, T.C. Gunaratne, A.D. Jones, M. Dantus, and G.E. Reid. Femtosecond Laser-Induced Ionization / Dissociation of Protonated Peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, 131 :940–942, 2009.

[220] Q. Sun, H. Nelson, T. Ly, B.M. Stoltz, and R.R. Julian. Side chain chemistry mediates backbone fragmentation in hydrogen deficient peptide radicals. *J. Proteome Res.*, 8(2) :958–966, 2009.

[221] J. Laskin, Z. Yang, C.M.D. Ng, and I.K. Chu. Fragmentation of Alpha-Radical Cations of Arginine-Containing Peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 21(4) :511–521, 2010.

[222] H.B. Oh and B. Moon. Radical-Driven Peptide Backbone Dissociation Tandem Mass Spectrometry. *2Mass Spectrom. Rev.*, 34 :116–132, 2015.

[223] C.L. Kalcic, G.E. Reid, V.V. Lozovoy, and M. Dantus. Mechanism Elucidation for Nonstochastic Femtosecond Laser-Induced Ionization / Dissociation : From Amino Acids to Peptides. *J. Phys. Chem. A*, 116 :2764–2774, 2012.

[224] R.A. Zubarev and H. Yang. Multiple soft ionization of gas-phase proteins and swift backbone dissociation in collisions with $>$ 99 eV electrons. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 49(8) :1439–1441, 2010.

[225] R.D. Molloy, A. Danielsson, L. Karlsson, and J.H.D. Eland. Double photoionisation spectra of small molecules and a new empirical rule for double ionisation energies. *Chem. Phys.*, 335(1) :49–54, 2007.

[226] T. Ly and R.R. Julian. Elucidating the tertiary structure of protein ions in vacuo with site specific photoinitiated radical reactions. *J. Am. Chem. Soc.*, 132(25) :8602–8609, 2010.

[227] Y. Sugita and Y. Okamoto. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. *Chemi*, 314 :141–151, 1999.

[228] A.G. Harrison. Effect of the identity of Xaa on the fragmentation modes of doubly-protonated Ala-Ala-Xaa-Ala-Ala-Ala-Arg. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 22(5) :906–911, 2011.

[229] A.G. Harrison. Pathways for water loss from doubly protonated peptides containing serine or threonine. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 23(1) :116–123, 2012.

[230] P. Neta, Q.L. Pu, X. Yang, and S.E. Stein. Consecutive neutral losses of H2O and C2H4O from N-Terminal Thr-Thr and Thr-Ser in collision-induced dissociation of protonated peptides. Position dependent water loss from single Thr or Ser. *Int. J. Mass Spectrom.*, 267(1-3 SPEC. ISS.) :295–301, 2007.

[231] K. Gupta, M. Kumar, K. Chandrashekara, K.S. Krishnan, and P. Balaram. Combined electron transfer dissociation-collision-induced dissociation fragmentation in the mass spectrometric distinction of leucine, isoleucine, and hydroxyproline residues in peptide natural products. *J. Proteome Res.*, 11(2) :515–522, 2012.

[232] T.J.D. Jørgensen, D. Delforge, J. Remacle, G. Bojesen, and P. Roepstorff. Collision-induced dissociation of noncovalent complexes between vancomycin antibiotics and peptide ligand stereoisomers : evidence for molecular recognition in the gas phase. *Int. J. Mass Spectrom.*, 188(1-2) :63–85, 1999.

[233] G. Chen, R. Graham Cooks, D.M. Bunk, M.J. Welch, and J.R. Christie. Partitioning of kinetic energy to internal energy in the low energy collision-induced dissociations of proton-bound dimers of polypeptides. *Int. J. Mass Spectrom.*, 185 :75–90, 1999.

[234] L. Feketeová and R. A.J. O'Hair. Multiply protonated betaine clusters are stable in the gas phase. *Chem. Commun.*, (40) :4942–4944, 2008.

[235] L. Serrano-Andrés and M.P. Fülscher. Theoretical study of the electronic spectroscopy of peptides. 1. The peptidic bond : Primary, secondary, and tertiary amides. *J. Am. Chem. Soc.*, 118(48) :12190–12199, 1996.

[236] L. Serrano-Andrés and M.P. Füscher. Theoretical study of the electronic spectroscopy of peptides. 2. Glycine and N-acetylglycine. *J. Am. Chem. Soc.*, 118(48) :12200–12206, 1996.

[237] K. Kameta, K. Muramatsu, S. Machida, N. Kouchi, and Y. Hatano. Photoabsorption, photoionization and neutral-dissociation cross sections of cyclopropane in the photon energy range of 10-24 eV. *J. Phys. B At. Mol. Opt. Phys.*, 32(11) :2719–2728, 1999.

[238] E. Lindholm, L. Asbrink, and S. Ljunggren. Energies of. *J. Phys. Chem.*, 95(10) :3923–3941, 1991.

[239] H. Basch, M.B. Robin, N.A. Kuebler, C. Baker, and D.W. Turner. Optical and Photoelectron Spectra of Small Rings. III. The Saturated Three-Membered Rings. *J. Chem. Phys.*, 51(1) :52, 1969.

[240] Y. Hatano. Interaction of photons with molecules–cross-sections for photoabsorption, photoionization, and photodissociation. *Radiat. Environ. Biophys.*, 38(4) :239–47, 1999.

[241] A.P.W. Arachchilage, F. Wang, V. Feyer, O. Plekan, and K.C. Prince. Correlation of electronic structures of three cyclic dipeptides with their photoemission spectra. *J. Chem. Phys.*, 133 :174319, 2010.

[242] A.R. Milosavljević, V.Z. Cerovski, F. Canon, L. Nahon, and A. Giuliani. Nanosolvation-induced stabilization of a protonated peptide dimer isolated in the Gas phase. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 52(28) :7286–7290, 2013.

[243] A.R. Milosavljević, V.Z. Cerovski, M.L. Ranković, F. Canon, L. Nahon, and A. Giuliani. VUV photofragmentation of protonated leucine-enkephalin peptide dimer below ionization energy. *Eur. Phys. J. D*, 68(3) :1–6, 2014.

Annexes

Étude de la fragmentation des peptides PK26 par CID | A

De manière à explorer les voie de dissociation de plus basse énergie des peptides PK26, en fonction de leur état de charge initial et l'hydroxylation des prolines, nous avons réalisé des expériences de dissociation induite par collision (CID). Cette méthode d'activation consiste à faire entrer en collision, avec une certaine énergie cinétique, les molécules étudiées avec un gaz d'atomes neutres et inertes. De cette manière, la molécule est doucement chauffée et excitée dans ces modes de rotation et de vibration.

Ces expériences ont été réalisées dans le groupe SpectroBio de l'Institut Lumière Matière (Lyon) avec le spectromètre de masse tandem *LTQ* utilisé pour les expériences de photo-absorption dans l'UV, décrit dans le chapitre 5 (voir section 5.1.3.1). Les spectres de masse de tous les peptides étudiés ont été obtenus dans les mêmes conditions. Les paramètres du spectromètre étaient les suivants :

— énergie de collision normalisée : 20 %
— temps d'activation : 200 ms
— pression du gaz d'hélium : 1.10^{-3} mbar
— limite basse de détection : m/q = 200

CID du peptide [PK26-P+3H]$^{3+}$

La figure A.1 présente le spectre de masse obtenu par CID du peptide [PK26-P+3H]$^{3+}$, noté M^{3+}. Très peu de fragments sont observés, et pour la majorité d'entre eux, les deux ions complémentaires sont détectés.

Comme attendu pour cette méthode d'activation, les ions de type b et y sont les fragments majoritaires. Ces fragments sont attribués aux couples b_{13}/y_{13}, b_{16}/y_{10} et b_{22}/y_4. Les couples b_{13}/y_{13} et b_{22}/y_4 correspondent à la rupture d'une liaison peptide C-N du côté du C-terminal, respectivement, de l'acide glutamique (E) et de l'acide aspartique (D). Pour les fragments b_{13}/y_{13}, le couple d'état de charge 1+/2+ est largement majoritaire, ce qui est cohérent avec les trois protons sur les lysines (K), et donc avec le mécanisme éloigné des charges impliquant la chaîne latérale de l'acide glutamique et de l'acide aspartique. Toutefois, pour les fragments b_{16}/y_{10}, nous observons les couples d'état de charge 1+/2+ et 2+/1+, ce qui peut vouloir dire qu'un transfert de proton a lieu. Cela peut-être dû au fait qu'à 300 K, une partie des peptides aient un proton sur le N-terminal à la place d'une lysine, ce qui lui permettrait un plus grande mobilité, ou que le transfert de proton se fasse depuis la chaîne latérale d'une

lysine si la structure tridimensionnelle du peptide en permet le rapprochement. Cette dernière hypothèse est justifiée par le fait que la conformation de ce peptide, obtenue par simulation REMD (annexe C), montre que le groupement NH_3^+ de la lysine au C-terminal est proche de 3 Å du groupement C=O de cette liaison peptidique.

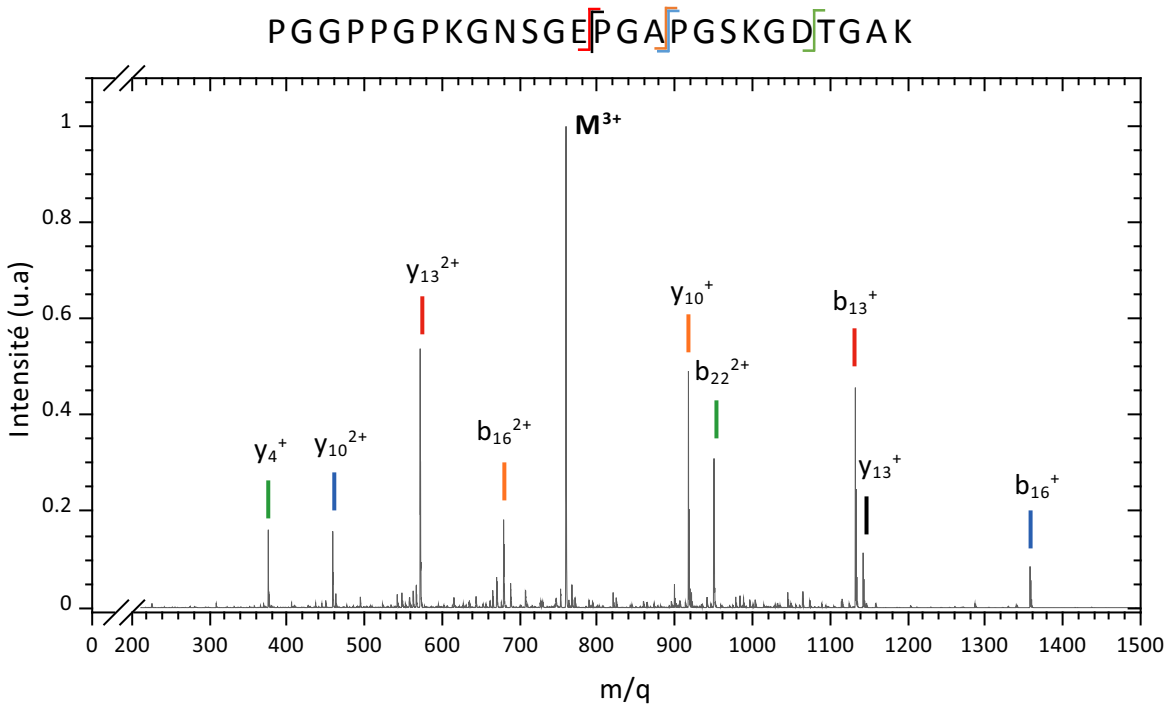


Figure A.1 : *Spectre de masse de CID de basse énergie d'activation du peptide [PK26-P+3H]$^{3+}$. Les traits de même couleur correspondent à la rupture de la même liaison peptidique.*

CID du peptide [PK26-P+4H]$^{4+}$

La figure A.2 présente le spectre de masse obtenu par CID du peptide [PK26-P+4H]$^{4+}$, noté M^{4+}. Plus de fragment que dans le cas du peptide triplement protoné sont observé. Pour la majorité d'entre eux, les deux ions complémentaires sont aussi détectés.

Ce spectre présente les mêmes fragments b_{13}/y_{13}, b_{16}/y_{10} et b_{22}/y_4 que précédemment, avec différents état de charge. La différence majeure avec le spectre du peptide triplement protoné est l'apparition des fragments y_{25}^{3+}, y_{24}^{3+}, b_3^{3+}/y_{23}^{3+} et b_4^{3+}/y_{22}^{3+}. Les fragments b_1^+ (m/q = 98,1) et b_2^+ (m/q = 155,2), complémentaires des deux premiers fragments, ont un rapport m/q inférieur à la limite basse de détection et ne sont donc pas détectés. La formation de ces nouveaux fragments est cohérente avec la présence du quatrième proton sur le groupement amine de la proline au N-terminal, dont l'affinité protonique en fait un site

favorable à la protonation. L'intensité décroissante de ces fragments avec leur éloignement par rapport au N-terminal suggère une mobilité limité du proton pour induire la fragmentation.

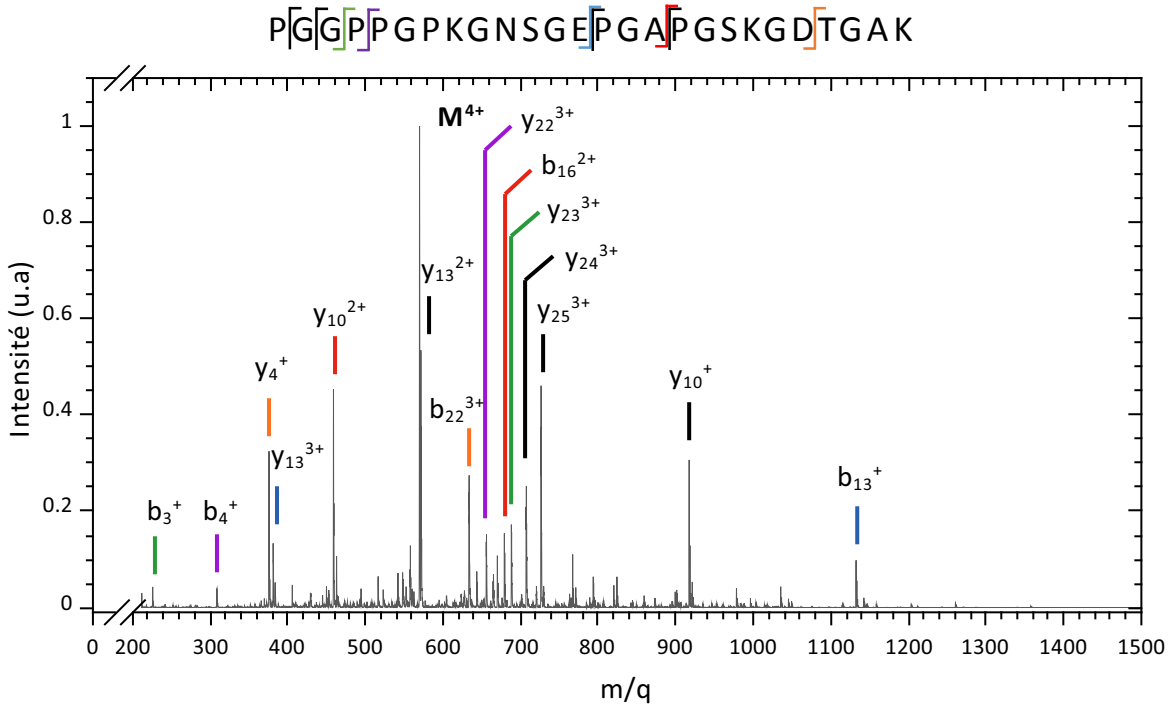


Figure A.2 : *Spectre de masse de CID de basse énergie d'activation du peptide [PK26-P+4H]$^{4+}$. Les traits de même couleur correspondent à la rupture de la même liaison peptidique.*

CID des peptides hydroxylés

L'hydroxylation des prolines ne montre aucun effet sur les voies de dissociation de ce peptide par CID. Ceci est cohérent avec le fait que les groupements hydroxyles sont ajoutés sur les chaînes latérales des prolines et n'influent donc pas les processus de CID. Nous ne montrerons pas les spectres de masse correspondant.

Spectre de photo-absorption UV des peptides PK26-Hyp

B

Les figures B.1 et B.2 présentent les spectres de masse de photo-absorption à 220 nm, respectivement, des peptides [PK26-Hyp+3H]$^{3+}$ et [PK26-Hyp+4H]$^{4+}$. Ces spectres ont été obtenus dans les mêmes conditions expérimentales que ceux obtenus pour les peptides PK26-P présentés dans le chapitre 5 (voir sections 5.1.3.1 et 5.2.2).

L'hydroxylation des prolines ne modifie pas les voies de dissociation de ce peptide, comme nous l'avons abordé en section 5.2.2.

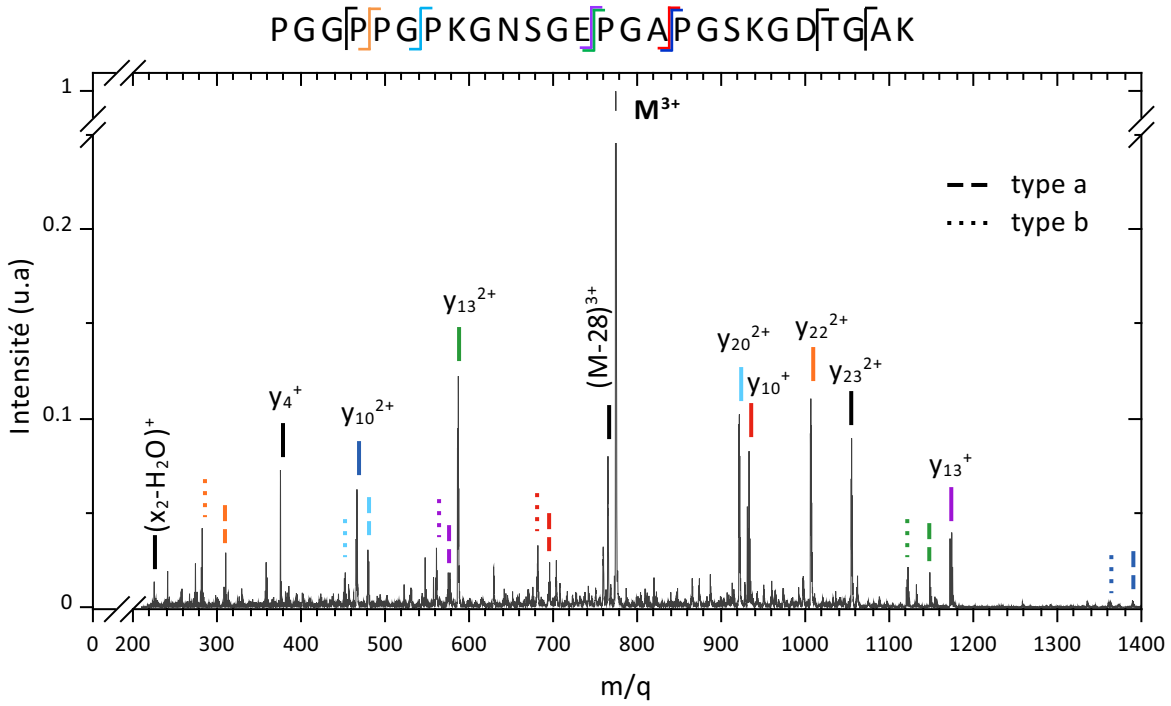


Figure B.1 : *Spectre de masse de photo-dissociation du peptide [PK26-Hyp+3H]$^{3+}$ à 220 nm. Les traits de même couleur correspondent à la rupture de la même liaison peptidique.*

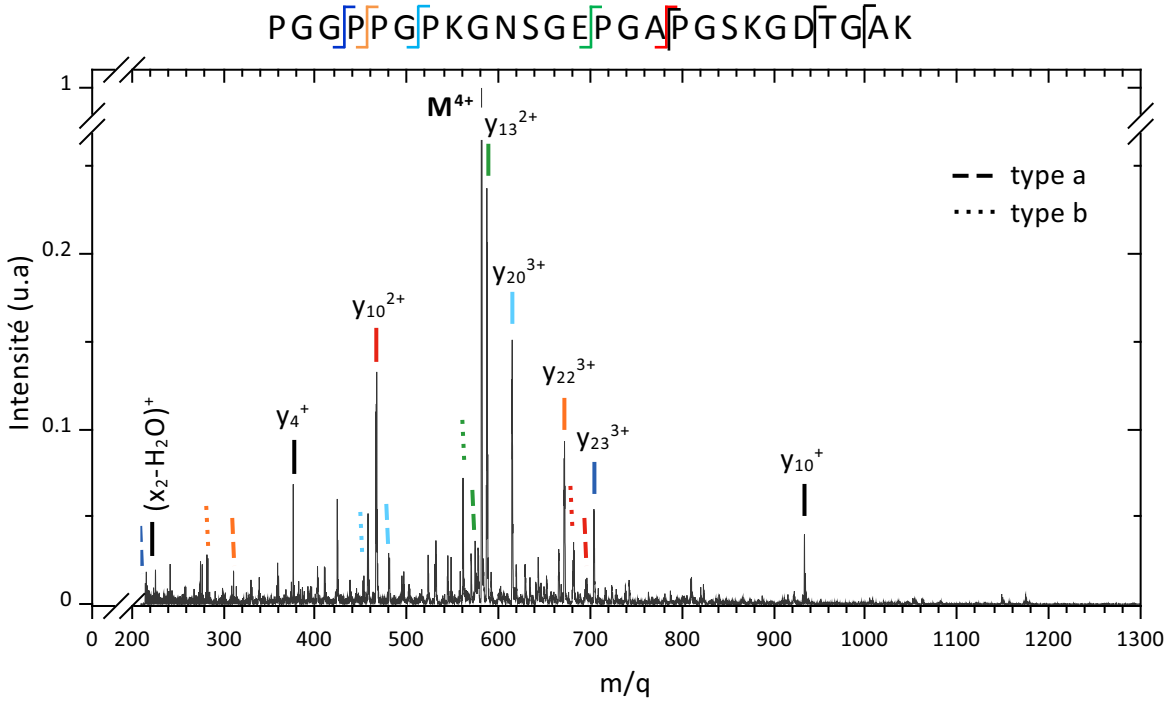


Figure B.2 : *Spectre de masse de photo-dissociation du peptide [PK26-Hyp+4H]$^{4+}$ à 220 nm. Les traits de même couleur correspondent à la rupture de la même liaison peptidique.*

Calcul de conformation des peptides PK26 | C

Pour obtenir la structure des conformères de plus basse énergie potentielle pour les peptides [PK26-P+3H]$^{3+}$ et [PK26-P+4H]$^{4+}$, nous avons réalisé des simulations de dynamique moléculaire par échange de répliques (REMD, *Replica-Exchange Molecular Dynamics*). Cette méthode permet de trier les conformations de molécules protonées en fonction de leur surface d'énergie potentielle. Dans le cas du peptide [PK26-P+3H]$^{3+}$, les trois protons ont été ajoutés sur les trois lysines qui sont les sites de protonation les plus favorables. Pour le peptide [PK26-P+4H]$^{4+}$, le quatrième proton a été ajouté sur la proline au N-terminal qui est le second site le plus favorable de protonation compte tenu de l'affinité protonique de l'amine secondaire de cet acide aminé.

Pour ces simulations, le champs de force AMBER 99 a été utilisé. 30 répliques ont été réparties sur des températures s'échelonnant entre 20 et 1000 K. La durée de ces simulations était de 2 ns divisée par pas de 1 fs. Toutes les 100 fs, les énergies des paires de répliques voisines sont comparées et celles-ci sont automatiquement échangées lorsque nécessaire. 1000 structures ont ainsi été obtenues et leur géométrie a été optimisée par AMBER 99.

Les conformères de plus basse énergie potentielle ont été présentées dans le chapitre 5. Le conformère du peptide [PK26-P+3H]$^{3+}$ présente une structure repliée. La distance moyenne entre le N-terminal et le C-terminal pour les conformations comprise entre +0 et +1 eV d'énergie potentiel est de 22,5Å. La première structure dépliée pour ce peptide se trouve à environ 60kJ/mol au dessus du conformère de plus basse énergie. Dans le cas du peptide [PK26-P+4H]$^{4+}$, la structure du conformère de plus basse énergie est partiellement dépliée. La distance moyenne entre le N-terminal et le C-terminal pour les conformations comprise entre +0 et +1 eV d'énergie potentiel est de 34,2 Å. La structure repliée la plus basse en énergie se trouve à environ 100 kJ/mol au dessus de cette dernière. Ces valeurs sont assez éloignées de celles des énergies potentielles des conformères de plus basse énergie, ce qui nous permet d'avoir confiance dans les résultats obtenus par ces simulations.

Ionisation et fragmentation de biomolécules sélectionnées en masse induites par impact d'ions et photo-absorption

RÉSUMÉ

Cette thèse a pour sujet l'étude de processus physico-chimiques fondamentaux dans des systèmes biomoléculaires isolés induits par interaction avec des rayonnements ionisants. La première partie concerne le développement et la caractérisation du dispositif PIBALE (Plateforme d'Irradiation de Biomolécules et d'Agrégats Libres et Environnés). L'objectif de cet instrument est d'étudier l'ionisation et la fragmentation de systèmes moléculaires d'intérêt biologique par collision avec des ions atomiques. Les biomolécules sont produites par une source à électronébulisation, sélectionnées selon leur rapport masse-sur-charge, accumulées dans un piège à ions puis extraites vers la zone de collision. Les fragments cationiques produits lors de l'interaction avec le faisceau d'ions atomiques sont analysés par spectrométrie de masse à temps de vol. Une détection multi-coïncidence permettra de décrire la cinématique de fragmentation. La seconde partie traite de l'étude en phase gazeuse d'une séquence peptidique du collagène, la protéine structurale la plus abondante dans le corps humain, ainsi que d'un complexe non-covalent modèle de la triple hélice de collagène. Les expériences de photo-absorption, de l'UV aux rayons X, ont montré que plusieurs orbitales moléculaires peuvent être sondées par un seul photon et qu'une transition progressive de l'excitation vers l'ionisation se produit. Au-delà du seuil d'ionisation des peptides, l'excédent d'énergie est redistribué dans les degrés de liberté internes ro-vibrationnels et induit une fragmentation inter-, puis intramoléculaire. De plus, des voies de fragmentation spécifiques au collagène ont été mises en évidence.

Mots-clefs

Spectrométrie de masse à temps de vol, rayonnements ionisants, biomolécules, interactions ions-molécules, photoabsorption, photoonisation, spectrometrie de masse ionisation électrospray, collagène.

Ionization and fragmentation of mass-selected biomolecules induced by ion-impact and photo-absorption

ABSTRACT

This work aims at studying fundamental physical and chemical processes induced by ionizing radiation on isolated biomolecules. The first part is devoted to the development and characterization of the experimental set-up PIBALE (Plateforme d'Irradiation de Biomolécules et d'Agrégats Libres et Environnés). The goal of this apparatus is to analyze ion-induced ionization and fragmentation of biologically relevant molecular systems. The biomolecules are produced by means of an electrospray ionization source, mass-over-charge selected, bunched in an ion trap and subsequently extracted to the collision zone. Fragment cations produced during the interaction with the atomic ion beam are analyzed by time-of-flight mass spectrometry. Multi-coincidence detection of the fragments will allow describing the fragmentation kinematics. The second part of this thesis is focused on the gas phase study of a collagen peptide, collagen being the most abundant structural protein in the human body, as well as a hydrogen-bonded collagen triple-helix model. Photo-absorption experiments, from UV to soft X-rays, show that several molecular orbitals can be probed with a single photon and that a smooth transition from excitation to ionization occurs. Above the ionization threshold, the excess energy is distributed into the internal ro-vibrational degrees of freedom and induces inter- followed by intra-molecular dissociation. Thus, photon irradiation could lead to collagen denaturation by the loss of its triple-helix structure. Moreover, collagen-specific fragmentation channels have been found to be triggered by photon absorption.

Key-words

time-of-flight mass spectrometry, ionizing radiation, biomolecules, ion-molecule collisions, photoabsorption, photoionization, electrospray ionization mass spectrometry, collagen

Laboratoire

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