

Étude structurale d'ions moléculaires d'intérêt biologique en phase gazeuse

Couplage de la spectrométrie de masse et de la spectroscopie laser infrarouge

Jean Christophe Pouilly et Gilles Grégoire

Résumé La spectroscopie IR sur des ions d'intérêt biologique en phase gazeuse permet de sonder les propriétés structurales intrinsèques en l'absence des effets de solvant sur des systèmes parfaitement caractérisés en masse. Les premières études sur des systèmes modèles, acides aminés, petits peptides et substances naturelles, ont permis de déterminer les structures et les sites de protonation des molécules. En étendant ces études aux systèmes de plus en plus complexes, incluant de longues chaînes peptidiques ou des brins d'ADN, il est alors possible de caractériser des structures secondaires de biomolécules isolées en phase gazeuse et de les comparer à leurs structures natives. Il est maintenant envisageable d'étudier des complexes récepteur-ligand afin de caractériser la relation fonction-structure des molécules biologiques dans des systèmes où la stoechiométrie est parfaitement connue.

Mots-clés Molécules d'intérêt biologique, spectroscopie IR de photodissociation, spectrométrie de masse, électronebulisation, chimie quantique.

Abstract Structure of biological ions in the gas phase through resonant IR multiphoton dissociation spectroscopy. Gas phase IR spectroscopy of biologically relevant molecules is a powerful tool to probe their structural properties in a solvent free environment. The first studies on model systems, such as amino acids, short peptide chains and natural compounds, have proven that the structures and the protonation sites of those molecules can be determined. By studying larger and larger molecular systems, including long peptide chains or DNA strands, their secondary structures emerge and can be compared to their native structures. Nowadays, it becomes realistic to study receptor-ligand complexes in order to investigate the well known function-structure relationship in biological systems for which the stoichiometry is perfectly known.

Keywords Molecules of biological interest, IRMPD spectroscopy, mass spectrometry, electrospray, quantum chemistry.

La connaissance de la structure tridimensionnelle de macromolécules biologiques est une donnée essentielle pour établir le lien entre structure et activité biologique. Une protéine bioactive se trouve généralement dans une structure tertiaire ou quaternaire bien spécifique, et son mauvais repliement peut être la cause de dysfonctionnement grave, comme dans le cas des maladies à prions ou d'Alzheimer. De plus, les molécules exercent leur effet biologique en se liant à leur récepteur spécifique, interaction qui est gouvernée par leur structure moléculaire. La formation des structures tridimensionnelles ainsi que l'établissement de liaisons non covalentes réversibles impliquées dans la reconnaissance moléculaire d'une drogue sur son récepteur sont notamment déterminés par les interactions hydrophile, hydrophobe, de liaison hydrogène et de van der Waals. Caractériser au niveau atomique sur des systèmes modèles ces types d'interactions peut permettre une meilleure compréhension des facteurs déterminant la formation de structures spécifiques.

En phase condensée, la structure des biomolécules et de leurs complexes est le plus souvent obtenue par cristallographie X ou par résonance magnétique nucléaire (RMN). De plus, certaines structures secondaires ont des signatures

spectroscopiques caractéristiques qui peuvent être obtenues par des méthodes optiques, spectroscopie FT-IR, Raman, dichroïsme circulaire (CD). La spectroscopie FT-IR est basée sur l'absorption linéaire du rayonnement incident par la molécule dans l'échantillon. Lorsque la longueur d'onde excitatrice est en résonance avec un mode de vibration de la molécule, on enregistre une diminution de l'intensité lumineuse réfléchie ou transmise. En phase gazeuse, la densité des molécules est bien trop faible pour pouvoir détecter des variations d'intensité lumineuse. La spectroscopie IR repose alors le plus souvent sur une spectroscopie d'action, soit par double résonance IR-UV pour l'étude de molécules neutres [1], soit par photodissociation IR pour les molécules ionisées [2]. Ces études permettent de sonder les propriétés intrinsèques des molécules en l'absence des effets de l'environnement et se comparent donc directement aux calculs.

Les études en phase gazeuse de molécules d'intérêt biologique ont émergé depuis une vingtaine d'années grâce au développement de méthodes d'ionisation dites « douces », telles que l'électronebulisation (ESI). Ces méthodes de mise en phase gazeuse permettent d'étudier les formes ioniques, protonées ou déprotonées, de molécules intactes, non

dégradées et isolées. L'intérêt principal de la spectrométrie de masse est de connaître parfaitement la stœchiométrie des complexes moléculaires étudiés, par exemple pour étudier les effets de solvatation en contrôlant le nombre de molécules d'eau en interaction avec le soluté [3]. Un deuxième avantage des études sur les espèces ioniques est de pouvoir les manipuler relativement facilement par des champs électrostatiques, de les piéger dans des trappes à ions afin de les sélectionner en masse, de les thermaliser et de les interroger par spectroscopie laser pendant des échelles de temps allant jusqu'à la seconde. Les premières études couplant spectrométrie de masse et spectroscopie laser ont permis de déterminer les structures de systèmes modèles, tels que les bases nucléiques de l'ADN, les acides aminés et les petits peptides, ainsi que des sucres [4], et sont maintenant étendues aux systèmes plus grands et complexes tels que de longues chaînes peptidiques [5] ou des brins d'ADN [6]. Ces premières études spectroscopiques sur des systèmes complexes ont notamment pour but de savoir si les structures natives observées en phase condensée sont conservées en phase gazeuse après désolvatation.

Les structures de molécules sont déterminées par comparaison entre les mesures spectroscopiques et les calculs de chimie quantique. Quand la taille des molécules devient de plus en plus grande, la surface d'énergie potentielle va présenter un nombre croissant de minima, et la possibilité de distinguer les différentes structures de ces molécules va dépendre de plusieurs facteurs. Quand les expériences sont réalisées à basse température, un nombre réduit de conformations de plus basse énergie, correspondant à des bassins sur la surface d'énergie potentielle bien séparés par des barrières, vont coexister [7]. Par contre, quand les études sont réalisées à température ambiante plus proche des conditions naturelles, l'énergie interne peut devenir plus grande que les barrières séparant les différents conformères et peut même permettre des tautomérisations telles qu'un transfert de proton entre différents groupements basiques [8]. Les molécules ne sont plus dans une géométrie figée mais explorent des bassins de plus en plus évasés correspondant à des familles de structures. Si l'étude des molécules d'intérêt biologique thermalisées à 300 K est souhaitable pour se rapprocher des conditions physiologiques, l'interprétation des signatures spectrales et le traitement théorique nécessaire à la prise en compte des effets entropiques restent une tâche difficile mais passionnante.

Technique expérimentale

Nos études ont été réalisées sur des ions à température ambiante par une technique spectroscopique récemment développée qui est applicable *a priori* à tous types d'ions : la spectroscopie IR résonnante de photodissociation induite par absorption multiphotonique (IRMPD). Les expériences ont été faites au Centre Laser Infrarouge d'Orsay (CLIO) sur une expérience d'accueil du groupe de Philippe Maître du Laboratoire de Chimie Physique. Les molécules sont dissoutes dans une solution aqueuse à des concentrations allant du micro au millimolaire, mises en phase gazeuse à pression atmosphérique par électronébulisation (ESI), entraînées sous vide à travers un capillaire, dirigées et piégées dans un spectromètre de masse, soit une cellule à résonance cyclotronique (ICR) [9], soit une trappe de Paul quadripolaire [10]. La différence principale entre les deux spectromètres est la présence d'un bain d'hélium dans la trappe quadripolaire, qui assure un plus petit confinement des ions et leur

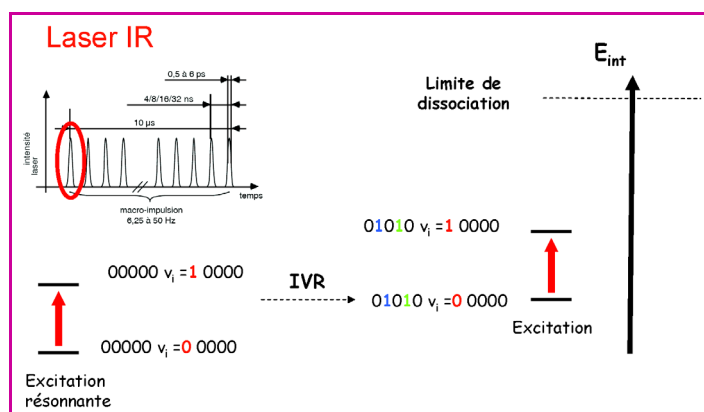


Figure 1 - Principe de la spectroscopie de photodissociation IR par absorption multiphotonique résonnante (IRMPD) et détail de la structure temporelle du laser à électron libre (en haut à gauche).

On considère que les modes vibrationnels sont tous dans leur niveau fondamental (...0000...). L'absorption d'un premier photon résonnant porte le mode v_1 dans son état vibrationnel excité $v_1 = 1$, les autres modes restant dans leur état fondamental. Par relaxation vibrationnelle intramoléculaire (IVR), l'énergie en excès est redistribuée vers les modes couplés de plus basse fréquence, le mode initialement excité v_1 revient dans son état fondamental et peut réabsorber un nouveau photon issu du même train d'impulsion et donc à la même fréquence de résonance. Ce cycle est répété jusqu'à ce que l'énergie interne devienne supérieure à la limite de dissociation de la molécule, ce qui entraîne sa fragmentation qui est détectée par spectrométrie de masse.

thermalisation à température ambiante. Les ions piégés sont sélectionnés en masse et irradiés pendant plusieurs dizaines ou centaines de millisecondes, temps nécessaire à l'absorption séquentielle de dizaines de photons IR induisant la fragmentation. L'IRMPD est un mode d'activation lent, comparable aux expériences de dissociation induite par collision (CID) à basse énergie, et se caractérise donc par les mêmes voies de fragmentations de plus basses énergies.

Le laser à électron libre CLIO accordable dans le proche et moyen infrarouge (4-30 μm) permet d'enregistrer les taux de fragmentation des ions en fonction de la longueur d'onde d'excitation [11]. Le laser CLIO délivre des trains d'impulsion à 25 Hz, chaque macro-impulsion dure 8 μs et est composée de 500 micro-impulsions espacées de 16 nanosecondes (figure 1). Le processus multiphotonique est résonnant car l'absorption du premier photon dépend directement des modes de vibration de l'ion dans une conformation donnée. L'absorption séquentielle cohérente ne peut pas avoir lieu à cause de l'anharmonicité des modes de vibration : un photon résonnant sur une transition fondamentale $v = 0$ vers $v = 1$ est généralement hors résonance pour la transition $v = 1$ vers $v = 2$ et ainsi de suite. L'excitation multiphotonique résonnante intervient via un mécanisme d'absorption séquentielle incohérent [12]. Après l'absorption du premier photon, l'énergie absorbée est rapidement redistribuée sur les modes couplés de plus basses énergies par redistribution vibrationnelle intramoléculaire (IVR). Le mode initialement excité revient dans son état fondamental alors que l'énergie interne de la molécule augmente. Le processus d'IVR a un temps caractéristique qui dépend de la densité de mode à l'énergie d'excitation, qui est généralement bien plus court que la nanoseconde dès que le système possède une dizaine d'atomes, ce qui permet de réabsorber séquentiellement un autre photon résonnant sur la transition fondamentale. Ce processus est répété jusqu'à ce que l'énergie interne de la molécule soit supérieure aux limites de dissociation entraînant la fragmentation de l'ion. Un spectre de fragmentation IRMPD n'est donc pas strictement équivalent à un spectre

d'absorption. Si la position des bandes doit être retrouvée, le taux de fragmentation mesuré sur chaque transition ne peut se comparer directement à l'intensité linéaire d'absorption calculée à cause du caractère multiphotonique de l'excitation. Un mode vibrationnel « localisé », très peu couplé, sera caractérisé par un taux de fragmentation plus faible qu'un mode possédant la même force d'oscillateur, mais avec un IVR plus rapide.

Calculs de structures et des spectres IR

L'interprétation des spectres expérimentaux en termes de structures se fait par comparaison avec des calculs de structures de plus basses énergies par des méthodes de chimie quantique suivant deux approches. La première, qui est très majoritairement adoptée, consiste à rechercher d'une manière systématique les minima de la surface d'énergie potentielle, à optimiser les structures à 0 K et à calculer les fréquences IR des conformères de plus basses énergies. Pour des systèmes de petites tailles allant jusqu'à 50 atomes, les méthodes *ab initio* du type MP2 peuvent être employées, bien qu'en général les calculs sont réalisés par la méthode de la fonctionnelle de la densité (DFT). Pour les molécules possédant plusieurs centaines d'atomes, il faut alors utiliser des méthodes hybrides de type QM/MM, où la partie d'intérêt est traitée par chimie quantique (QM), le reste de la molécule étant simulé à un niveau semi-empirique ou même classique, moins précis mais plus rapide [13]. L'analyse vibrationnelle est le plus souvent faite dans l'approximation harmonique avec l'introduction d'un facteur d'échelle pour compenser l'erreur faite par l'absence de prise en compte de l'anharmonicité [14-15]. La comparaison entre les spectres expérimentaux et simulés permet d'identifier les différentes conformations des molécules étudiées dès lors que celles-ci présentent des signatures spectrales bien différenciées, c'est-à-dire plus grandes que la résolution spectrale expérimentale. Pour des systèmes très flexibles avec un grand nombre de conformations proches en énergie, l'attribution en termes de structure des spectres expérimentaux n'est pas toujours possible d'une manière univoque.

Une autre approche plus proche des conditions expérimentales consiste à simuler l'hétérogénéité conformationnelle des molécules par dynamique moléculaire Car-Parrinello (CPMD) au niveau DFT à température finie (300 K) [16]. Les simulations par dynamique moléculaire sont essentielles pour étudier les changements conformationnels des ions à température ambiante où l'entropie peut jouer un grand rôle. Ce travail a été réalisé par le groupe de Marie-Pierre Gaigeot à l'Université d'Évry qui a développé cette méthode pour simuler les spectres IR. Dans la méthode CPMD, les noyaux atomiques sont traités classiquement par résolution des équations de Newton à température finie, alors que les électrons sont traités à un niveau quantique dans le formalisme DFT avec la fonctionnelle BLYP et une base atomique d'onde plane. Ce type de traitement théorique, très coûteux en temps de calcul, n'est applicable que sur des systèmes de taille relativement modeste. Afin de réduire les temps de calcul, la fonction d'onde électronique est déterminée par résolution de l'équation de Schrödinger une seule fois au début de la dynamique et est ensuite propagée adiabatiquement au cours de la dynamique des noyaux. Un spectre IR est tiré de la dynamique en calculant la transformée de Fourier de la fonction de corrélation du moment dipolaire

au cours de la trajectoire. Le spectre simulé prend donc en compte sans approximation les effets anharmoniques lors de la dynamique à température finie.

Structures et sites de protonation dans les petits peptides

La détermination des sites de protonation les plus probables peut se faire soit par calcul de l'affinité protonique ou la basicité d'une molécule, soit expérimentalement par des méthodes cinétiques par comparaison avec des systèmes moléculaires de référence pour lesquels ces valeurs ont été bien établies. La spectroscopie IRMPD permet la détermination directe des sites de protonation en comparant le spectre IR expérimental avec le spectre simulé de chaque tautomère. Nous avons illustré par l'étude de dipeptides contenant le résidu alanine la compétition entre différents sites de protonation [17-18].

La dialanine protonée possède plusieurs sites de protonation, les deux groupements les plus basiques correspondant aux N terminal (noté A) et carbonyle C=O (noté O) de la liaison peptidique (figure 2). Les énergies libres à 300 K des différents tautomères optimisés au niveau DFT/B3LYP/6-31G* indiquent que seules les conformations A, et dans une moindre mesure les conformations O, peuvent être peuplées dans les conditions expérimentales. Pour les tautomères A, plusieurs conformères qui diffèrent par l'orientation du groupement carboxylique autour du squelette peptidique donnent un bon accord avec le spectre expérimental (figure 3). Par contre, le tautomère O pour lequel le proton a été transféré du N terminal au carbonyle adjacent ne permet pas de simuler correctement le spectre expérimental ; donc ce type de conformation ne peut être que très faiblement peuplée dans les conditions expérimentales. Pour le dipeptide Ala-His, il existe deux autres sites basiques sur le groupement imidazole de la chaîne latérale de l'histidine, l'azote (noté N) et le groupe NH (noté NH), qui rentrent en compétition avec les autres sites déjà évoqués pour la dialanine (figure 2). Les tautomères N sont les structures de plus basses énergies, mais il est nécessaire de prendre en compte plusieurs conformations qui diffèrent principalement par l'orientation du groupe imidazole autour de la liaison C_α-C_β pour reproduire le spectre expérimental. Ces deux exemples montrent bien que les sites de protonation peuvent être déterminés par spectroscopie IR, mais qu'il existe une grande hétérogénéité conformationnelle des molécules étudiées due à la température expérimentale (300 K). L'interprétation d'un spectre expérimental par comparaison avec des structures optimisées à 0 K (calculs « statiques ») n'est objectivement pas la bonne approche. Nous avons donc proposé d'appliquer la dynamique moléculaire Car-Parrinello (CPMD) pour rendre compte

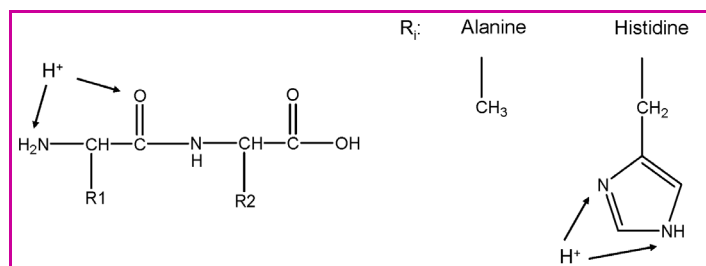


Figure 2 - Les différents sites de protonation dans les peptides, sur le N terminal, sur l'oxygène carbonyle et au niveau d'un résidu basique (histidine).

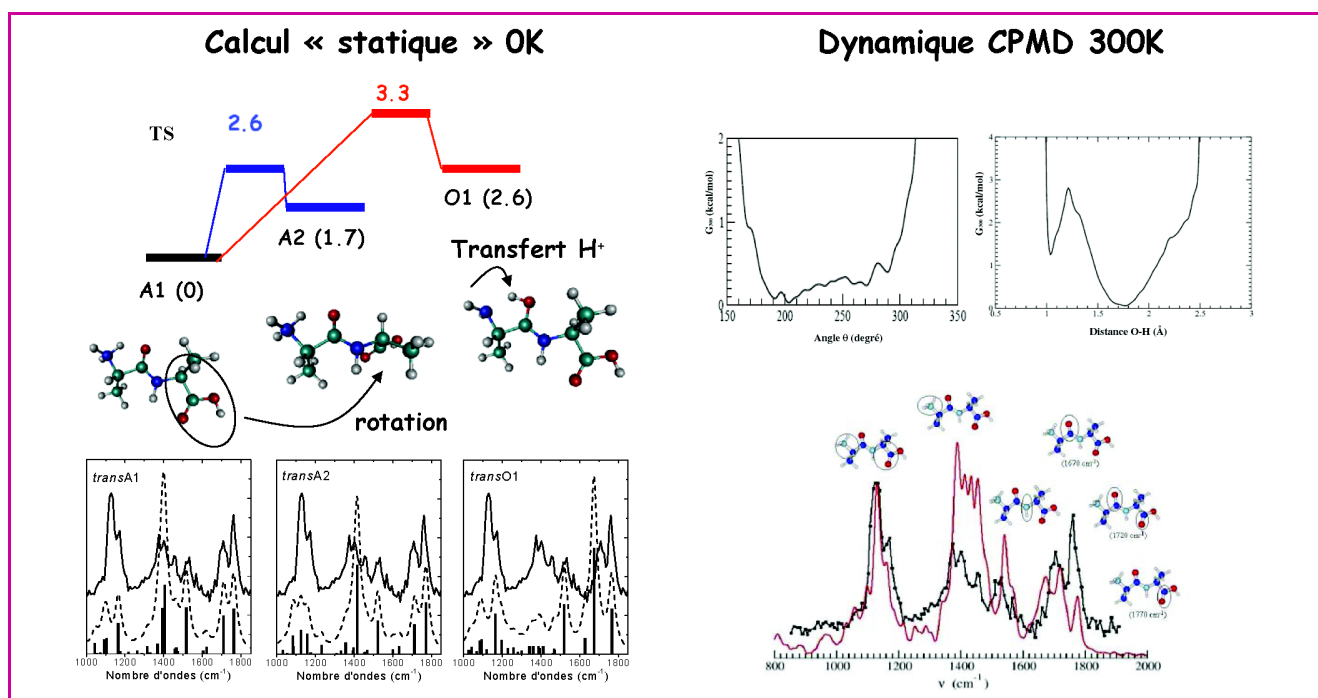


Figure 3 - Comparaison des traitements théoriques « statiques » à 0 K et des simulations par dynamique moléculaire Car-Parrinello à 300 K de la dialanine protonée.

À gauche, les énergies libres G_{300} des différentes conformations optimisées par le calcul statique de la dialanine sont données entre parenthèses en kcal/mol. Spectres IRMPD (trait plein) et théoriques (barres verticales et convoluées par une fonction gaussienne en pointillé) des trois structures considérées. À droite, profils d'énergie libre issus des dynamiques CPMD en fonction de l'angle dièdre CNCC (isomérisation A1/A2) et de la distance O-H (isomérisation A/O). Le spectre IR calculé (rouge) donne un bon accord avec le spectre IRMPD (noir).

explicitement des effets de température et de simuler le spectre vibrationnel de la dialanine protonée.

Plusieurs dynamiques ont été effectuées en partant des différents tautomères A et O de la dialanine et ont révélé deux résultats importants [8]. Premièrement, il y a une isomérisation complète entre les deux structures A1 et A2 qui diffèrent par l'orientation du groupe carboxylique autour de l'angle dièdre CNCC du squelette peptidique, à 200° et 285° respectivement. Le profil d'énergie libre en fonction de l'angle dièdre CNCC tiré des dynamiques CPMD montre bien que la transition entre les deux conformères est continue et sans barrière à 300 K, alors que les calculs « statiques » prévoient une barrière énergétique avec un état de transition à plus de 2 kcal/mol (énergie libre à 300 K avec correction de l'énergie de point zéro, *figure 3*). Deuxièmement, il existe un transfert de proton spontané entre le N terminal (A) et le carbonyle adjacent (O). Cet événement a une occurrence limitée mais correspond néanmoins à une forme métastable (isomère O) de la dialanine. Le profil d'énergie libre en fonction de la distance O-H⁺ (*figure 3*) est caractéristique d'un double bassin séparé par une barrière d'énergie libre (3 kcal/mol) entre les tautomères A et O.

Ce résultat illustre bien que la notion de structure figée dans la représentation « statique » n'a plus forcément de sens au vu de la dynamique moléculaire à 300 K. Le spectre IR simulé (*figure 3*) a été obtenu sur une moyenne des trajectoires issues de la dynamique CPMD initiées à partir des configurations A et O. Outre le problème de l'intensité des transitions relié à la technique IRMPD, l'accord avec le spectre expérimental est très satisfaisant, notamment pour la position et la forme des bandes vibrationnelles, avec la prise en compte explicite des effets de température et d'anharmonicité absents du traitement « statique ».

Notion de pharmacophore et effets de solvation

L'activité biologique d'une molécule est reliée à sa capacité à se lier d'une manière spécifique à son récepteur par formation de liaisons intermoléculaires non covalentes entre les différents groupements chimiques, les pharmacophores. L'acétylcholine est un neurotransmetteur important des systèmes nerveux central et périphérique qui possède deux types de récepteurs, nicotinique et muscarinique. Dans sa forme bioactive, l'acétylcholine est chargée positivement au niveau du groupement ammonium triméthyle, comme ses deux agonistes, la muscarine et la nicotine, cette dernière étant protonée au niveau de l'azote quaternaire méthylé. Les deux éléments principaux impliqués dans la reconnaissance moléculaire spécifique de ces molécules au niveau des récepteurs sont une interaction cation- π entre le groupement chargé et des résidus aromatiques du récepteur (tryptophane et tyrosine), ainsi que la formation de liaisons hydrogène directes ou *via* quelques molécules d'eau au niveau de l'oxygène carbonyle O₃ (récepteur nicotinique) et ester O₄ (récepteur muscarinique). L'interaction de l'acétylcholine avec son récepteur correspond donc à une situation intermédiaire entre un système totalement solvaté et isolé où quelques molécules d'eau interagissent au niveau du récepteur. Dans le récepteur nicotinique, la distance entre les deux pharmacophores de l'acétylcholine, l'azote quaternaire N₇ et l'oxygène carbonyle O₃, doit être comprise entre 4,4 et 5,5 Å. Nous avons donc étudié ces trois molécules chargées par spectroscopie IR afin de déterminer leurs structures et les distances entre les différents groupes pharmacophores en phase gazeuse et aussi en phase liquide afin d'estimer l'influence de la solvation sur les paramètres structuraux [19].

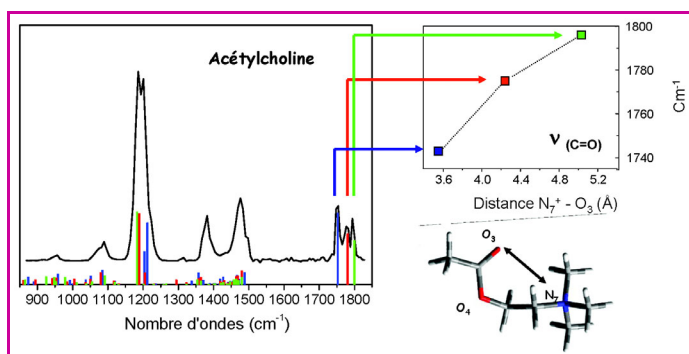


Figure 4 - Spectres IRMPD et simulés (barres verticales) des trois conformations de l'acétylcholine et relation entre la valeur mesurée de la vibration C=O carbonyle et la distance entre les deux pharmacophores N⁺ et O.

Ces molécules sont très flexibles et possèdent un grand nombre de conformations de basse énergie comme il a été montré dans de précédentes études théoriques [20]. Le spectre IRMPD de l'acétylcholine (figure 4) est caractérisé par une transition intense autour de 1 200 cm⁻¹ correspondant à l'élongation C-O ester ainsi que par la bande du C=O carbonyle qui présente trois transitions distinctes entre 1 750 et 1 800 cm⁻¹. Il faut donc prendre en compte les trois conformères de plus basses énergies afin de reproduire le spectre expérimental de l'acétylcholine en phase gazeuse à 300 K (figure 4). L'analyse du mode d'élongation C=O carbonyle permet de remonter directement à la distance entre les deux groupes pharmacophores de l'acétylcholine. En phase gazeuse, seule la conformation caractérisée par la bande C=O à 1 794 cm⁻¹ correspond à une distance N⁺-O₃ de 5,3 Å qui rentre dans l'intervalle des distances « bioactives », les autres conformères possédant une distance plus courte de 3,55 et 4,24 Å. Par contre, les quatre conformations simulées en phase liquide présentent une distance N⁺-O₃ comprise entre 4,6 et 5,2 Å, ce qui met en évidence la diminution d'une part de l'interaction électrostatique entre les deux pharmacophores et d'autre part de la flexibilité de l'acétylcholine en présence de solvant.

Le cas de la nicotine, et l'influence du solvant sur sa structure, sont encore plus intéressants. La nicotine possède deux cycles pyridine et pyrrolidine reliés par une liaison C-C. Elle possède également deux sites de protonation sur les azotes N₁(sp²) et N₁₂(sp³) des groupes pyridine et pyrrolidine (figure 5). Le site de protonation de la nicotine en phase liquide est sur l'azote du cycle pyrrolidine, et son spectre FT-IR en phase liquide présente une bande autour de 1 450 cm⁻¹ caractéristique des modes de pliage N₁₂-H⁺ dans le plan et hors plan. En phase gazeuse, le spectre IRMPD de la nicotine protonée présente une transition intense à 1 539 cm⁻¹ qui est caractéristique du mode pliage N₁-H⁺ correspondant au site de protonation sur le cycle pyridine. Ce résultat a permis de déterminer expérimentalement pour la première fois le site de protonation de la nicotine en phase gazeuse, différent de celui rencontré en phase liquide.

Vers l'étude de systèmes de grandes tailles : caractérisation de structures secondaires

L'étude des brins d'ADN est particulièrement intéressante car de nombreuses structures secondaires peuvent être formées dans ces systèmes, la plus connue étant la double

hélice de type Watson-Crick. Nous avons étudié un autre type de structure secondaire caractéristique des séquences d'ADN riches en guanine, les quartets de guanine, où quatre guanines coplanaires sont liées par liaisons hydrogène de type Hoogsteen. Quand les quartets sont empliés les uns sur les autres, ils forment des quadruplexes. Ce type de structure est rencontré notamment aux extrémités des chromosomes, les télomères. La séquence télomérique humaine est formée par une succession de motifs TTAGGG (T : thymine, A : adénine, G : guanine) qui se replie sur elle-même pour former des quadruplexes de guanine antiparallèles.

Les quadruplexes de guanine ont été caractérisés en phase condensée, notamment par spectroscopie FT-IR [21]. Si la technique électrospray permet de mettre en phase gazeuse des macromolécules et leurs complexes formés en phase liquide, la spectrométrie de masse ne permet pas d'affirmer que leur structure native est conservée en l'absence de solvant. Nous avons donc étudié différentes séquences d'ADN pouvant former des quadruplexes afin de déterminer par spectroscopie IR sur des ions sélectionnés en masse la signature spectrale d'une telle structure. Étant donné la grande taille des systèmes, l'interprétation des spectres expérimentaux ne peut pas se faire par comparaison avec des calculs de chimie quantique. Nous avons donc comparé la spectroscopie IR de brins de différentes tailles contenant une ou quatre répliques de séquences riches en guanine [6].

La séquence TGGGGT est un système modèle pour l'étude de quadruplexes parallèles en phase gazeuse. Elle forme un complexe tétramérique [(TGGGGT)₄ + (NH₄⁺)₃] qui a été caractérisé par spectrométrie de masse [22]. Les spectres IR des brins d'ADN dans la région 1 000-2 000 cm⁻¹ sont caractérisés par trois bandes principales, correspondant aux élongations symétriques (1 080 cm⁻¹) et asymétriques (1 260 cm⁻¹) des phosphates PO₂⁻ et des C=O carbonyle des bases nucléiques (thymine et guanine) autour de 1 700 cm⁻¹. On ne constate pas de déplacement significatif sur les bandes des phosphates alors que la bande des C=O carbonyle est déplacée dans le rouge de 25 cm⁻¹ entre le simple brin (1 720 cm⁻¹) et le complexe tétramérique (1 695 cm⁻¹). On peut noter que cette dernière valeur est très proche de celle mesurée en phase liquide (1 693 cm⁻¹), ce qui s'explique par le fait que l'eau n'est pas en interaction

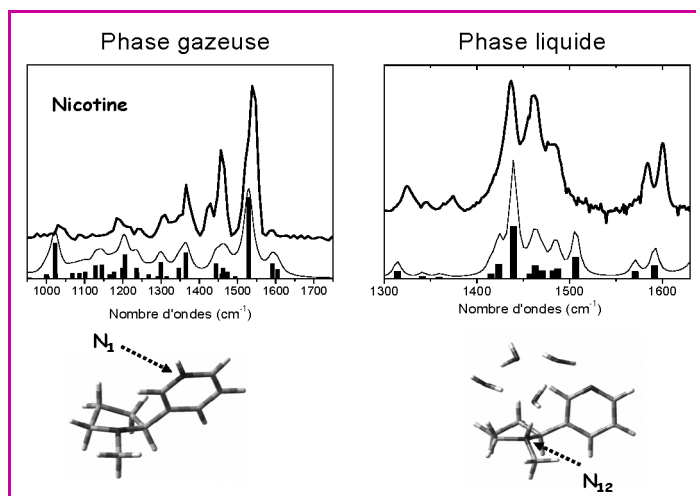


Figure 5 - Comparaison des spectres IR de la nicotine protonée en phase gazeuse (sur le cycle pyridine) et en phase liquide (sur le cycle pyrrolidine). En trait gras : les spectres expérimentaux ; en trait fin : les spectres convolués des transitions calculées (barres verticales).

directe avec les guanines liées au niveau des tétrades. La stœchiométrie du complexe avec l'ajout de trois ions ammonium et le décalage vers le rouge de la bande des C=O carbonyle confirme la formation en phase gazeuse de quadruplexes de guanine dans le système modèle TGGGGT.

L'étude de la séquence télomérique humaine TTAGGG a été faite en comparant les signatures spectrales du simple brin (noté T₁) détecté à la masse [TTAGGG]²⁻, du brin contenant quatre répliques (noté T₄) détecté à la masse [TTAGGG TTAGGG TTAGGG]⁵⁻ et de son complexe [T₄ + (NH₄⁺)₂]⁵⁻. Là encore, on observe un décalage progressif vers le rouge de la bande des C=O carbonyle (figure 6) entre [T₁]²⁻, [T₄]⁵⁻ et [T₄ + (NH₄⁺)₂]⁵⁻ avec l'apparition d'une bande dans le complexe à 1 685 cm⁻¹, valeur très proche de ce qui est mesuré en phase liquide pour les quadruplexes antiparallèles (1 681 cm⁻¹). La structure en quadruplexe est donc stabilisée par l'ajout de deux ions ammonium entre les trois plans des tétrades de guanine dans le brin contenant quatre répliques de la séquence télomérique humaine TTAGGG. Ce résultat ouvre la voie vers l'étude des complexes ADN-drogue, isolés et sélectionnés en masse, pour le ciblage de molécules thérapeutiques stabilisant la structure en quadruplexe des télomères [23].

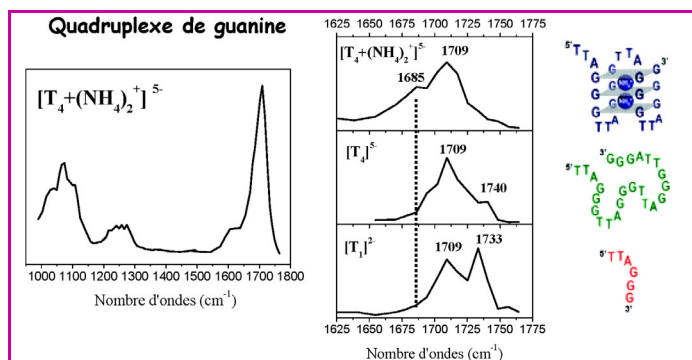


Figure 6 - Spectre IRMPD du complexe du brin d'ADN contenant quatre répliques de la séquence télomérique humaine détectée avec l'ajout de deux ions ammoniums. Le décalage vers le rouge de la bande des C=O carbonyle (1 685 cm⁻¹) est spécifique de la formation de quadruplexe antiparallèle.

Perspectives

Ces études ont montré la possibilité d'enregistrer les spectres IR d'ions biomoléculaires en phase gazeuse, isolés et sélectionnés en masse. La technique IRMPD est universelle, elle s'applique aux systèmes modèles tels que les petits peptides et aussi aux systèmes de plus grande taille contenant des centaines d'atomes. La résolution spectrale IR est néanmoins limitée par la résolution du laser à électron libre, mais surtout par l'élargissement rotationnel dû à la température proche des conditions physiologiques (300 K). Nous travaillons actuellement au développement d'une nouvelle source de mise en phase gazeuse de molécules d'intérêt biologique où les molécules et leurs complexes neutres ou ioniques, issus d'une désorption laser sur microgouttelettes directement sous vide, seront entraînés et refroidis rovibrationnellement dans une détente supersonique de gaz rare. Le but est alors d'étudier les complexes biomoléculaires de type récepteur-ligand dans des conditions au plus proche de leur forme native en solution, tout en connaissant parfaitement la stœchiométrie. Les études expérimentales sur les systèmes complexes de grande taille ouvrent aussi un nouveau challenge pour le traitement

théorique. Les données spectroscopiques tirées des expériences serviront sans aucun doute à tester et valider de nouvelles approches théoriques pour simuler les spectres IR de systèmes contenant plusieurs centaines d'atomes.

Remerciements

Les auteurs remercient toutes les personnes de l'équipe AMIBES du LPL, le groupe de Philippe Maitre du LCP, Jean-Michel Ortéga pour CLIO, Marie-Pierre Gageot de l'Université d'Évry pour les simulations CPMD et Valérie Gabélica de l'Université de Liège pour l'étude des quadruplexes de guanine.

Références

- [1] Mons M., Piuze F., Dimicoli I., *L'Act. Chim.*, **2007**, 314, p. 19.
- [2] Grégoire G., Velasquez J., Duncan M.A., *Chem. Phys. Letters*, **2001**, 349, p. 451.
- [3] Kamariotis A., Boyarkin O.V., Mercier S.R., Beck R.D., Bush M.F., Williams E.R., Rizzo T.R., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, p. 905.
- [4] Eyley J.R., *Mass Spectrometry Reviews*, **2009**, 28, p. 448.
- [5] Stearns J.A., Seabey C., Boyarkin O.V., Rizzo T.R., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2009**, 11, p. 125.
- [6] Gabelica V., Rosu F., De Pauw E., Lemaire J., Gillet J.C., Pouilly J.C., Lecomte F., Grégoire G., Schermann J.P., Desfrancois C., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, p. 1810.
- [7] Stearns J.A., Guidi M., Boyarkin O.V., Rizzo T.R., *J. Chem. Phys.*, **2007**, 127, p. 154322.
- [8] Marinica D.C., Grégoire G., Desfrancois C., Schermann J.P., Borgis D., Gageot M.P., *J. Phys. Chem. A*, **2006**, 110, p. 8802.
- [9] Bakker J.M., Besson T., Lemaire J., Scuderi D., Maitre P., *J. Phys. Chem. A*, **2007**, 111, p. 13415.
- [10] Mac Aleese L., Simon A., McMahon T.B., Ortega J.M., Scuderi D., Lemaire J., Maitre P., *Int. J. Mass Spectrom.*, **2006**, 249, p. 14.
- [11] Grégoire G., Gageot M.P., Marinica D.C., Lemaire J., Schermann J.P., Desfrancois C., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2007**, 9, p. 3082.
- [12] Oomens J., Sartakov B.G., Meijer G., von Helden G., *Int. J. Mass Spectrom.*, **2006**, 254, p. 1.
- [13] Pouilly J.C., Grégoire G., Schermann J.P., *J. Phys. Chem. A*, **2009**, 113, p. 8020.
- [14] Bouteiller Y., Pouilly J.C., Desfrancois C., Grégoire G., *J. Phys. Chem. A*, **2009**, 113, p. 6301.
- [15] Bouteiller Y., Gillet J.C., Grégoire G., Schermann J.P., *J. Phys. Chem. A*, **2008**, 112, p. 11656.
- [16] Gageot M.P., Sprik M., *J. Phys. Chem. B*, **2003**, 107, p. 10344.
- [17] Lucas B., Grégoire G., Lemaire J., Maitre P., Ortega J.M., Rupenyana A., Reimann B., Schermann J.P., Desfrancois C., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2004**, 6, p. 2659.
- [18] Lucas B., Grégoire G., Lemaire J., Maitre P., Glotin F., Schermann J.P., Desfrancois C., *Int. J. Mass Spectrom.*, **2005**, 243, p. 105.
- [19] Seydou M., Grégoire G., Liquier J., Lemaire J., Schermann J.P., Desfrancois C., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, p. 4187.
- [20] Munoz-Caro C., Nino A., Mora M., Reyes S., Melendez F.J., Castro M.E., *Journal of Molecular Structure THEOCHEM*, **2005**, 726, p. 115.
- [21] Guzman M.R., Liquier J., Brahmachari S.K., Taillandier E., *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **2006**, 64, p. 495.
- [22] Baker E.S., Bernstein S.L., Gabelica V., De Pauw E., Bowers M.T., *Int. J. Mass Spectrom.*, **2006**, 253, p. 225.
- [23] Hurley L.H., *Nature Reviews Cancer*, **2002**, 2, p. 188.



J.C. Pouilly

Jean Christophe Pouilly, ancien doctorant au LPL, est maître de conférences au Centre de Recherche sur les Ions, les Matériaux et la Photonique de Caen*.

Gilles Grégoire (auteur correspondant) est chargé de recherche au CNRS au



G. Grégoire

Laboratoire de Physique des Lasers (LPL) de l'Institut Galilée**. Il a reçu le **prix Jeune chercheur 2008 de la division de Chimie physique** de la SCF.

* Centre de Recherche sur les Ions, les Matériaux et la Photonique, UMR 6252 CEA/CNRS/ENSICAEN/Université de Caen, 6 bd du Maréchal Juin, F-14050 Caen Cedex 4.
Courriel : pouilly@ganil.fr

** Laboratoire de Physique des Lasers, UMR 7538 CNRS-Université Paris 13, Institut Galilée, Avenue J.-B. Clément, F-93430 Villetaneuse.
Courriel : gilles.gregoire@univ-paris13.fr
http://www-lpl.univ-paris13.fr