

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Systèmes bio-organiques/Spectrochimie

Ecole doctorale Institut Parisien de Chimie Moléculaire

Présentée par Viet Hung NGUYEN

Pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS VI

Sujet : Analyse d'oligonucléotides par bombardement d'électrons rapides

Soutenue le : 27 mars 2012

Composition du jury :

Mr. Guillaume Van Der Rest Rapporteur

Mr. Laurent Debrauwer Rapporteur

Mr. Jean-Marie Schmitter Examineur

Mr. Louis Fensterbank Examineur

Mr. Carlos Afonso Membre invité

Mr. Jean-Claude Tabet Directeur de thèse

Résumé

Sujet : Analyse d'oligonucléotides par bombardement d'électrons rapides

L'objectif de ma thèse est d'étudier des oligonucléotides et mononucléotides par de nouvelles techniques de fragmentation comme l'EDD (*Electron-Detachment-Dissociation*) et l'EID (*Electron-Induced-Dissociation*) qui font intervenir un bombardement d'électrons. Les échantillons sont d'abord ionisés par une source *electrospray* (ESI) qui permet une ionisation douce.

Au cours de mon travail de thèse, je me suis intéressé à l'étude de petits oligonucléotides (ADN et ARN simples brins) et de mononucléotides par EDD et EID. Tout d'abord nous optimisons les différents paramètres qui ont permis d'obtenir en ESI les espèces multichargées pour étudier les processus EDD, EID d'oligonucléotides à des états de charge différents, afin d'obtenir le maximum d'ions fragments. Ces spectres seront comparés avec les spectres SORI-CID (*Collision-Induced-Dissociation*) et IRMPD (*Infrared-Multiphoton-Dissociation*) pour mettre en évidence les spécificités de l'EDD et EID par rapport au SORI-CID. Les spectres EDD et EID montrent quelques ions fragments qui ne sont pas observés dans les spectres SORI-CID et IRMPD parce que ces derniers ne conduisent pas aux ions radicalaires. Grâce aux ions fragments radicalaires obtenus en EDD et en EID, nous avons pu accéder au séquençage d'oligonucléotides riches en thymine pour lesquels il est difficile d'obtenir des informations par les méthodes conventionnelles. Enfin nous avons utilisé des techniques particulières de la technologie ICR et qui seront présentées dans ce manuscrit.

Mots clés :EDD, EID, FT/ICR, bombardement d'électrons, spectrométrie de masse, affinité protonique, affinité électronique, SORI-CID, IRMPD.

Summary

Subject: Oligonucleotide analysis by fast electron bombardment

This work aims to study oligonucleotides and mononucleotides by new fragmentation techniques such as EDD (electron-detachment-dissociation) and EID (electron-induced-dissociation) involving electron bombardment. The samples are first ionized by an electrospray source (ESI), which allows a soft ionization.

During my PhD, I have been interested in the study of smaller oligonucleotides (DNA and RNA single strands) and mononucleotides by EDD and EID. First the different parameters have been optimized in order to obtain by ESI multicharged species to study the EDD process of oligonucleotides with different charge states. These spectra are compared with SORI-CID spectra (Collision-Induced-Dissociation) and IRMPD (Infrared Multiphoton-Dissociation-) to highlight the specificities of the EDD and EID. Compared to SORI-CID, EDD and EID spectra show some fragment ions, which are not observed in the SORI-CID and IRMPD spectra because they do not lead to radical ions. Thanks to the radical fragment ions obtained by EDD and EID, we were able to access the sequencing oligonucleotides rich in thymine for which it is difficult to obtain information by conventional methods. Finally we used special techniques of ICR technology which will be presented in this manuscript.

Keywords: EDD, EID, FT / ICR, electron bombardment, mass spectrometry, proton affinity, electron affinity, SORI-CID, IRMPD.

à ma femme Nga

à mes parents

à toute ma famille

Remerciements

Ce travail a été effectué sous la direction de Monsieur le Professeur Jean-Claude TABET au sein de l'équipe de Chimie Structurale Organique et Biologique de l'Institut Parisien de Chimie Moléculaire à l'Université Pierre et Marie Curie. Je le remercie tout particulièrement de m'avoir accueilli dans son groupe et de m'avoir transmis son savoir ainsi que des idées scientifiques qui m'ont été très précieuses. Son immense connaissance et sa réflexion approfondie m'ont aidé non seulement à avancer ma thèse mais ils m'ont permis aussi de mieux réfléchir et de mieux comprendre la spectrométrie de masse. Je lui exprime mes plus sincères remerciements pour le temps qu'il a consacré au suivi de mes recherches et à la correction de ce mémoire.

Je tiens à exprimer ma très grande gratitude à Monsieur le Professeur Carlos AFONSO pour son encadrement scientifique durant ces trois années pendant lesquelles il m'a appris à maîtriser les appareils qui ont servi à réaliser mes travaux de recherche, notamment le FT/ICR, ainsi que pour sa culture scientifique qui m'a aidé à avancer plus rapidement. Je le remercie également pour son aide précieuse lors de la rédaction et la relecture de ce manuscrit.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur Guillaume Van Der REST et Monsieur Laurent DEBRAUWER pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Louis FENSTERBANK et Monsieur le Professeur Jean-Marie SCHMITTER pour leur participation à l'évaluation de ce travail. Je remercie aussi Monsieur le Professeur Carlos AFONSO d'avoir bien voulu être membre de mon jury de thèse.

Mes remerciements vont également à Sandra ALVES et Marie PEROT-TAILLANDIER pour la correction de ce manuscrit et pour leur gentillesse. Un grand merci à Anna WARNET et Maria LUC pour la gestion et l'organisation du laboratoire. Je remercie aussi Philippe COLOMBY pour sa bonne humeur et sa gentillesse. Je remercie aussi ma collègue préférée Héloïse DOSSMANN pour son aide précieuse lors de la relecture de ce manuscrit. Sa rigueur et son perfectionnisme m'ont servi de référence.

J'adresse vivement mes remerciements à ma collègue et amie, Baiyi XUE, je la remercie de m'avoir supporté ces trois années de thèse, un stage de Master 2 ainsi que les deux années d'étude en Master. Durant ces années, elle qui m'a beaucoup soutenu et elle m'a toujours aidé avec enthousiasme. Son intelligence et son professionnalisme ont été pour moi une grande aide.

Il m'est particulièrement agréable de remercier les personnes avec lesquelles j'ai partagé ces trois dernières années. Les étudiants, anciens (Ludovic MULLER, Chafia BENACHEUR...) et nouveaux (Bessem BRAHIM, Farrid ICHOU, Ljubica, Adrien...) pour leur soutien et l'ambiance agréable dans laquelle nous avons travaillé. Les permanents du laboratoire, en particulier Sandra ALVES qui ont su partager leurs connaissances avec patience. Enfin, je dédicace cet ouvrage et ces années de travail à ma famille et mes amis. Je les remercie du fond du cœur pour leurs encouragements et leur amour.

Je remercie aussi SANOFI d'avoir financé mon doctorat pendant les trois années de thèse.

Sommaire

Avant-propos.....	15
Chapitre I : Introduction.....	17
1. ADN et ARN.....	19
1.1. Nomenclature.....	19
1.2. Des briques de l'ADN et ARN : les bases azotées	19
1.3. Evolution historique de l'ADN et de l'ARN.....	20
1.4. Fonctions de l'ADN et ARN	21
1.5. Structure de l'ADN et de l'ARN	22
2. Les Interactions non-covalentes impliquées dans le système ADN et ARN	23
2.1. Rôle des interactions non-covalentes (en solution et en phase gazeuse).....	23
2.2. Les interactions électrostatiques	23
2.3. Les interactions π (π <i>stacking</i>).....	25
2.4. Les interactions hydrophobes	25
2.5. Comparaison des forces d'interactions présentes en solution et maintenues (ou créées) en phase gazeuse.....	26
3. L'analyse des ions sous ultra haute résolution : le FT-ICR.....	28
3.1. Introduction.....	28
3.2. Principe de base	30
3.2.1. Mouvement cyclotronique des ions dans la cellule ICR.....	30
3.2.2. Piège penning.....	32
3.2.3. Principe de fonctionnement	35
3.2.4. Intérêt du FT/ICR.....	45
4. Comportement des acides nucléiques chargés produits par désorption.....	47
4.1. Etude bibliographique de système DNA sous ESI et leur dissociation	47
4.2. Les chemins de fragmentations de l'ADN et de l'ARN	49
5. Comment activer les ions : cas de l'ADN.....	60
5.1. Méthodes d'activation ergodique (CID, IRMPD) utilisées avec un tandem Qh/FT/ICR.	61
5.2. Méthodes non ergodiques (ou considérées comme) d'activation des ions impliquant un bombardement d'électrons (ou le transfert d'électrons).....	66
Références 1.....	72
Chapitre II : Partie expérimentale	81
1. Préparation des échantillons.....	83
Les ADNs utilisés :	83

Les 2'-déoxynucléotides-5'-monophosphates	83
2. Système utilisé: ESI-Qh-FTICR.....	84
2.1. Condition de la source <i>electrospray</i> et les paramètres de traitement de spectre.....	86
3. Paramètres d'appareil et condition d'expériences.....	87
3.1. SORI-CID et l'IRMPD	87
3.2. EDD-EID	87
Références 2.....	88
Chapitre III : Résultats et discussion	89
1. Etude de désoxy-oligonucléotides multidéprotonées par <i>electron detachment dissociation</i> (EDD).....	91
1.1. Introduction.....	91
1.2. Résultats	93
1.2.1. Spectre ESI d'ADN 6mer d(T ₂ CT ₃) en mode négatif.....	93
1.2.2. Activation d'ADN 6-mer multidéprotoné par SORI-CID.....	94
1.2.3. Spectres EDD-EID des ADN 6-mer déprotonés d(T ₂ AT ₃) et d(T ₂ CT ₃).....	96
1.2.4. Expériences de double résonance et MS ³	99
1.2.5. Spectre EDD-EID d'ADN 6-mer déprotonés	102
1.2.6. Spectre EDD d'ADN de plus grande taille (12-mer multidéprotonés).....	104
1.2.7. Comparaison des spectres EDD/SORI-CID et SORI-CID d'ADN 12mer multidéprotoné	105
1.3. Discussion.....	107
1.4. Conclusion	113
2. Etude de mononucléotides déprotonés par dissociation induite par électron (EID).....	114
2.1. Introduction.....	114
2.2. Résultats et discussion	116
2.2.1. Spectres SORI-CID et EID de 2'-déoxynucléotide-5'-monophosphate.....	116
2.2.2. SORI-CID et EID de 2'-désoxyguanosine-5'-monophosphate déprotoné.....	121
2.2.3. Échange H/D	124
2.2.4. IRMPD de l'ion m/z 247 (MS ³).....	124
2.2.5. MS ³ expériences sur [GMP-2H] ⁺	126
2.2.6. Abondance relative des nucléobases radicalaires et du complexe ion-dipôle. .	127
2.2.7. Discussion et mécanismes proposés	128
2.2.8. Les dimères des mononucléotides	131
2.4. Conclusion	138

3. Analyse de l'ADN en mode positif comparaison du mode SORI-CID, ECD et EDD..	139
3.1. Introduction.....	139
3.2. Résultats	140
3.2.1. Spectre de masse d'ADN en mode positif	140
3.2.2. Activation par EDD de l'ADN (GT ₅) multiprotoné.	141
3.2.3. Spectre pos-EDD de l'ADN 12-mer (T ₂ (GC) ₄ T ₂) triplement chargé [M+3H] ³⁺	143
3.2.4. Evolution de l'énergie cinétique des électrons	144
3.3. Conclusion	145
Références 3.....	148
Conclusion générale.....	155
Annexe	A.1
1. Abréviations.....	A.3
2. La source électrospray	A.5
3. Figures supplémentaires.....	A.16
Article 1 : Concomitant EDD and EID of DNA evidenced by MSn and double resonance experiments	
Article 2 : Comparison of collision-induced dissociation and electron-induced dissociation of singly charged mononucleotides	

Avant-propos

L'objectif de ma thèse est d'étudier des oligonucléotides et mononucléotides par de nouvelles techniques de fragmentation comme l'EDD (1, 2) (*Electron-Detachment-Dissociation*) et l'EID (3, 4) (*Electron-Induced-Dissociation*) qui font intervenir un bombardement d'électrons. Les échantillons sont d'abord ionisés par une source *electrospray* (ESI) qui permet une ionisation douce et le passage en phase gazeuse de complexes non-covalents en maintenant ces interactions partiellement intactes. La source *electrospray* est couramment utilisée dans notre laboratoire pour des études différentes, comme l'analyse des systèmes non-covalents par Ludovic Muller (5) et qui fait objet des collaborations avec Amina Woods (6), la mesure des valeurs thermodynamique comme basicité/acidité par Sakira Mezzache (7) et les systèmes complexes ADN/APN par Alice Delvolvé (8). Par la suite les ions multichargés (positifs ou négatifs) sont analysés par un instrument à ultra-haute résolution FT/ICR (*Fourier Transformed /Ion Cyclotron Resonance*).

Ce travail a été initié durant la thèse de Ying Xu (9) où les expériences EDD (10) ont été réalisées sur des complexes d'ADN (doubles brins de 12-mers auto-complémentaires), et des médicaments intercalants et liants de l'ADN (9). Les spectres EDD obtenus ont montré une bonne efficacité de détachement d'électron mais les ions fragments restent limités. Ce comportement peut être expliqué par la présence de nombreuses liaisons non-covalentes qui restent intactes, après la rupture de liaisons covalentes.

Au cours de mon travail de thèse, je me suis intéressé à l'étude d'oligonucléotides plus petits (ADN et ARN simples brins) et des mononucléotides par EDD et EID. Tout d'abord nous optimisons les différents paramètres qui ont permis d'obtenir en ESI les espèces multichargées pour étudier les processus EDD, EID d'oligonucléotides à des états de charge différents, afin d'obtenir le maximum d'ions fragments. Ces spectres seront comparés avec les spectres SORI-CID (*Sustained-Off-Resonance-Irradiation Collision-Induced-Dissociation*) et IRMPD (*Infrared-Multiphoton-Dissociation*) pour mettre en évidence les spécificités de l'EDD et EID par rapport au SORI-CID. Les spectres EDD et EID montrent quelques ions fragments, qui ne sont pas observés dans les spectres SORI-CID et IRMPD parce que ces derniers ne conduisent pas aux ions radicalaires. Grâce aux ions fragments radicalaires obtenus en EDD et en EID, nous avons pu accéder au séquençage d'oligonucléotides riches en thymine pour lesquels il est difficile d'obtenir des informations par les méthodes conventionnelles (11, 12), comme le SORI-CID ou l'IRMPD dans lesquels la fragmentation

Avant-propos

est dirigée par la charge. Ainsi, dans certain cas, grâce au comportement des ions radicaux, nous pouvons proposer des structures spatiales des ions précurseurs en phase gazeuse. Enfin nous avons utilisé des techniques particulières de la technologie ICR et qui seront présentées dans ce manuscrit. La première technique est la double résonance couplée aux modes EDD et EID (13, 14) qui permet d'éliminer un ion intermédiaire produit lors de la dissociation d'ion radicaux, pendant le bombardement d'électrons. En conséquence, les ions fragments consécutifs à l'ion éjecté peuvent disparaître également si leur constante de vitesse est faible. Ce mode a été utilisé avec succès pour mesurer la durée de vie des ions (15, 16), il a aussi été utilisé dans notre laboratoire pour des études d'effet de stéréochimie par Bourgoin-Voillard (17). La deuxième approche que nous présenterons est l'application de processus consécutifs EXD et CID en mode MS³. Grâce à cette technique, les ions fragments issus de processus consécutifs sont mis en évidence. Avec ces deux techniques (double résonance, EXD/CID en mode MS³) nous avons pu prouver l'origine des ions fragments issus soit du processus EDD, soit du processus EID. Des expériences d'échanges H/D en solution ont aussi été envisagées pour éclaircir certains mécanismes. Par ailleurs, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'étude de systèmes repliés par les liaisons non-covalentes, afin de montrer comment les conformations des oligonucléotides en phase gazeuse peuvent être mises en évidence par les techniques EXD.

Chapitre I : Introduction

1. ADN et ARN

Les ADN et ARN sont des systèmes complexes, comprenant des structures primaires, secondaires et tertiaires qui sont assurées par des liaisons covalentes et non covalentes. Ils sont construits par les (désoxy)-ribonucléotides, l'ordre de ces derniers permet l'hérédité.

1.1. Nomenclature

Les noms des nucléosides ont comme suffixe :

- "osine" pour les nucléosides puriques
- "idine" pour les nucléosides pyrimidiques

Les noms des nucléobases sont résumés dans le *Table 1*.

<i>Table 1 : Nomenclature</i>					
Bases azotées		Ribonucléosides		Désoxyribonucléosides	
Nom	Symbole	Nom	Symbole	Nom	Symbole
cytosine	Cyt	cytidine	Cyd	2'-désoxycytidine	dCyd
uracile	Ura	uridine	Urd	2'-désoxyuridine	dUrd
thymine	Thy	thymidine	Thd	(2'-désoxy)thymidine	dThd
adénine	Ade	adénosine	Ado	2'-désoxyadénosine	dAdo
guanine	Gua	guanosine	Guo	2'-désoxyguanosine	dGuo

1.2. Des briques de l'ADN et ARN : les bases azotées

Il existe cinq bases nucléotidiques différentes (*Schéma 1*) dans l'ADN ou l'ARN (18). Un « brin » d'ADN ou ARN est formé par la répétition ordonnée de ces nucléobases, sucre et groupe phosphate. Les bases azotées sont complémentaires deux à deux, une purine s'associant toujours à une pyrimidine : l'adénine s'associe avec la thymine (ou l'uracile) par deux liaisons hydrogène et la guanine avec la cytosine par trois liaisons hydrogène.

* L'adénine (A) et la guanine (G) sont de la famille des purines.

* La thymine (T), uracile et la cytosine (C) sont de la famille des pyrimidines.

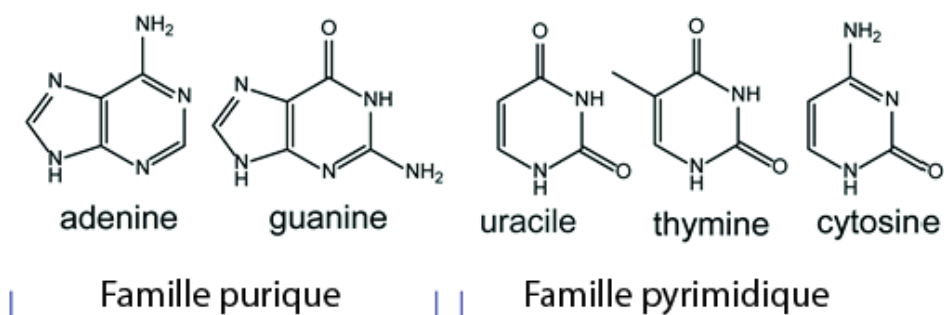


Schéma 1: Structure des nucléobases.

Dans l'ARN, la thymine est remplacée par l'uracile (19) qui appartient aussi à la famille pyrimidique.

1.3. Evolution historique de l'ADN et de l'ARN

En 1869, Friedrich Miescher (20) isole, à partir des noyaux des cellules de pus, une substance riche en phosphore, qu'il nomme nucléine (du latin nucleus, le noyau). La mise en évidence de la composition chimique de la nucléine impliquant un sucre, le désoxyribose, et la reconnaissance de son caractère acide a conduit à l'appeler ensuite acide désoxyribonucléique (ADN).

En 1889, Altmann isole l'acide nucléique à partir de la nucléine, des protéines et une substance acide. Kossel découvre en 1896 que l'acide nucléique est composé en plus du phosphate et ribose de 4 bases azotées Ade, Cyt, Thy, Gua (21). En 1928, Levene et Jacobs identifient le désoxyribose (22), on parle alors d'acide désoxyribonucléique (20). Quant à l'ARN, à partir des années 1939 il a été suspecté de jouer un rôle dans la synthèse de protéines (23).

En 1944, Avery découvre que l'ADN est l'agent transformant des bactéries, et prouve donc que l'ADN est bien le support de l'hérédité (24). En 1952, l'expérience de Hershey et Chase valide définitivement cette hypothèse.

C'est au laboratoire Cavendish de Cambridge le 25 avril 1953, qu'a été établie la structure en double hélice de l'ADN (25), grâce à la technique de diffraction des rayons X. On doit cette découverte à James Watson, alors âgé de 25 ans, Francis Crick, physicien de formation et Maurice Wilkins. Tous trois reçurent le Prix Nobel de médecine en 1962.

En se basant sur les analyses cristallographiques aux rayons X de Franklin, sur les compétences de Crick en génétique et sur les processus biologiques et celle de Watson en cristallographie, ils proposent la structure en double hélice de la molécule d'ADN (acide désoxyribo-nucléique), publiée en 1953 dans la revue Nature (25,26). Ils s'appuient sur un fait déjà établi : pour une espèce donnée, les quantités de A et T d'une part et C et G d'autre part sont sensiblement égales. Par exemple, chez l'homme : A=30,4% & T=30,1% ; C=19,6% & G=19,9%. Ce sont les règles d'équivalence de Chargaff, établies depuis 1949 (27). Ces règles leur ont suggéré la complémentarité des bases. En combinant ces données, ils ont construit, avec des tiges métalliques, le premier modèle en double hélice de l'ADN.

En 1959, le prix Nobel de physiologie de médecine est décerné à Severo Ochoa de Albornoz et à Arthur Kornberg pour la découverte du mécanisme biologique de la synthèse de ARN (28). La séquence de 77 nucléotides de levure *t*ARN a été trouvée par Robert W. Holley (29) qui lui permet de recevoir le prix Nobel en 1968.

1.4. Fonctions de l'ADN et ARN

L'ADN

1. La fonction principale de l'ADN est de stocker l'information génétique, information qui détermine le développement et le fonctionnement d'un organisme. Cette information est contenue dans l'enchaînement non-aléatoire de nucléotides (30).

2. Une autre fonction essentielle de l'ADN est la transmission de cette information de génération en génération. Cela permet l'hérédité (24,30).

3. L'information portée par l'ADN peut se modifier au cours du temps. Cela aboutit à une diversité des individus et à une évolution possible des espèces. Cela est dû à des mutations principalement induites par des erreurs lors de la réplication des séquences d'ADN (ajout, délétion ou substitution de nucléotides) ou bien à des recombinaisons génétiques (24).

L'ARN

- l'ARN *messenger* porte des instructions pour former une seule protéine (31).
- l'ARN de *transfert* est impliqué dans l'adressage des acides aminés vers les ribosomes lors de la traduction (32).
- l'ARN *catalytique* est capable de catalyser une réaction d'hydrolyse ou de trans-estérification spécifique, en l'absence de protéine (31).

1.5. Structure de l'ADN et de l'ARN

L'ADN et ARN peuvent être des macromolécules, composées d'une succession de nucléotides accrochés les uns aux autres par des liaisons phosphodiester (33). Il existe quatre nucléotides pour l'ADN : Ado, Cyd, Guo et Thd. Pour l'ARN, la Thd est remplacée par Urd (19).

L'ADN est formé de deux brins complémentaires enroulés en hélice (double hélice). L'ADN peut prendre plusieurs formes mais la forme B (34) (*Figure 1*) est la conformation majeure en solution, où la double hélice possède les caractéristiques suivantes :

- * 10,5 paires de bases par tour ;
- * un pas de l'hélice (hauteur entre deux tours) de 0,34 nanomètres.

Une forme alternative à la double hélice B est l'ADN A. Cette forme apparaît quand la quantité d'eau disponible pour hydrater la double hélice est insuffisante. Dans la double hélice A, le pas est de 2,46 nm et un tour complet de l'hélice demande 11 paires de bases.

Il existe une troisième forme de l'ADN, qui présente une double hélice tournée vers la gauche. Elle s'appelle l'ADN Z. Dans cette molécule d'ADN, les liaisons N-glycosyl des résidus Guanine sont tournées de 180° par rapport à leur conformation dans l'ADN B.

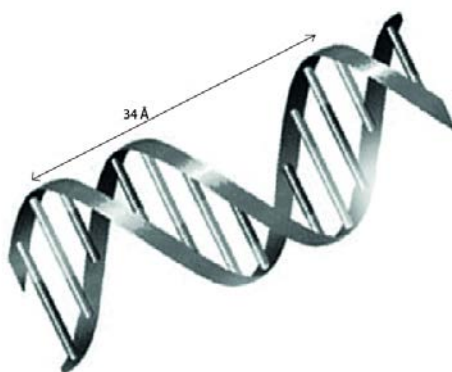


Figure 1. Structure de double hélice B de l'ADN

Certaines séquences d'ADN ou ARN peuvent s'associer ensemble si les extrémités de ces derniers sont complémentaires, dans ce cas on parle de structure *Hairpin* (épinglé à cheveux *Figure 2*)

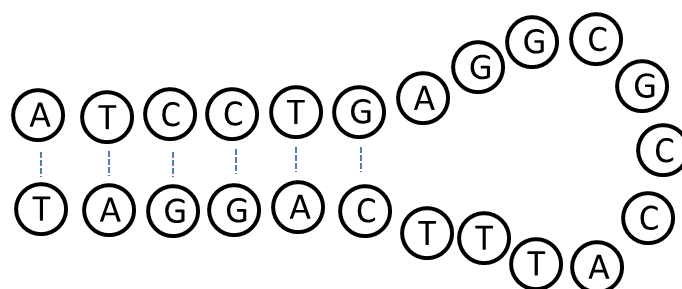


Figure 2. Conformation Hairpin d'un ADN auto-complémentaire

2. Les interactions non-covalentes impliquées dans le système ADN et ARN

2.1. Rôle des interactions non-covalentes (en solution et en phase gazeuse)

L'ADN joue un rôle important dans les milieux biologiques, et ce, grâce à leur association à des partenaires co-activateurs ou co-répresseurs, eux-mêmes guidés par des propriétés structurales intrinsèques de l'ADN (structures primaire, secondaire et tertiaire). Ces structures sont assurées en partie par les interactions non-covalentes. Bien que les interactions non-covalentes mettent en jeu des énergies plus faibles (~ 100 kJ/mol) par rapport aux liaisons covalentes (150 à 450 kJ/mol) (35), elles sont à l'origine de la conformation de l'ADN. Elles sont, en outre, responsables de la formation réversible de la plupart des complexes biologiques et donc capables d'en modifier les fonctions.

L'étude des interactions non-covalentes a conduit à une meilleure compréhension des systèmes complexes où interviennent des ADNs. Parmi les systèmes biologiques les plus étudiés figurent les complexes ADN/ADN (duplex, triplex et quadruplex), ADN/protéine, ADN/ARN, ADN/métal, ADN/médicament.

2.2. Les interactions électrostatiques

Les interactions électrostatiques en solution et phase gazeuse mettent en jeu des énergies inversement proportionnelles à la distance interatomique r ($1/r^n$). Ces interactions peuvent se diviser en plusieurs catégories : les forces coulombiennes (interactions ion-ion, ion-dipôle (*e.g.*, liaison hydrogène) ou ion-dipôle induit), les forces de *van der Waals* (interactions dipôle-dipôle) et les interactions π -stacking (Table 2).

Forces coulombiennes

La force de Coulomb (36) a été décrite comme la force s'exerçant entre des particules chargées de type ion-ion, ion-dipôle, ion-dipôle induit. Les interactions ion-ion répondent à la loi de Coulomb (Équation 1). Ainsi, l'énergie mise en jeu dans les interactions ion-ion dépend de $r_{1,2}$ et du milieu où l'effet d'écran des charges dans le gaz à faible pression peut s'approcher du « vide absolu », dans ce cas ($\epsilon = \epsilon_0 = 8.85 \times 10^{-12} \text{ F.m}^{-1}$).

$$E = \frac{q_1 q_2}{4\pi\epsilon_0 r_{1,2}} \quad (1)$$

Les interactions ion-dipôle et ion-dipôle induit sont plus faibles que les interactions ion-ion puisqu'au lieu d'intervenir entre deux charges, elles ont lieu entre une charge et un atome partiellement chargé. Donc, la charge totale du système est diminuée, leurs énergies dépendent respectivement de $1/r^2$ et de $1/r^4$ pour les interactions ion-dipôle et ion-dipôle induit.

La liaison hydrogène

La liaison hydrogène est fondamentale dans le contexte de la biologie structurale (37, 38). Elle correspond généralement à une interaction dipôle-dipôle ($X^{\delta-} \cdots H^{\delta+} \cdots X^{\delta-}$) entre un atome d'hydrogène (δ^+) et un atome électronégatif (δ^-). Par exemple, les groupements donneurs de proton tel que NH_2 ou OH s'associent avec les groupements accepteurs $C=O$, par ces doublets des liaisons peptidiques pour structurer l'ADN en hélice (Schéma 2). Dans certains cas, la liaison hydrogène peut relever d'une interaction ion-dipôle impliquant un proton (H^+) et un anion ou un proton et un atome possédant des doublets libres d'électrons. Ces interactions possèdent la propriété d'être directionnelles puisqu'elles sont disposées de façon linéaire entre trois atomes en liaison directe. Il apparaît ainsi que les liaisons hydrogènes sont déterminantes dans la structuration des protéines et des complexes non-covalents. Toutefois, en phase gazeuse les interactions ion-dipôle ou dipôle induit et ion-ion sont renforcées.

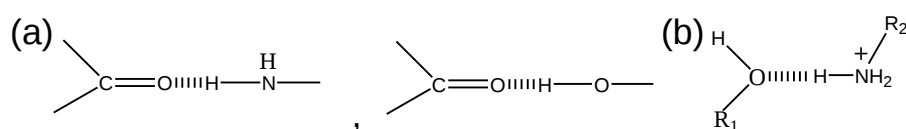


Schéma 2 : Exemples de liaisons hydrogènes de type (a) dipôle-dipôle (b) ion-dipôle

Forces de van der Waals

Les forces de van der Waals se distinguent en trois catégories : les forces de dispersion de London (interaction dipôle induit-dipôle induit), les forces de Debye (interaction dipôle permanent-dipôle induit), et les forces de Keesom (interaction dipôle permanent-dipôle permanent). De même que les forces coulombiennes, ces interactions diffèrent en fonction de la distance entre les atomes mis en jeu et deviennent répulsives lorsque les atomes sont plus proches et attractives lorsqu'ils sont plus éloignés (39). Ces forces sont inversement proportionnelles à la permittivité du milieu. En phase gazeuse, ces forces sont renforcées puisque la permittivité du gaz est plus faible (et négligeable dans le vide du spectromètre de masse) que celle de la solution.

2.3. Les interactions π (π -stacking)

Les interactions non-covalentes π -cation ou π - π (aromatique/aromatique) sont caractérisées par des interactions entre les électrons d'orbitales π (de deux groupes aromatiques), provoquant ainsi l'empilement de motifs aromatiques (40). Le type d'interaction π - π possède une énergie proche de celle des liaisons hydrogène (41). Ce type d'interaction, plus répandu dans la stabilisation des systèmes non covalents d'ADN, est surtout connu sous le terme d'interaction de type π -stacking (42). La possibilité de former de telles interactions reste substantielle puisqu'elle dépend du nombre et de l'orientation des motifs aromatiques. Ces interactions interviennent surtout dans l'organisation des doubles hélices d'ADN (43).

2.4. Les interactions hydrophobes

Les interactions hydrophobes sont initiées par l'attraction de deux groupements apolaires qui préfèrent s'associer entre eux plutôt qu'avec des régions hydrophiles (ou polaires). Dans les milieux biologiques, aqueux par nature, ces interactions sont donc présentes. Les résidus hydrophobes sont souvent tournés vers l'intérieur de la protéine, alors que les résidus hydrophiles sont aussi bien orientés vers l'intérieur que l'extérieur. La possibilité de former de telles interactions dépend de la position des acides aminés, dirigée elle-même par d'autres interactions covalentes comme les ponts disulfure. Les interactions hydrophobes étant fortement impliquées dans la conformation des protéines, de nombreux efforts ont été réalisés pour développer des échelles d'hydrophobie afin de prédire la

probabilité de retrouver tel ou tel acide aminé à l'intérieur ou à la surface d'une protéine donnée.

2.5. Comparaison des forces d'interactions présentes en solution et maintenues (ou créées) en phase gazeuse

Le tableau ci-dessous résume les différents types d'interactions non-covalentes ainsi que l'énergie mise en jeu dans un milieu aqueux.

Table 2 : Interactions non-covalentes dans un milieu biologique et en solution dont la valeur dépend de la permittivité du milieu (ϵ) et de la distance atomique (r)(8)

	Type	Energie (kJ/mol)	Paramètres régissant l'interaction
Interactions électrostatique	Forces de coulomb		Ces forces dépendent de r
	Ion-Ion	40-500	$1/r$
	Ion-Dipôle	15-150	$1/r^2$
	Ion-Dipôle induit	15-50	$1/r^4$
	Liaisons hydrogènes		
	Dipôle-Dipôle	15-200	$1/r^3$
	Interactions π-π	4-10	Les interactions π -cation sont plus fortes que les interactions π - π (44)
	Forces de van der Waals		
	Dipôle induit-dipôle induit (Forces de London)	2-50	
	Dipôle-dipôle induit (Forces de Debye)	1-10	Ces forces sont proportionnelles à $1/r^6$
	Dipôle-dipôle (Forces de Keesom)	2-160	
	Interactions hydrophobes	20-30	Cette force dépend du degré de désorganisation de l'eau lors de la coalescence des groupements hydrophobes

3. L'analyse des ions sous ultra haute résolution : le FT-ICR

3.1. Introduction

Le spectromètre de masse à transformée de Fourier (FT-ICR/MS) est un instrument très performant offrant un très haut pouvoir résolutif (45-47) et conduisant à une haute précision de masse, ce qui permet d'obtenir les compositions des ions et distinguer leur forme isobare. D'un point de vue analytique, cet instrument est un outil puissant pour des études structurales et quantitatives d'un grand nombre de molécules de la chimie et des produits naturels mais aussi des sciences de la vie.

Le principe de la résonance *cyclotronique* des éléments ionisés a été développé par Lawrence *et al.* en 1930 (48). Lawrence a construit le premier accélérateur cyclotronique pour découvrir des éléments radioactifs (*e.g.*, le lawrencium). Dans cet instrument, la fréquence angulaire du mouvement de rotation des particules chargées dans un champ magnétique crée par un aimant permanent est indépendante du rayon et inversement proportionnelle au rapport masse sur charge (m/z) multiplié par la valeur du champ magnétique. Quelques années plus tard, Penning a conçu le premier système de piège pour les particules chargées en employant une combinaison d'un champ électrique statique et d'un champ magnétique pour confiner des électrons (49). En 1949, le principe de la résonance cyclotronique du proton a été mise en évidence par Hipple *et al.* (50). Avec ce premier instrument ICR/MS nommé *Omegatron*, les ions sont accélérés et dans la zone d'analyse ils prennent une trajectoire hélicoïdale et sont détectés dans une autre partie où un collecteur de faraday est utilisé. Cet instrumentation a été dédié à la recherche dans le domaine de la chimie physique (réactions ion-molécule et processus de dissociation). Il a été l'un des premiers instruments équipé pour la MS/MS à l'aide de la technique de double résonance effectuée par un émetteur d'ions en faisant varier la fréquence. Plus tard, Wobschall a collaboré avec la société Varian pour l'amélioration de l'ICR/MS (51). Les développements, apportés au nouvel instrument *Syrotron*, consistent en une cellule "*drift*" qui a été divisée en source d'ions, analyseur et régions de collection et une détection par oscillateur marginal. La version commercialisée de cet instrument a été beaucoup utilisée pour l'étude des réactions ion-molécule en phase gazeuse. La grande difficulté à cette époque résidait dans la mesure de tous les rapports m/z des ions présents dans la cellule ICR.

L'introduction du piège ionique ICR (52) a ouvert un nouveau chapitre de l'évolution de l'instrumentation ICR/MS. Les ions sont piégés par des électrodes de piégeage où des faibles tensions sont appliquées. Le temps de piégeage étant 100 fois plus long que pour la cellule "drift" (1-2 ms pour le piège ionique), la sensibilité, la gamme dynamique et la résolution ont été largement améliorées ainsi que les balayages en double résonance.

Sur cette base en 1970, la première cellule cubique a été utilisée, en 1974, et par analogie avec la RMN (53) la spectrométrie de masse FT-ICR (résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier) a été inventée par Comisarow et Marshall (54) grâce au progrès de l'informatique et en particulier des convertisseurs analogique/numérique (ADC) permettant la digitalisation en temps réel du signal électrique induit par les ions en mouvement dans la cellule cubique ICR. Depuis, la spectrométrie de masse FT-ICR n'a cessé de se développer et de s'améliorer. En particulier après l'invention des sources ESI, MALDI (*Matrix assisted laser desorption ionisation*)...et différents modes d'ionisation internes (dans la cellule) ont été utilisés (impact électronique EI (55), auto-ionisation, ionisation chimique CI (56), la désorption laser (57), la PDMS (58,59)...). Il a fallu attendre la fin des années 80, après que les technologies de désorption/ionisation soient apparues, pour que ces sources soient utilisées avec technique ICR.

En 1989, McLafferty *et al.* (60) ont couplé une source ESI au FT-ICR où les ions formés à pression atmosphérique sont transmis vers la cellule ICR à travers des quadripôles grâce à domaines de pompages différentiels. Ce couplage est très utile pour l'analyse des composés non-volatiles, notamment des macromolécules. A partir de cette combinaison, les modes d'ionisation et éventuellement de désorption externe (61-63) (ESI, MALDI, LD, APCI, APPI etc.) ont remplacé les sources internes (EI, CI, PI, LD etc.) (45, 64).

Il faut souligner qu'entre les années 85 et 90, les modes ionisations interne à la cellule ICR avaient été améliorés en introduisant une seconde cellule consécutive. Ainsi, l'ionisation avait lieu dans la première et l'analyse MS/MS s'effectue dans la seconde.

L'évolution de l'électronique et de l'informatique a donné accès à différentes méthodes d'excitation (65, 66) ("Chirp", "SWIFT", etc.), de la détection (65, 66) ("broad-band", "narrow-band"), et de l'introduction du traitement du signal Transformée de Fourier ("Zero-filling", (65) et de "l'Apodisation"(66)).

Des nombreuses modifications de géométrie de la cellule ICR (67) ont été mises en œuvre pour réduire au maximum l'influence des potentiels de piégeage afin que les

fréquences mesurées soient les plus proches possible des fréquences *cyclotronique* théoriques.

Les grands développements du FT-ICR ont commencé dans les années 1990 avec l'introduction de champs magnétiques plus élevés (68) de l'accumulation externe des ions (69) et d'un quadripôle pour la sélection externe des ions (70). En même temps, les techniques de dissociation comme la dissociation induite par collisions (CID, (71) SORI-CID (72,73)), par multiphoton infrarouge (IRMPD) (74,75), par la capture d'électrons (ECD) (76) et par détachement d'électrons (EDD), (77,78), ont été appliquées et développées à la caractérisation de macromolécules.

Aujourd'hui, la spectrométrie de masse FT-ICR est devenu un instrument majeur et largement utilisé dans les différents domaines de recherche grâce à ses nombreux avantages bien que son coût soit élevé :

- *ultra haut pouvoir résolutif (10^5 à 10^6 FWHM).*
- *haute précision de mesure de masse (de l'ordre du sub-ppm).*
- *grande sensibilité et haute gamme dynamique.*
- *une flexibilité suffisante permettant la combinaison avec différentes sources d'ions externes (60-63)(LD, MALDI, ESI, APCI, APPI, etc.).*
- *l'accès aux différents modes d'activation, dont certains sont des techniques propres à l'ICR tout comme le SORI-CID(72), l'IRMPD(74), l'ECD (76) et l'EDD (77).*

3.2. Principe de base du FT/ICR

3.2.1. Mouvement cyclotronique des ions dans la cellule ICR

Le principe de la cellule ICR est basé sur le piégeage des ions par un champ magnétique. Un ion de vitesse $\vec{v}$ dans un champ magnétique uniforme $\vec{B}$ subit une force de Lorentz $\vec{F}$ qui induit un mouvement circulaire de l'ion, perpendiculaire à la direction du champ magnétique (*Figure 3, Equations 2*).

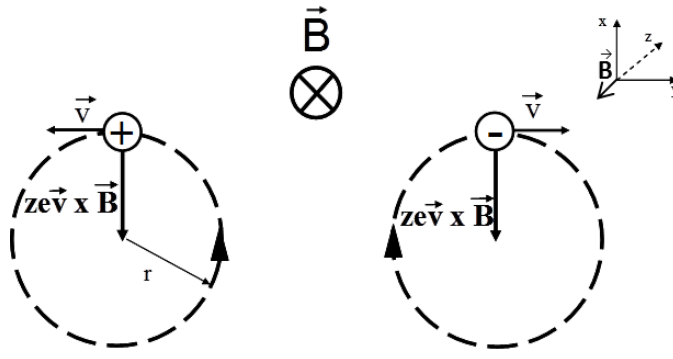


Figure 3. Mouvement cyclotronique des ions positifs et négatifs dans un champ magnétique (modifié à partir de schéma publié par Marshall (79)).

$$\vec{F} = ze \vec{v} \wedge \vec{B} \quad (2)$$

$$\left(\begin{array}{l} z : \text{nombre de charge} \\ e = 1,6.10^{-19} \text{ C} \end{array} \right)$$

Lorsqu'un ion exécute un mouvement uniforme circulaire avec un rayon r , la force de Lorentz (F_{lor}) est en équilibre avec la force centripète (F_{cen})

$$\text{avec : } F_{lor} = ze v_{xy} B, \quad F_{cen} = F_{lor} = \frac{mv_{xy}^2}{r} \rightarrow \frac{mv_{xy}^2}{r} = ze v_{xy} B$$

$$\text{où } v_{xy} = 2\pi r v_c \text{ et } \omega = \frac{v_{xy}}{r} = 2\pi v_c$$

$$\left(\begin{array}{l} v_{xy} : \text{vitesse des ions (m/s),} \\ r : \text{rayon du mouvement cyclotronique (m)} \\ \omega : \text{vitesse angulaire (rad/s);} \\ v_c : \text{fréquence cyclotronique (Hz)} \end{array} \right)$$

La fréquence cyclotronique s'exprime ainsi par :

$$v_c = \frac{\omega}{2\pi} = \frac{zeB}{2\pi m} = \frac{1.535611 \times 10^7 B}{m / z} \quad (3)$$

Ce mouvement de rotation est appelé *mouvement cyclotronique* de fréquence v_c et ne dépend que du champ magnétique et du rapport masse sur charge, indépendamment de la vitesse initiale de l'ion. A partir de cette équation (Equation 3), la mesure de la fréquence

cyclotronique permet une détermination du rapport m/z d'ions piégés dans la cellule ICR. Il faut noter que cette fréquence est inversement proportionnelle au rapport m/z : un ion de haut rapport m/z aura donc une fréquence *cyclotronique* ν_c faible.

Bien que la fréquence *cyclotronique* soit identique pour les ions de même rapport m/z , le rayon initial de la trajectoire circulaire de ces ions est variable car il est dépendant de la vitesse initiale dans le plan xy (Équation 4).

$$r = \frac{mv_{xy}}{zeB} \quad (4)$$

3.2.2. Piège de Penning

La cellule ICR est un piège dit de Penning (49) où les ions sont piégés par la combinaison d'un champ magnétique et d'un champ électrique.

Le mouvement *cyclotronique* des ions induit par le champ magnétique implique un mouvement hélicoïdal infini suivant l'axe $\vec{z}$ (anti-parallèle au champ magnétique $\vec{B}$) et sa vitesse angulaire reste constante (Figure 4). Afin de piéger les ions suivant l'axe $\vec{z}$, deux plaques de piégeage sont disposées perpendiculairement au champ magnétique, de façon à créer un puits de potentiel électrique permettant le stockage des ions. Généralement, un faible potentiel de l'ordre de 1 V est appliqué sur chacune des deux plaques de piégeage. Les ions décrivent alors un mouvement d'oscillation entre ces deux plaques dit *mouvement de piégeage* (Figure 5).

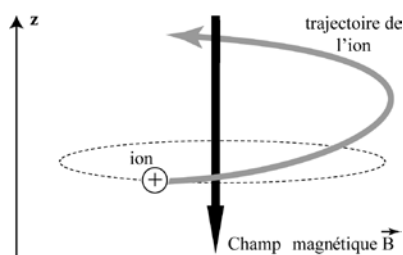


Figure 4 : Mouvement cyclotronique d'un ion dans un champ magnétique

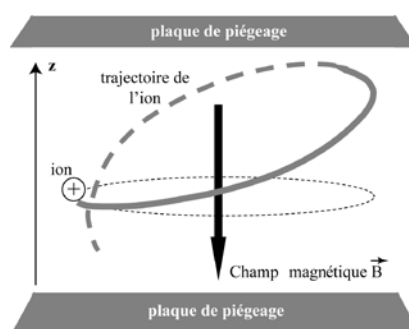


Figure 5 : Mouvement macroscopique d'un ion dans un champ magnétique, piégé entre deux plaques.

(Figures adaptés par A. Delvolvé à partir de documentation Bruker (80)).

Si le champ électrique appliqué était homogène et parallèle au champ magnétique avec des plaques de longueur infinie, ce qui est le cas idéal, le mouvement d'un ion serait hélicoïdal avec des oscillations périodiques suivant l'axe $\bar{z}$ dans le puits de potentiel électrique. La fréquence de piégeage ν_T peut donc être définie par l'équation 5:

$$\nu_T = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{2zeV_{trap}\alpha}{ma^2}} \quad (5)$$

$$\left(\begin{array}{l} a : \text{distance entre les plaques de piégeage (en m);} \\ V_{trap} : \text{potentiel de piégeage (en V);} \\ \alpha : \text{facteur géométrique.} \end{array} \right)$$

En réalité, le champ électrique ne pouvant pas être parallèle au champ magnétique, un troisième mouvement est induit par la composante radiale du champ électrique. Ce mouvement, nommé *mouvement magnétron* à faible fréquence, donne une tendance à entraîner les ions sur d'autres trajectoires (*Figure 6*) et se traduit par un abaissement de la fréquence cyclotronique. Les définitions de la *fréquence cyclotronique réduite* ν_+ et la *fréquence magnétron* ν_- sont données dans l'Équation 6 et l'Équation 7 (45) respectivement.

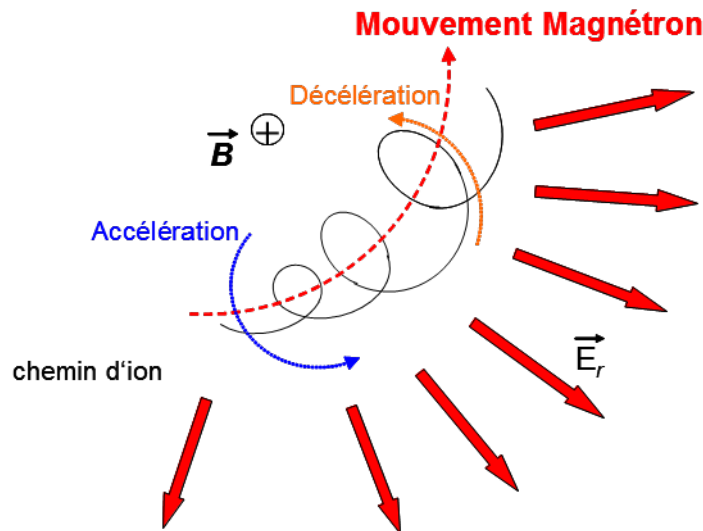


Figure 6. Mouvement magnétron dans la cellule ICR (documentation Bruker).

$$\nu_+ = \frac{\nu_c}{2} + \sqrt{\left(\frac{\nu_c}{2}\right)^2 - \frac{\nu_T^2}{2}} \quad (6)$$

$$\nu_- = \frac{\nu_c}{2} - \sqrt{\left(\frac{\nu_c}{2}\right)^2 - \frac{\nu_T^2}{2}} \quad (7)$$

Malgré cet affaiblissement de la fréquence *cyclotronique*, nous appliquons expérimentalement une approximation : $\nu_+ \approx \nu_c$. En effet, pour un ion de faible rapport m/z , la fréquence *cyclotronique* réduite ν_+ est très proche de la fréquence *cyclotronique* ν_c . Cependant, pour un ion de valeur m/z élevée, la fréquence *cyclotronique* est plus basse, l'influence de la fréquence de piégeage étant importante, ainsi la différence entre ν_+ et ν_c peut être non négligeable. Afin de réduire cette différence entre la fréquence réelle et théorique, il est préférable d'appliquer un potentiel de piégeage faible (de l'ordre de 1 V).

La combinaison des trois mouvements d'un ion dans la cellule ICR (mouvement cyclotronique, mouvement de piégeage et mouvement magnétron (41)) est présentée dans la *Figure 7*. Parmi ces trois mouvements, le mouvement magnétron ainsi que le mouvement de piégeage possèdent des fréquences beaucoup moins importantes par rapport à celle du mouvement cyclotronique. En général, la fréquence de piégeage et la fréquence magnétron sont négligeables sauf si l'ion n'est pas dans l'axe du piège et/ou l'amplitude du mouvement de l'ion est proche de la distance entre les parois de piège (45).

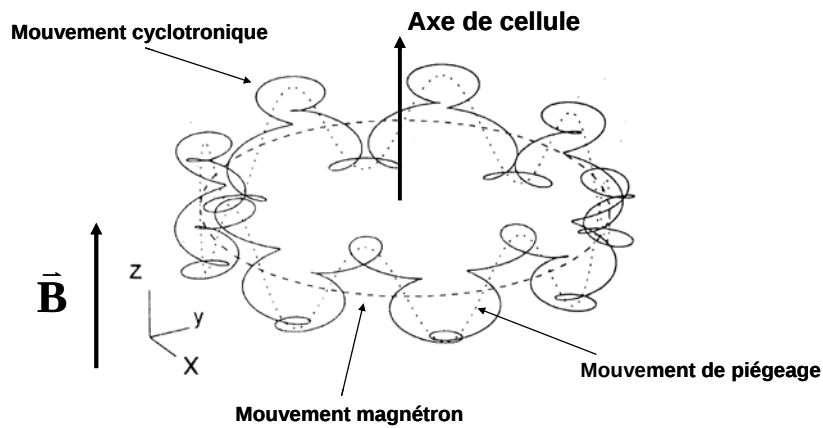


Figure 7. Trajectoire d'ion dans la cellule ICR (45).

Différents types de cellules ICR ont été développés (*Figure 8*). L'objectif de ces modifications géométriques est de tenter d'avoir i) un potentiel de piégeage avec un champ électrique radial le plus faible possible, ii) un plus grand diamètre possible de piège et iii) une meilleure linéarité de l'excitation dipolaire.

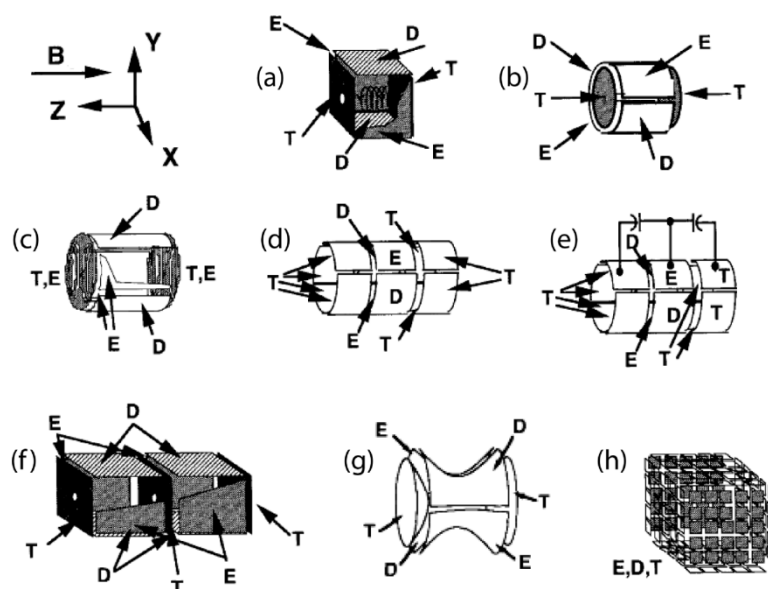


Figure 8. Différents types de cellule FT-ICR (modifiée à partir du schéma publié par Marshall), avec ses différents plaques : E = excitation, D = détection; T = piégeage. (a) cellule cubique initiale, (b) cellule cylindrique, (c) cellule cylindrique dite "Infinie", (d) et (e) cellule cylindrique ouverte sans ou avec un couplage capacitif, (f) double cellule cubique, (g) cellule hyperboloïdale et (h) cellule "matrix-shimmed".

3.2.3. Principe de fonctionnement

L'enregistrement d'un spectre de masse implique la détection des courants induits du mouvement cyclotronique sur les plaques dites de détection. Or, le signal cyclotronique est, dans un premier temps, non détectable. En effet, dans les instruments équipés de source externe, les ions de rapport m/z différents ont été introduits dans la cellule avec des énergies cinétiques variables et selon des temps différents dû à leur temps de vol. Ils sont donc déphasés et en orbite selon un faible rayon. Ainsi, il est nécessaire de faire passer la population d'ions (de même rapport m/z) d'un mouvement d'ensemble incohérent (mouvement d'ions déphasés) à un mouvement d'ensemble cohérent (en phase) avec une même orbite. Pour atteindre ce but, une procédure d'excitation préalable à la détection est utilisée (*Figure 9*).

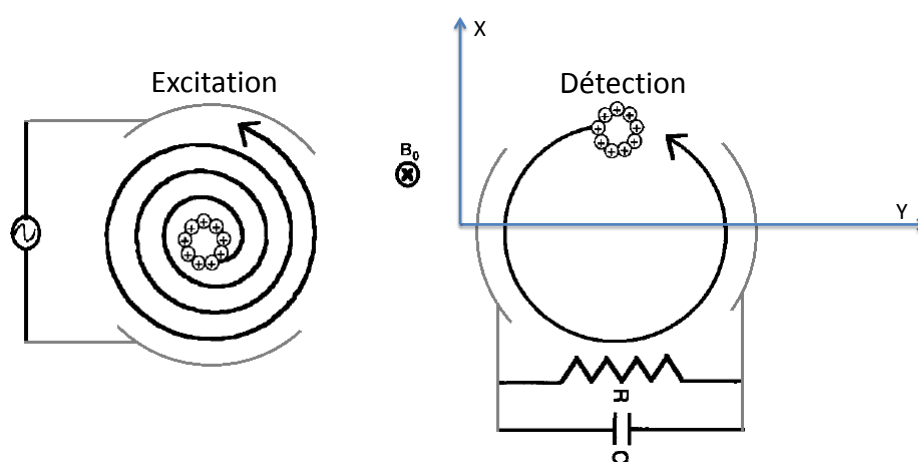


Figure 9. Processus de fonctionnement de la cellule FT-ICR cubique pour l'obtention de spectre de masse (modifiée à partir de (45)) : après excitation, les ions adoptent un mouvement cohérent ainsi qu'une orbite de rayon plus important permettant d'obtenir un signal mesurable sur les deux plaques de détection.

Excitation résonante des ions pour la cohérence du signal

Les méthodes d'excitation résonante classiques consistent en :

- i) l'excitation par **impulsion rectangulaire** (Figure 10a), où on applique une seule fréquence d'excitation correspondant à un ensemble d'ions de même rapport m/z ;
- ii) l'excitation "**broadband**" (large bande) pouvant être effectuée suivant deux approches :
 - par la méthode dite "**R.F. chirp**" (81,82) (Figure 10b) impliquant l'utilisation d'une seule impulsion d'excitation qui balaye la gamme de fréquences d'intérêt.
 - par la méthode "**SWIFT**" (83,84) (Stored-Waveform Inverse Fourier Transform) comme montré dans la Figure 10c, où le domaine de fréquences d'excitation est défini à priori et l'onde complexe d'excitation calculée en conséquence par transformée de Fourier inverse.

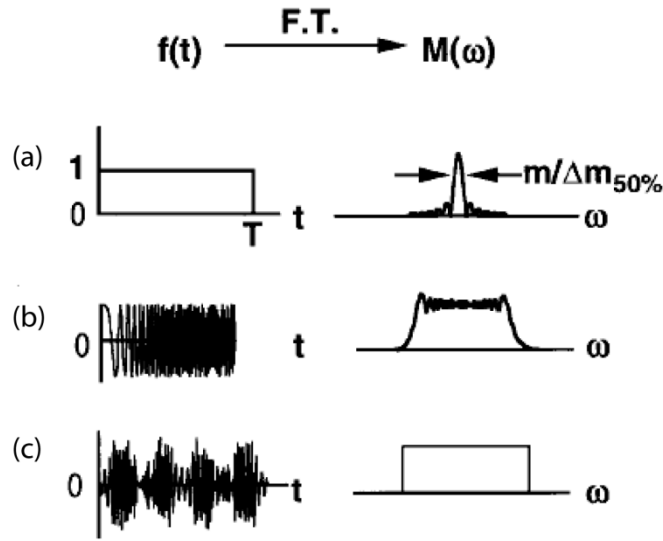


Figure 10 : Différentes méthodes d'excitation avec le domaine de temps à gauche et le domaine de fréquence à droite (modifiée à partir de schéma publié par Marshall(45)): (a) impulsion rectangulaire (mono-fréquence), et par un ensemble de fréquences appliquées pour différentes masse (b) R.F. chirp et, (c) SWIFT.

Dans le cas de l'excitation par **impulsion rectangulaire** (Figure 10a), un champ électrique sinusoïdal dipolaire est appliqué de façon homogène dans la cellule FT-ICR. Cette oscillation correspond à la fréquence *cyclotronique* d'ions d'une valeur m/z donnée pour conduire à un mouvement cohérent avec une orbite plus importante

Les ions d'autres rapports m/z , ayant des fréquences *cyclotroniques* différentes, ne sont pas en résonance avec la radio-fréquence du champ électrique appliqué, ils n'absorbent pas d'énergie et donc restent piégés au centre du piège. Pour connaître l'orbite d'un ensemble d'ions, il est possible de calculer son rayon lorsqu'il est excité à sa fréquence cyclotronique, à partir de l'Équation 8.

$$r = \frac{V_{p-p} t_{excit}}{2dB} \quad (8)$$

$$\left(\begin{array}{l} V_{p-p} : \text{tension d'excitation (en V)} ; \\ t_{excit} : \text{durée de l'irradiation ; (en s)} ; \\ d : \text{distance entre les plaques d'excitation (en m)} ; \end{array} \right)$$

Par exemple : pour $V_{p-p} = 1V$, $t_{excit} = 0,2 \text{ ms}$, $d = 2,54 \text{ cm}$ et $B = 7 \text{ Tesla}$. Le rayon d'excitation sera égal à $0,5 \text{ cm}$.

Il faut noter que selon cette équation, le *rayon cyclotronique post-excitation des ions*, est indépendant de leur valeur m/z , tous les ions de même m/z peuvent être excités à un même rayon. En théorie, plus le rayon de l'orbite est grand, plus grande sera l'intensité du signal obtenu. Néanmoins, cette orbite ne peut pas être trop grande, car l'inhomogénéité du champ électrique peut conduire à l'éjection des ions. En pratique, le rayon de l'orbite r doit être inférieur à 0,4 fois la distance entre les deux plaques d'excitation. Notons que ce type d'impulsion limité à un rapport m/z ne présente pas d'intérêt pour l'enregistrement d'un spectre de masse.

Au contraire, l'excitation "*large band*" est souvent procédée par "*R.F. chirp*" (dérive de fréquence) (*Figure 10b*) (82). Cette méthode implique l'utilisation d'une seule impulsion d'excitation qui balaye la gamme des fréquences d'intérêt. Les limites de ce mode d'excitation sont mises en lumière par le manque d'uniformité de l'amplitude d'excitation qui se traduit par une distorsion des abondances relatives de l'ensemble des ions excités, ainsi que de la gamme de rapport m/z limitée à celle de la fréquence appliquée. La méthode "*SWIFT*" (83,84) (*Figure 10c*) a été ensuite introduite, grâce à la bonne cohérence entre l'excitation et l'émission du signal dans la cellule FT-ICR, permettant une excitation plus homogène des ions. Dans ce cas, une forme d'onde d'excitation particulière au travers des battements des fréquences de résonance, est générée par la transformée de Fourier inverse d'un domaine prédéfini de fréquences dans lequel, les fréquences de résonance des ions à exciter sont incluses. Ainsi l'ensemble d'ions caractéristiques pour une gamme de rapport m/z peut être analysé en limitant les distorsions.

Détection du signal

(a) Origine du signal

Le mouvement cohérent d'un paquet d'ions de même m/z entre les deux plaques de détection crée un courant induit (*Équation 9*) (85). Le signal ICR est en fait proportionnel à ce courant induit ΔQ .

$$\Delta Q = -\frac{2ze v_y}{d} \quad (9)$$

ΔQ : courant induit par le paquet d'ions ;

ν_y : la vitesse dans l'axe y ; (*Figure 9*)*

d : distance entre les plaques d'excitation.

* : Seul l'axe y est considéré, mais en fait, il s'agit de l'intégration des axes qui définit par les plaques de détection (*Figure 9*).

Selon cette équation, le courant induit apparaît comme étant indépendant de la fréquence cyclotronique des ions et de l'intensité du champ magnétique. Cependant, il est fonction du rayon cyclotronique post-excitation d'ions (*Équation 8*), car la vitesse dans l'axe y (ν_y) est proportionnelle au rayon cyclotronique des ions (*Équation 7*). D'ailleurs, le courant induit augmente linéairement avec la charge des ions, donc le signal ICR est plus intense pour un ion multichargé.

(b) Nécessité de long signal transitoire

Pendant la durée d'acquisition du signal, certains effets peuvent influencer le signal et, en particulier, la conséquence d'un gaz résiduel provoquant des collisions ion/neutre. Il en résulte une perte d'énergie cinétique et donc, une diminution du rayon cyclotronique de façon aléatoire et une perte de la cohérence (déphasage) des ions d'un même rapport m/z qui finissent par induire des courants en opposition de phase dont la résultante du courant devient nulle (apparition de phénomène de battement). Les collisions sont responsables de l'atténuation du signal suivant une décroissance exponentielle caractéristique du signal (*Free Induction Decay* ou FID). Ceci conduit à la limitation de la durée du signal transitoire et donc à une diminution du pouvoir résolutif de l'instrument (*Figure 11*). Il est donc primordial de travailler avec un nombre faible d'ions et sous un vide très poussé dans la cellule ICR (10^{-9} - 10^{-10} mBar).

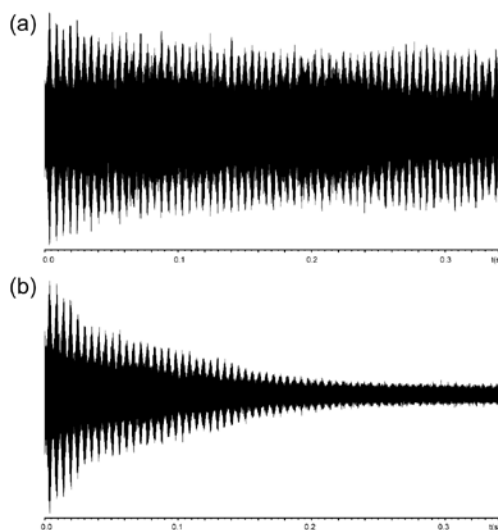


Figure 11. Signal transitoire de 0.32 s (512k) correspondant à l'enregistrement de l'ion m/z 531 de la bradykinine (a) sans et (b) avec introduction d'argon dans la cellule suivi d'un temps de pompage de 1 s.

(c) « Battement » du signal

Il est intéressant de remarquer que, lors de l'analyse d'espèces de haut rapport m/z à l'aide d'un instrument FT-ICR, le signal transitoire obtenu présente un motif de répétition périodique appelé “Isotope Beating” (86) (Figure 12). Comme son nom l'indique, ce phénomène est lié aux interférences constructives et destructives liées au fait que les isotopes naturels d'un ion ont des fréquences très proches. Cet effet est plus important pour les ions multichargés à cause du rapprochement de la fréquence des ions isotopiques naturels (Figure 13). Ainsi, il nécessite un signal transitoire suffisamment long afin d'assurer que le signal détectable soit enregistré.

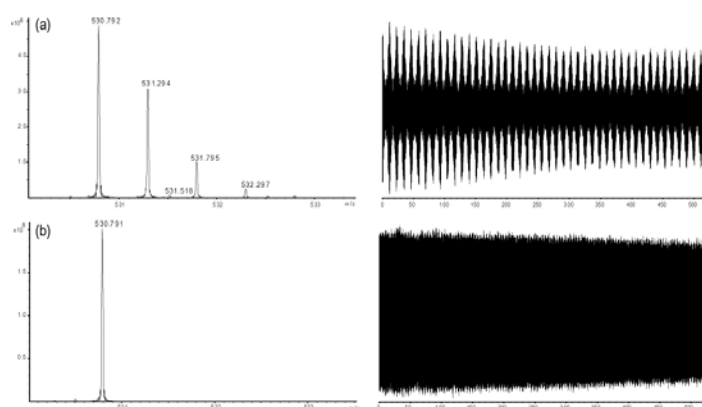


Figure 12 : Spectres de masse d'isolement de l'ion m/z 531 avec une fenêtre (a) de 5 Th, et (b) de 0.5 Th conduisant à la sélection de l'ion monoisotopique uniquement.

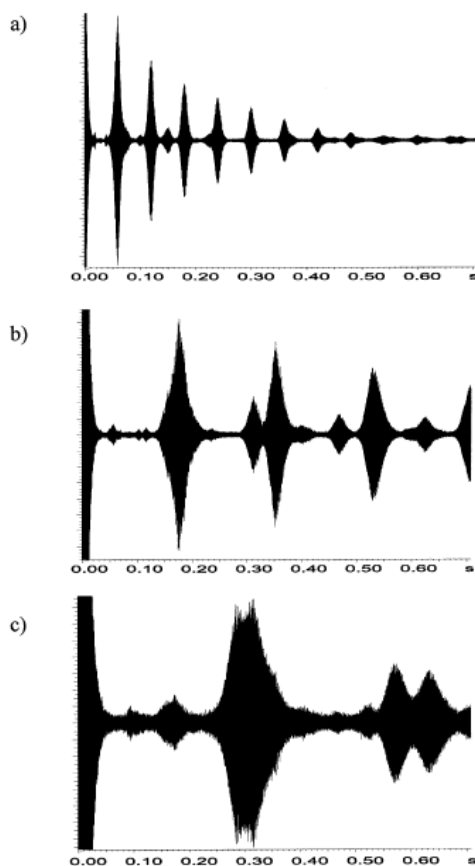


Figure 13 : Signal transitoire du domaine de temps (a) bovine insuline avec un état de charge +5 ($M_w = 5729$, m/z 1147 Da), (b) cytochrome c avec un état de charge +8 ($M_w=12360$, m/z 1544 Da) et (c) myoglobine avec un état de charge +10 ($M_w = 17554$, m/z 17544 Da), collecté avec un aimant de 7 Tesla (86).

(d) Importance du taux d'échantillonnage

Comme nous l'avons vu, pour augmenter le pouvoir résolutif, il est nécessaire d'augmenter la durée du signal transitoire enregistré. Pour un taux d'échantillonnage donné (nombre de points enregistrés), cela va dépendre de la mémoire du convertisseur analogique/numérique (ADC). Ainsi pour enregistrer en mode dit « *large bande* » le signal induit par un ion à m/z 500 avec un aimant de 7 T ($\nu_c = 215\text{kHz}$), il faut au minimum un taux d'échantillonnage de 430 kHz (critère de Nyquist (87)). Dans ce cas, si l'on utilise un taux d'échantillonnage de 500 kHz, la longueur du signal transitoire sera de 2s avec l'enregistrement de 1 million de points.

Afin d'enregistrer un signal transitoire plus long, il est donc nécessaire d'utiliser le mode de détection "hétérodyne" (46,88). Ce mode de détection, aussi nommé détection à bande étroite ("narrow-band"), permet d'utiliser un plus faible taux d'échantillonnage. Avec la détection "hétérodyne", le signal produit par le courant induit (f_1) est multiplié par une fréquence de référence (f_2) qui est proche de celle du signal d'intérêt. La combinaison de ces deux signaux sinusoïdaux donne un signal composite comprenant deux composantes correspondantes à la somme et à la différence des fréquences de deux signaux originaux, i.e. (f_1+f_2) et (f_1-f_2). La composante de fréquence élevée peut être éliminée avec un filtre passe-bas permettant de garder seule la fréquence basse. Ainsi le taux d'échantillonnage nécessaire est fortement diminué permettant l'enregistrement d'un signal transitoire beaucoup plus long. Bien que la gamme de rapport m/z devient plus étroite. Le principe de détection "hétérodyne" est présenté dans la Figure 14.

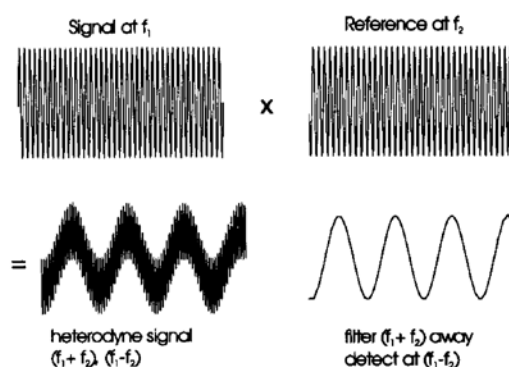


Figure 14. Illustration du principe de détection "hétérodyne" (46).

(e) Conséquence de la charge espace sur la qualité du spectre de masse

Comme dans toutes les cellules de piégeage d'ions le nombre d'ions, de même polarité peut conduire à des répulsions ion/ion. Dans les pièges à ion de Paul, ceci conduit à déplacer des rapports m/z des ions et affecte la résolution. De la même manière, quand ce nombre d'ion, présents dans la cellule devient trop élevé, il est nécessaire de prendre en compte les effets d'interactions de répulsion entre les ions. Ceci peut conduire à la modification des fréquences des ions dans la cellule. L'amplitude de cet effet dépend du rayon *cyclotronique*. Ainsi, pour avoir une précision en m/z optimale, il est nécessaire d'effectuer un étalonnage de l'instrument dans les mêmes conditions en terme de nombre d'ions présents lors de l'analyse (46). Par ailleurs, lorsque la charge d'espace est très élevée, des phénomènes dits de *coalescence* peuvent apparaître c'est-à-dire que des ions de rapports

m/z proches se confondent conduisant à un signal unique.

Le nombre d'ions a une influence sur la durée du signal transitoire. Il a été montré que lorsque le nombre d'ions est plus important, l'atténuation du signal transitoire est plus lente. Ceci a la conséquence de réduire le pouvoir résolutif sur les isotopes naturels et donc des difficultés de séparer des ions isobares. En effet, dans certains cas, en particulier, lors de l'enregistrement d'un signal transitoire relativement long, il apparaît une discrimination en faveur des isotopes de plus grande abondance (89,90). Ainsi dans la *Figure 15*, le signal transitoire correspondant aux ions de plus faibles abondances présente une atténuation plus rapide que dans le cas des ions de plus grande abondance.

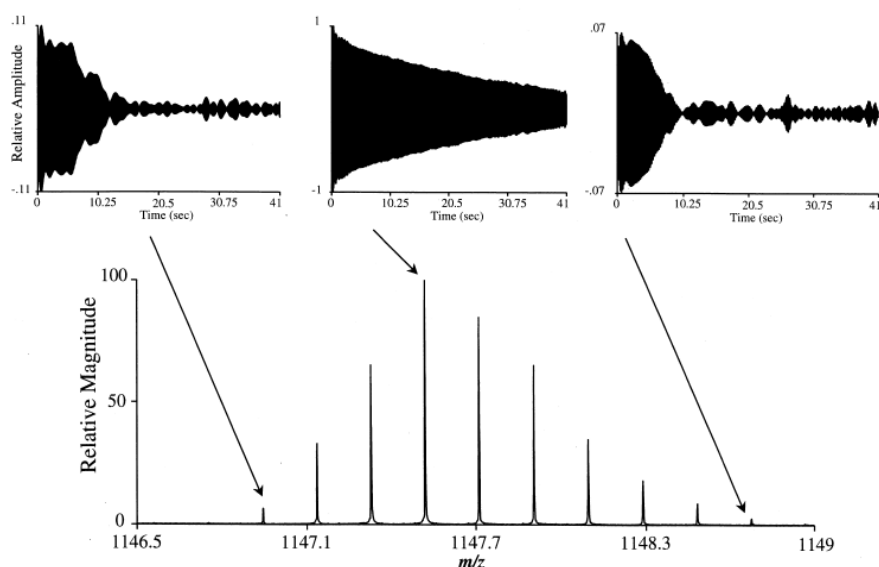


Figure 15 : Extrait des signaux du domaine temporel pour les pics isotopiques individuels de l'état de charge 51 de l'insuline bovine (Mw 58548). Les différences dans l'amortissement du signal varient avec l'abondance des espèces isotopiques (89).

Traitement de signal - Transformée de Fourier

Le signal ICR sinusoïdale produit par le mouvement *cyclotronique* périodique des ions est amplifié et digitalisé avec un taux d'échantillonnage adapté. Selon le critère de Nyquist (87), la fréquence d'échantillonnage d'un signal doit être égale ou supérieure à 2 fois la fréquence maximale (correspond au plus petit ion que l'on veut détecter) contenue dans ce signal, afin de convertir ce signal d'une forme analogique (continue) à une forme numérique (discrète). La durée de détections des ions dont dépendra le pouvoir résolutif sera ainsi liée au plus petit rapport m/z détecté ainsi qu'au nombre de points de données utilisées. Le nombre

de points maximum est défini par l'informatique et est de l'ordre de 1 à 2 millions au maximum dans les instruments actuels. Le signal transitoire dans le domaine temporel est transformé en domaine de fréquences par la transformée de Fourier. A la fin, ce domaine de fréquence est converti en un spectre de masse (*Figure 16*).

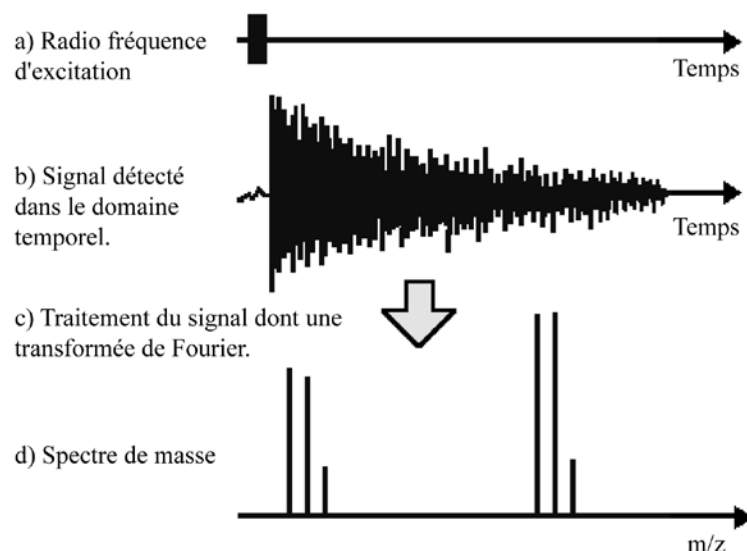


Figure 16 : Obtention et traitement du signal produit par des ions en mouvement cohérent au sein d'une cellule ICR : obtention d'un spectre de masse.

De façon à améliorer la qualité du spectre de masse obtenu après transformée de Fourier, différents traitements peuvent être utilisés au niveau du signal transitoire digitalisé : "l'Apodisation" (66,91) et "le Zero-filling"(65).

L'*apodisation* implique la multiplication du signal transitoire par une fonction qui permet de réduire au minimum les pics présents aux pieds des signaux des spectres de masses. Ces pics résultent de la troncation brusque du signal transitoire en début et fin d'acquisition des données dans le domaine de temps. Les fonctions d'*apodisation* (sinusoïdales) utilisées permettent de réduire au maximum ce problème en forçant le début et la fin du signal transitoire à tendre vers zéro de façon monotone (*Figure 17*). Toutefois, le pouvoir résolutif est affecté par ce traitement : il passe de 80000 à 60000.

Dans le cas du traitement par *zero-filling* (*Figure 18*), on double (triple, etc...) le nombre de points permettant de diminuer l'intervalle de fréquence. Ce traitement permet en particulier de réduire les erreurs sur la hauteur et la largeur du pic. Par ailleurs, avant la transformée de Fourier, il est possible d'accumuler un grand nombre de FID conduisant à un

renforcement du rapport signal sur bruit (le signal croît de façon linéaire avec le nombre d'accumulations alors que le bruit croît en racine carrée en fonction de ce nombre).

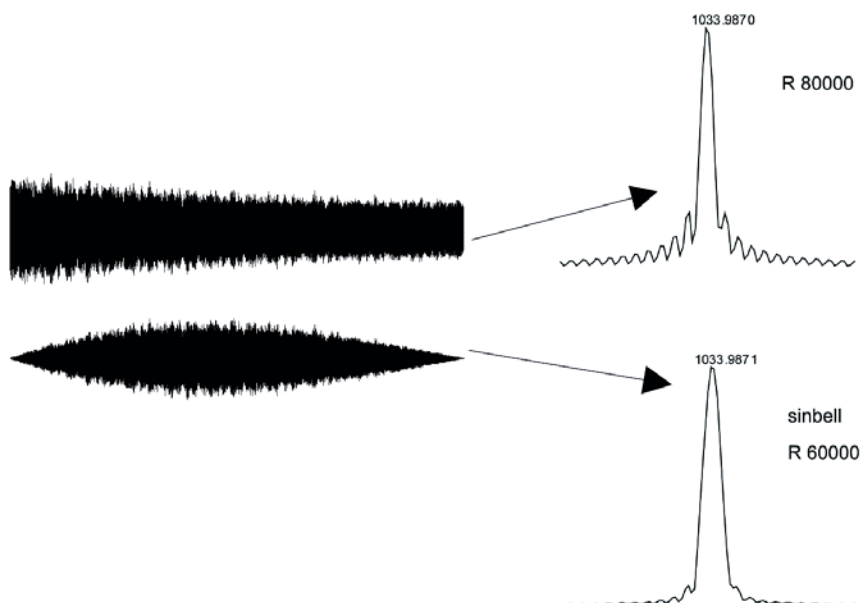


Figure 17 : Schéma du traitement par Apodisation, en haut signal avant le traitement, et en bas après le traitement.

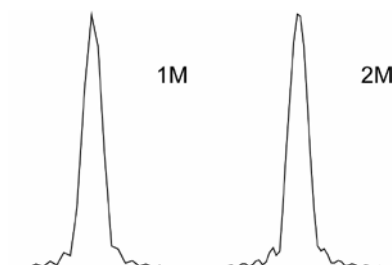


Figure 18 : Schéma du traitement par Zero-filling, à gauche signal avant traitement et à droite après doublement du nombre de points.

3.2.4. Intérêt du FT/ICR

Haut pouvoir résolutif et précision de masse

L'obtention d'un haut pouvoir résolutif nécessite que le signal se maintienne pendant une durée relativement longue (de l'ordre de plusieurs secondes). Cependant, le facteur qui limite la durée du signal transitoire est le champ magnétique et la pression au sein de la

cellule ICR. Comme décrit précédemment, le gaz résiduel peut créer des interactions ion/neutre avec les ions stockés (la collision avec le gaz entraîne une perte de cohérence). Les ions restent donc moins longtemps cohérents entre eux avec une légère augmentation de pression. Lorsque la pression est suffisamment faible (10^{-10} mBar), la largeur des pics du spectre de fréquences ne dépend pas seulement de la fréquence des ions. Comme la fréquence est inversement proportionnelle au rapport m/z , les pics se rapprochent lorsque le rapport m/z augmente. Donc, le pouvoir résolutif ($m / \Delta m_{50\%}$) diminue pour un rapport m/z plus grand (Figure 19).

$$\frac{m}{\Delta m_{50\%}} = - \frac{zeB}{m\Delta\omega_{50\%}} \quad (10)$$

$\left(\begin{array}{l} \Delta m_{50\%} : \text{largeur du pic à mi-hauteur d'un spectre de masse ;} \\ \Delta\omega_{50\%} : \text{largeur du pic à mi-hauteur d'un spectre de fréquence.} \end{array} \right)$

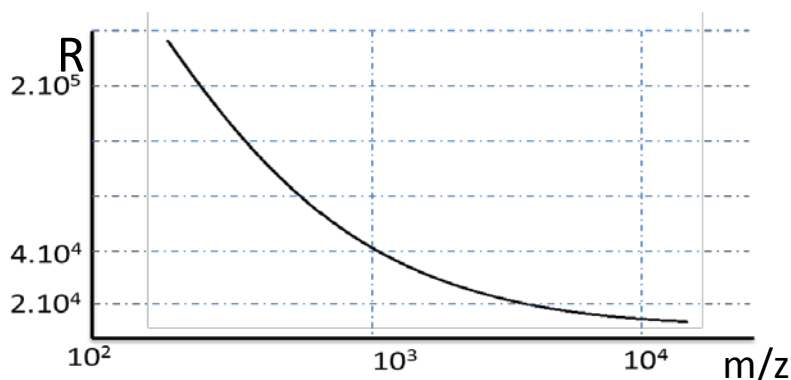


Figure 19. Evolution de la résolution en fonction de m/z .

Un haut pouvoir résolutif est un point important pour obtenir une précision de masse. Or, il n'est pas le seul critère pour garantir la précision de mesure (92). Il est nécessaire d'effectuer un étalonnage en rapport m/z . La qualité de l'étalonnage est fortement influencée par la *charge d'espace* dans la cellule ICR. Un effet de répulsion est produit lorsque la distance entre les espèces chargées est très faible, la trajectoire des ions est donc légèrement modifiée. Ainsi, les pics observés sont déplacés. Normalement l'étalonnage interne permet d'obtenir une précision de rapport m/z inférieure à 1 ppm car l'étalon interne est détecté dans les mêmes conditions d'analyse que les ions à détecter. Cette méthode permet de s'affranchir partiellement de l'effet de la *charge d'espace* même si elle reste maintenue. Néanmoins, dans

certain cas, il est difficile d'effectuer l'étalonnage interne, par exemple dans certaines expériences MS/MS (où les ions fragments ne sont pas identifiés). Il faut, alors, effectuer un étalonnage externe. La qualité des mesures dépend ainsi du nombre d'ions piégés dans la cellule et il est préférable de piéger le moins d'ions possible afin d'assurer une meilleure précision de m/z . En général, l'étalonnage externe donne une précision en m/z de l'ordre du ppm pour un spectre de masse enregistré dans les mêmes conditions (pression, nombre d'ion...) de la cellule ICR.

Il faut souligner que certains instruments hybrides tels que les piège à ions linéaire / FT-ICR permettent une mesure préalable du courant ionique (avec le piège à ions) pour introduire un nombre d'ions constant dans la cellule ICR, conduisant ainsi à améliorer la précision de mesure de m/z par étalonnage externe.

4. Comportement des acides nucléiques chargés produits par désorption.

4.1. Etude bibliographique de système DNA sous ESI et leur dissociation

Les acides nucléiques ont été étudiés par plusieurs sources d'ionisation différentes comme le FAB (*Fast-Atom-Bombardment*) par McCloskey *et al.* (93) ou le PDMS (94) (*Plasma-Desorption-Mass-Spectroscopy*) et le MALDI (95). Avec l'introduction de l'ESI-MS (96), l'analyse des acides nucléiques a été considérablement étendue dans un court laps de temps. En 1988, Covey *et al.* publient le spectre d'ions négatifs produits par ESI d'un tétramère d'ADN (97). Dès 1989, Edmonds *et al.* présentent le spectre de masse de 21-mers d'ADN et d'ARN transférase obtenus à partir de la levure de bière, les spectres de masse ayant été enregistrés avec un analyseur quadripolaire (98). Ces spectres de masse montrent une large distribution d'état de charges qui est caractéristique du mode ESI-MS. En 1990, Smith *et al.* décrivent les potentialités et les limites de l'ESI comme une nouvelle technique d'ionisation/désorption douce pour l'analyse de molécules labiles thermiquement. Ils présentent des spectres de masse d'échantillons d'ADN avec un maximum de 61-mers ainsi que des échantillons ARN (98). Dans tous ces spectres, le problème de la présence d'adduits de cations métalliques est discuté par les auteurs. Avec l'utilisation d'un spectromètre de

masse quadripolaire, la distribution des cations (métal) peut être résolue pour un état de charge donné, jusqu'à une masse moléculaire de 10.000 Da et une détermination de la masse moyenne a été possible (par exemple, pour l'ADN 21-mer avec une erreur de 0,01% sur sa masse moyenne) (99). En 1993, Goodlett et al (100) ont étudié un oligonucléotide et ont produit le quadruplexe d'ADN d(CG)₄ en mode ESI négatif. Ce complexe a été observé avec une faible différence de potentiel de skimmer en raison de sa fragilité. Par contre, l'échantillon étant dessalé, ils n'ont pu observer que l'ADN simple brin. En 1997, Hoaglund *et al.* (101) entreprennent la première étude de la conformation en phase gazeuse par mobilité ionique d'un oligomère multi-déprotoné. Cette étude a permis de mettre en évidence le lien fort qui existe entre l'état de charge de l'oligothymidine deux à six fois déprotonée et sa conformation en phase gazeuse (Figure 20). Ces résultats montrent que plus l'oligomère est chargé, plus il présentera une forme dépliée comme attendu avec les effets de répulsions coulombiennes. En effet, dans un milieu sans solvant ni contre-ion, il existe une répulsion entre les charges de même signe portées par l'oligomère, conduisant ainsi à son dépliement. La transition entre la conformation fermée (globulaire) et la conformation ouverte (dépliée) intervient lorsque les répulsions coulombiennes dépassent, en termes de forces, les liaisons hydrogène et les interactions de van der Waals. Dans cette étude, la transition est atteinte lorsque 50 % des phosphates sont déprotonés.

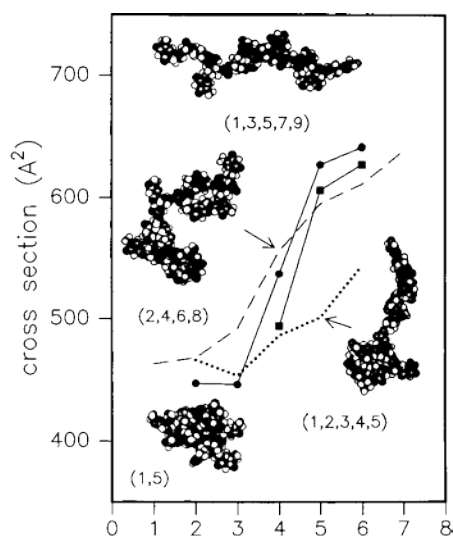


Figure 20 : Section efficace d'un polymère en fonction de son état de charge.

Récemment, Guo *et al.* (102) ont étudié deux oligomères dont les conformations en solution sont connues pour adopter une forme en « épingle à cheveux » pour l'un et linéaire pour l'autre. L'analyse en phase gazeuse par ionisation *electrospray* en mode négatif de ces oligomères, en fonction de la variation de paramètres expérimentaux (concentration en tampon, en ADN et voltage au cône), montre que les deux structures (épingle à cheveux et linéaire) supportent une distribution d'état de charge similaire. La structure en épingle à cheveux basée sur la complémentarité des nucléobases semble mieux supporter un nombre élevé de charges négatives. Les auteurs démontrent qu'une partie au moins de la population d'ADN en épingle à cheveux subsiste dans cette conformation en phase gazeuse.

Par ailleurs, ils réfutent l'hypothèse selon laquelle l'état de charge d'un oligomère d'ADN est dû au fait que ses phosphates, sous forme entièrement anionique en solution, sont moins déprotonés en phase gazeuse. D'après eux, ce serait les nucléobases qui sont protonées, conduisant ainsi à des formes zwitterioniques. Du reste, Green-Church et Limbach (103) avaient démontré que l'affinité protonique d'un azote impliqué dans un cycle aromatique, dans le cas des nucléobases, était plus élevée que celle de l'oxygène porté par un phosphate neutre au sein des nucléosides dAMP et dCTP.

Concernant la variation en tampon, l'acétate d'ammonium semble d'une part induire un repliement de l'ADN en augmentant la force ionique, et, d'autre part, favoriser la protonation de l'oligomère par transfert d'un proton de NH_4^+ vers un azote d'une nucléobase (102).

D'autres modifications de paramètres expérimentaux ont permis d'étudier leurs influences sur la conformation du système étudié et, par là même, sur sa distribution d'état de charge (102) : la température de la source, la valeur du pH (104,105), la composition du solvant de l'échantillon.

4.2. Les chemins de fragmentations de l'ADN et de l'ARN

(a) : Nomenclature utilisée pour décrire la fragmentation des ions positifs et négatifs de l'ADN et de l'ARN

Plusieurs nomenclatures ont été proposées pour décrire la fragmentation des oligonucléotides, comme celle de McCloskey (106), mais celle la plus acceptée est la nomenclature proposée par McLuckey *et al.* (107) (Schéma 3) basée sur celle utilisée pour les

peptides (108,109). Elle s'organise autour du groupement phosphodiester et décrit deux groupes d'ions fragments :

- ceux contenant la terminaison 5' de l'oligomère sont notés a_i , b_i , c_i , et d_i .
- ceux qui contiennent l'extrémité 3' sont nommés w_j , x_j , y_j , et z_j .

Les indices i et j utilisés pour la nomination de ces fragments font référence au nombre de riboses contenues dans l'ion fragment considéré et permettent ainsi d'indiquer la position de la liaison rompue.

Par ailleurs, la perte d'une nucléobase sous sa forme neutre est décrite par une lettre désignant sa nature. Ainsi, A désigne l'adénine, C la cytosine, G la guanine, T la thymine et U l'uracile.

On note que la position de la base perdue est connue. En effet, des études mécanistiques de perte de base ont montré que c'est une perte de B_i qui induit la rupture du squelette pour libérer l'ion fragment $(a_i-B_i)^{n-}$ (110,111).

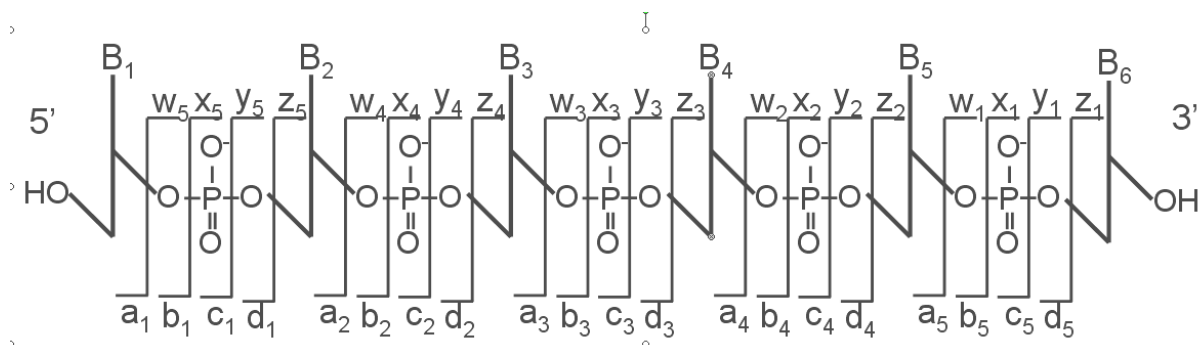


Schéma 3 : Nomenclature des fragments d'oligomères d'ADN proposée par McLuckey et al. (107)

(b) : La dissociation des ions simplement/multichargés

i) Cas des ions positifs

Le mode positif est très peu utilisé pour l'analyse des oligonucléotides en spectrométrie de masse. Les groupements phosphates sont acides et sont facilement déprotonés. Par conséquent, en mode positif c'est la base qui porte la charge (112). Roger et al. ont étudié des dinucléotides en mode positif et ont proposé des mécanismes (113) pour expliquer les ions fragments (Schéma 4) observés dans les spectres CID (112).

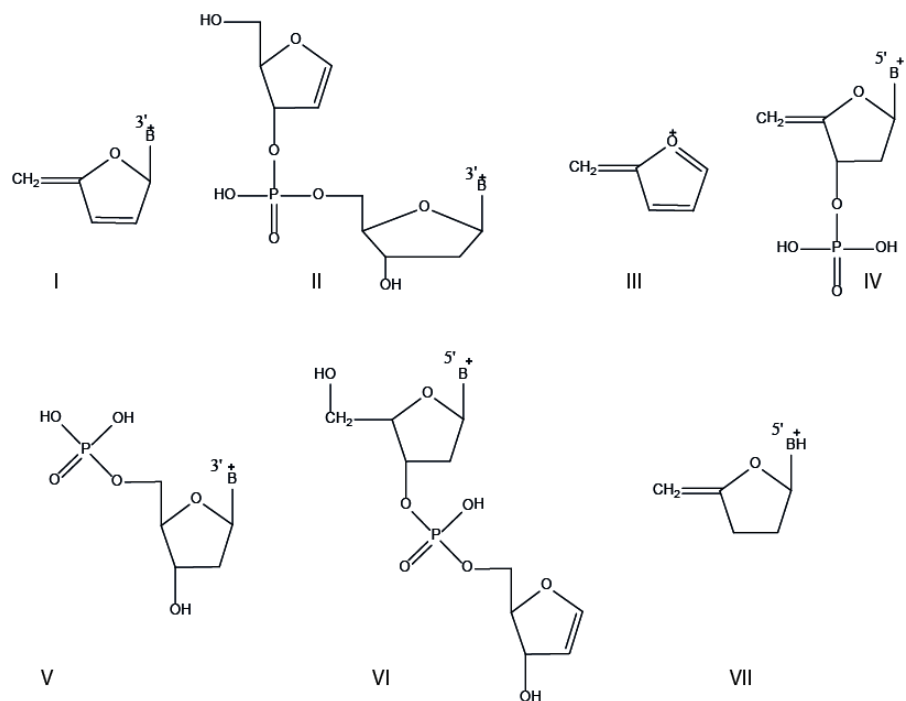


Schéma 4 : Structures des ions fragments proposées en mode positif

Dans le cas du dinucléotide d(CA), les affinités protonique de cytosine et adénine sont comparables, la cytosine peut être initialement protonée et subir une *syn* élimination (Schéma 5). La dissociation compétitive de complexe ion-dipôle donne soit la base protonée soit l'ion fragment complémentaire pour élimination de la base neutre (II) (112).

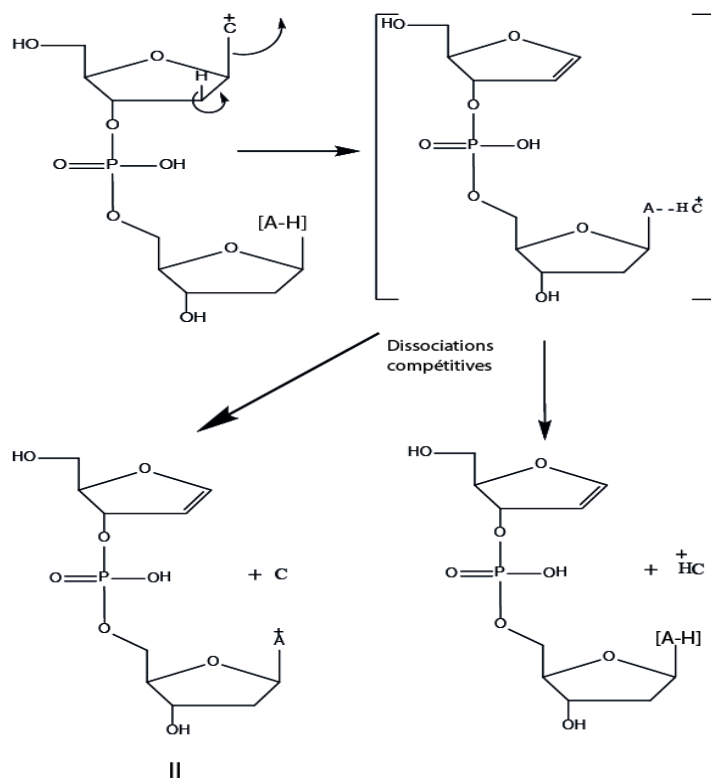


Schéma 5 : Mécanisme proposé pour l'ion fragment II et la base protonée (112).

Pour le dinucléotide d(TA), la base (AH^+) est observée comme l'ion fragment principal. Cet ion correspond à une base protonée en position 3'-terminale, (AH^+), et représente près de 90% des ions fragments observés (112). La base protonée peut être produite directement à partir de l'ion parent. Le mécanisme proposé implique un processus de *syn*-élimination, dans lequel la molécule de d(TA) (Schéma 6) est protonée au niveau de l'adénine, perd cette base mais reste en interaction avec la base dissociée, pour former un ion dipôle. Ensuite la dissociation compétitive donne, soit la base chargée (AH^+), soit l'ion fragment (VI) (114).

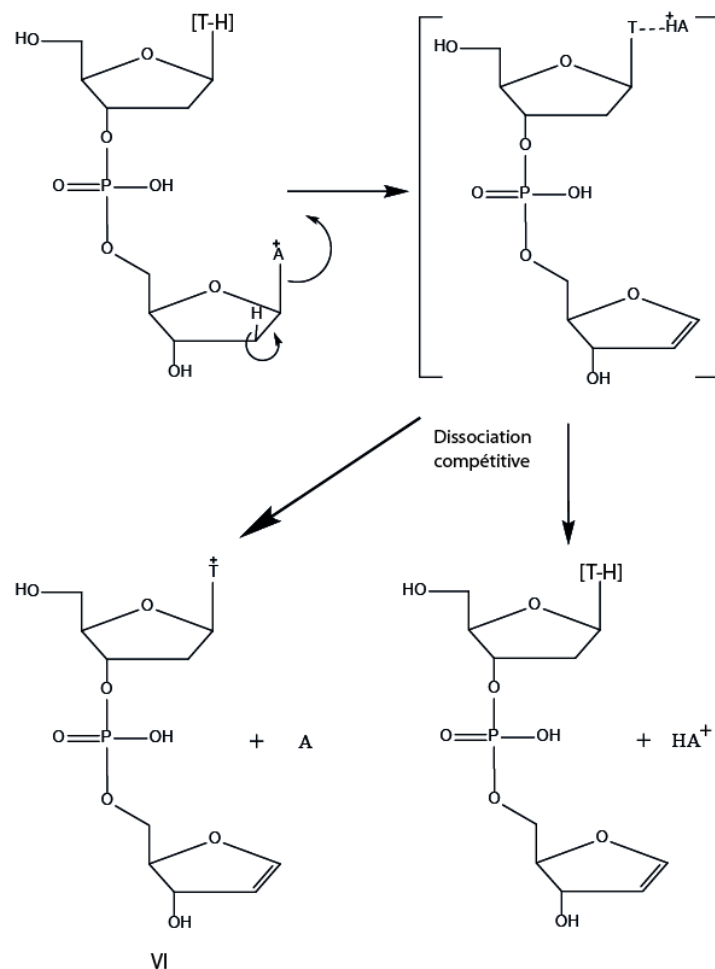


Schéma 6 : Mécanisme proposé pour les ions fragments IV et V (112).

La rupture de la séquence d'oligonucléotide est expliquée par un mécanisme (Schéma 7) dans lequel un transfert de proton en position C'4 au groupement phosphate se produit en même temps que la rupture de la liaison C'4-O (112).

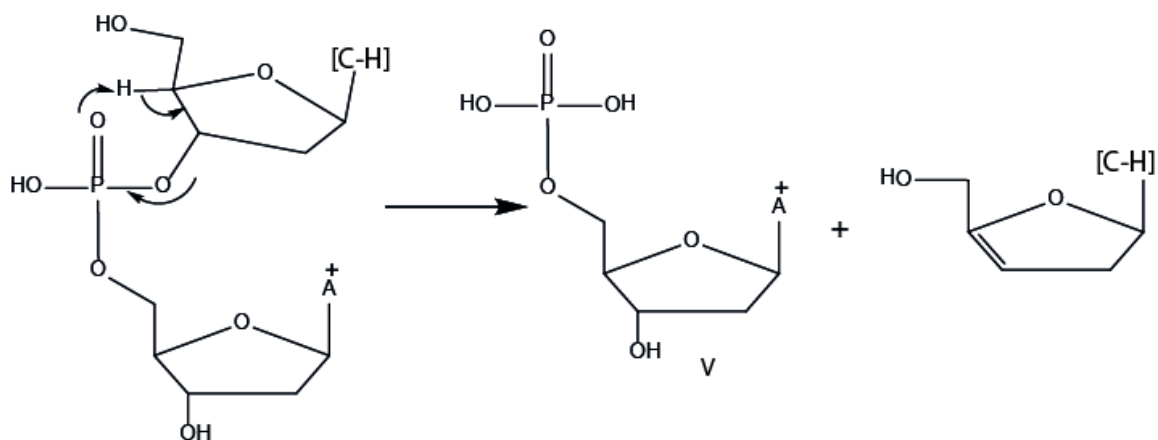


Schéma 7 : Mécanisme proposé pour l'ion fragment V (112).

Les trois mécanismes proposés par Rodgers *et al.* sont des *syn* éliminations qui sont défavorables thermodynamiquement. En effet, une élimination E2 exige que le proton et le groupe partant soient anti-planaires. Or, dans ces mécanismes, les protons et les groupes partants sont coplanaires, dans ce cas on parle d'élimination E2-like. McCloskey *et al.* ont étudié des oligomères de plus grandes tailles (4mer) en mode positif qu'ils ont comparé avec les résultats obtenus en mode négatif (115). Ils ont observé des fragmentations similaires au mode négatif : les ions fragments principaux proviennent également de la série w_j^{m+} et $[a_i-B]^{n+}$. Les ruptures donnant les ions fragments des séries w_j^{m+} et $[a_i-B]^{n+}$ ne sont pas observées quand la base en position *i* est une thymine. McCloskey *et al.* ont donc proposé un chemin de fragmentation dans lequel la rupture de la séquence est initiée par la perte d'une nucléobase chargée positivement (Schéma 8).

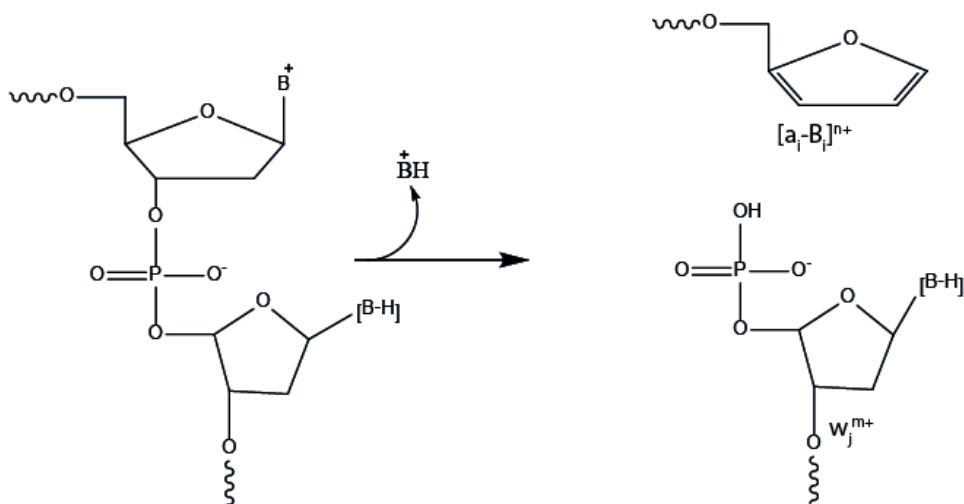


Schéma 8 : Mécanisme proposé pour la fragmentation d'un oligonucléotide en ions complémentaires a_i^+ et w_j^{m+} (115).

Matin *et al.* (116) ont étudié des homopolymères d'ADN dA₈, dC₈, dG₈ et dT₈ en mode d'ionisation positive. Les spectres CID de dA₈, dC₈ et dG₈ obtenus en mode positif sont similaires aux spectres CID obtenus en mode négatif : les ions fragments principaux sont de la série w_j^+ et $[a_i-B]^+$. Par contre, pour la molécule de dT₈, le spectre CID enregistré en mode positif est totalement différent de celui qu'on obtient en mode négatif. En effet les séries d'ions w_j^+ et $[a_i-B]^+$ ne sont pas observées : Matin *et al.* ont observé des séries d'ions $[z_i-2H]^+$ et $[x_i-2H]^+$ et ont proposé un nouveau mécanisme pour expliquer la formation de ces ions fragments (Schéma 9).

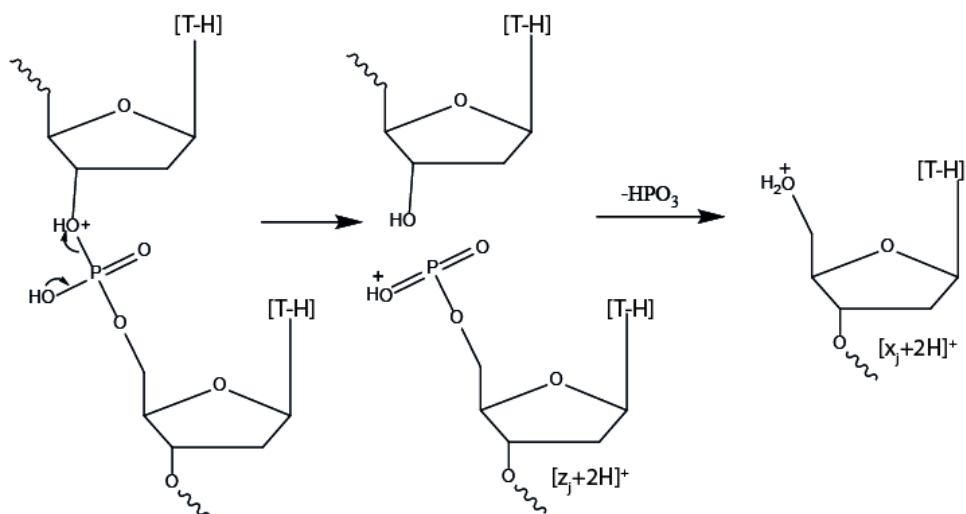


Schéma 9 : Mécanisme proposé par Matin et al. pour les ions fragments $[z-2H]^+$ et $[x-2H]^+$ (116)

ii) Cas des ions négatifs

En mode négatif, l'une des voies principale de décomposition d'un oligomère d'ADN est la perte de nucléobase neutre ou chargée qui est la moins coûteuse en énergie. La forme neutre B est perdue si l'état de charge de l'ion parent est faible, tandis qu'on détecte une forme chargée B^- si l'ion parent est hautement chargé (110,117). Plusieurs mécanismes (118), basés sur le comportement sous dissociation de petits oligonucléotides modèles, tentent d'expliquer ces pertes de nucléobases (neutre B ou chargée $[B-H]^-$).

Rodgers et al (119), à partir d'études entreprises sur un dinucléotide, expliquent la perte de base (BH et B^-) par une élimination de type E2. La capture d'un proton en position C_2' par l'oxygène chargé du groupement phosphodiester induit cette fragmentation, engendrant la formation d'un complexe ion-dipôle ($[M-B]^{n-}$, $[B-H]^-$). La dissociation de cet ion-dipôle permet la perte sous forme $[B-H]^-$. L'implication d'une forme ion-dipôle a aussi été utilisée par Habibi-Goudarzi et al (120,121) pour expliquer ces fragmentations (Schéma 10).

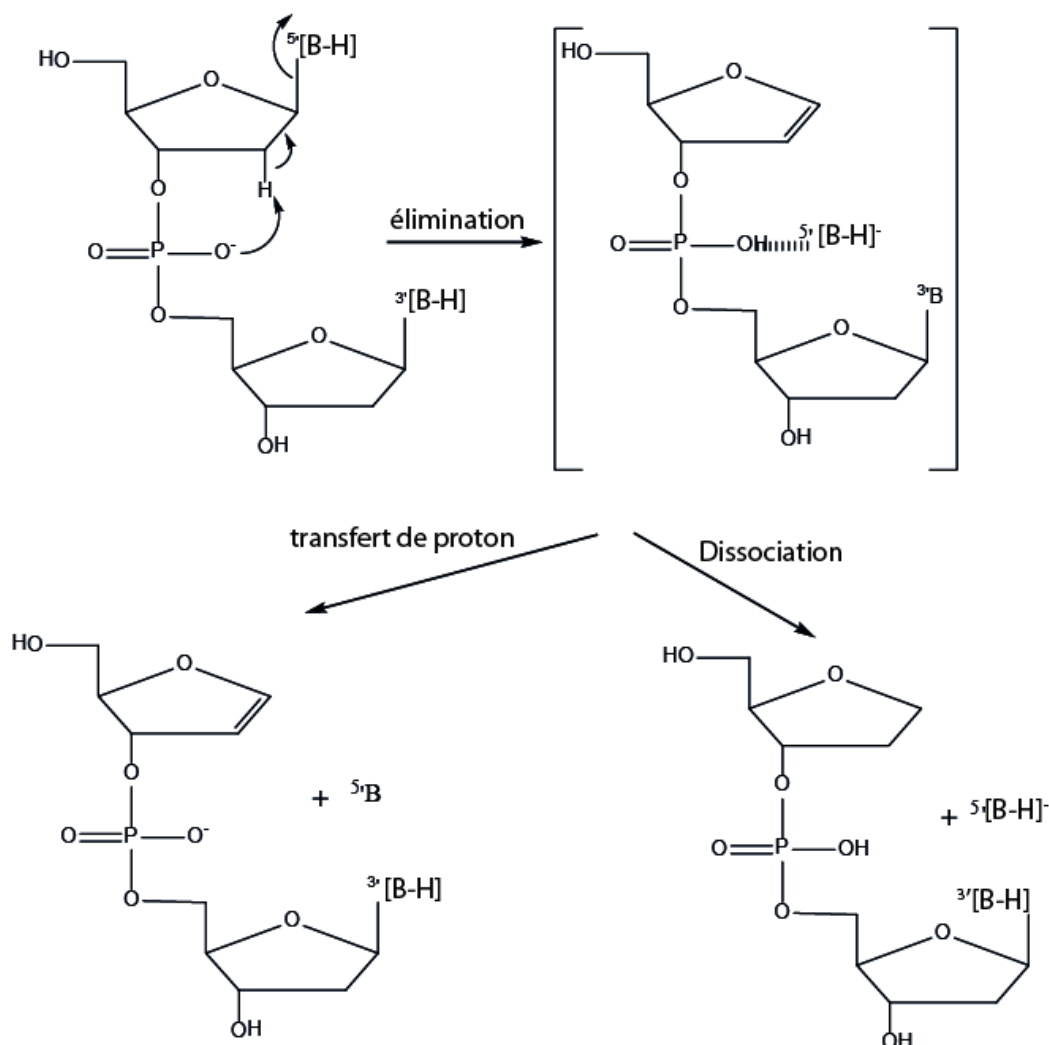


Schéma 10 : Mécanisme proposé par Rodgers et al. pour la perte de base neutre et chargée (119).

Wang *et al.*(113) ont proposé un autre mécanisme de perte de base neutre (B) impliquant le transfert du proton du 5'-phosphate vers la nucléobase neutre. Cette dernière est perdue via un intermédiaire zwitterionique (Schéma 11). L'existence de ce mécanisme a été mise en évidence par des études d'échanges H/D (11)

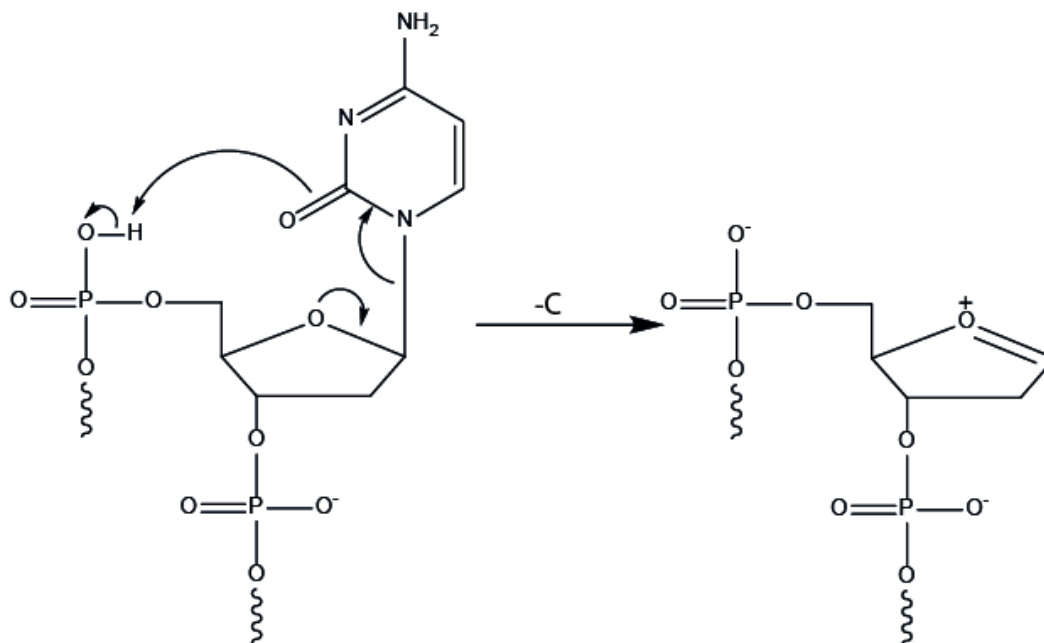


Schéma 11 : Mécanisme proposé par Wang *et al.* pour la perte d'une base neutre (113).

La perte d'une nucléobase semble prédéterminée. En fait, les positions 5' et 3' montrent un comportement totalement opposé. Expérimentalement, la perte d'une base en position 3' est défavorisée. Rodgers *et al.* (119) justifient ce phénomène par la stabilisation de la base grâce à des interactions de type liaison hydrogène entre un proton et le phosphodiester voisin déprotoné.

De nombreuses études sur la nature et les propriétés thermochimiques des nucléobases ont été effectuées pour tenter d'expliquer les pertes de bases observées en spectrométrie de masse en tandem. Cependant, expérimentalement, les auteurs observent divers ordres de perte des bases (différences d'abondance relative). Une constante perdure : la perte de la thymine (ou uracile) sous forme neutre est toujours défavorisée (75,107,121,122). L'explication la plus acceptée serait la faible affinité protonique de la thymine (ou uracile). En effet, plus l'affinité protonique d'une base est élevée, plus cette base se protone facilement et plus sa perte est favorisée. Trois échelles de basicité ont été envisagées : celle des nucléobases (114, 123-125), celle des déoxynucléosides (123-125) et celle des déoxynucléotides (103). Les trois échelles concordent avec le comportement de la thymine. En fait, il semble que ce soit l'ordre de basicité des déoxynucléotides qui détermine la nature et l'ordre dans lesquelles sont perdus les nucléobases d'un oligonucléotide.

Ordre de basicité des nucléobases

Gua > Cyt > Ade >> Thy (114)

Ordre de basicité des déoxynucléosides

dG > dA > dC > dT (123,125)

Ordre de basicité des déoxynucléotides

dAp > dGp > dCp > dTp (103)

Les ruptures de séquence.

Dans des conditions de CID, la rupture de la liaison C3'-O du sucre vicinal à une base donnée est initiée par la perte de cette base (119,126) qui engendre les ions fragments complémentaires $[a_i-B]^{n-}$ et w_j^{m-} (Schéma 12). Divers mécanismes décrivent cette fragmentation consécutive.

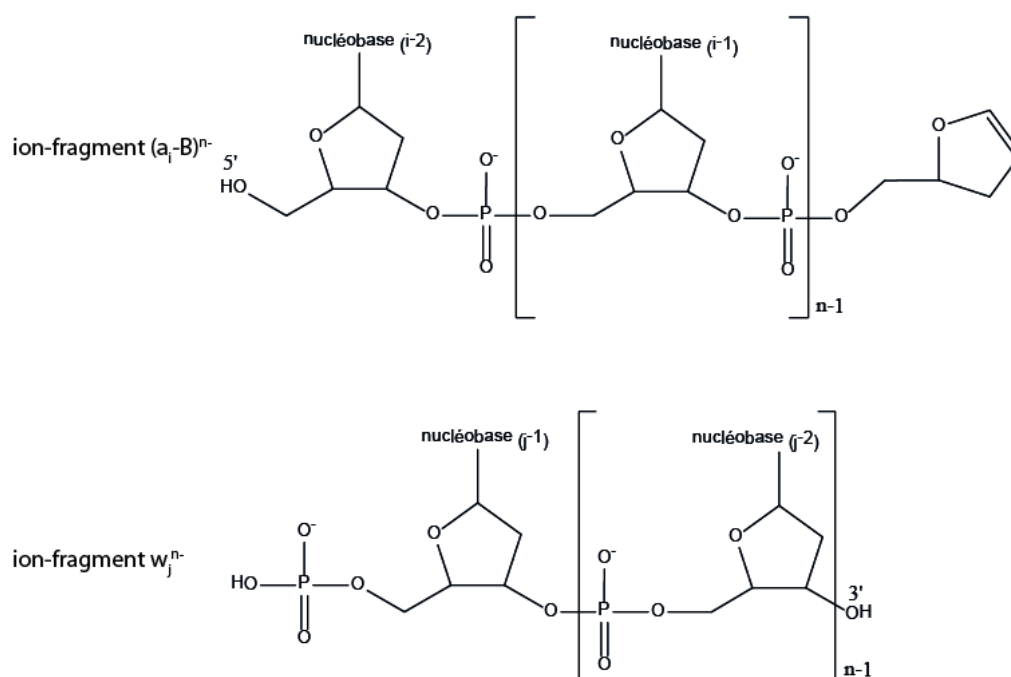


Schéma 12 : Structures des ions fragments complémentaires $(a_i-B)^{n-}$ et w_j^{m-} .

McLuckey *et al.* (122) envisagent la rupture de la séquence d'ADN via la catalyse acide d'un oxygène chargé du phosphate voisin côté 3' (Schéma 13), initiant ainsi une réaction d'élimination E2-like intramoléculaire (Schéma 13).

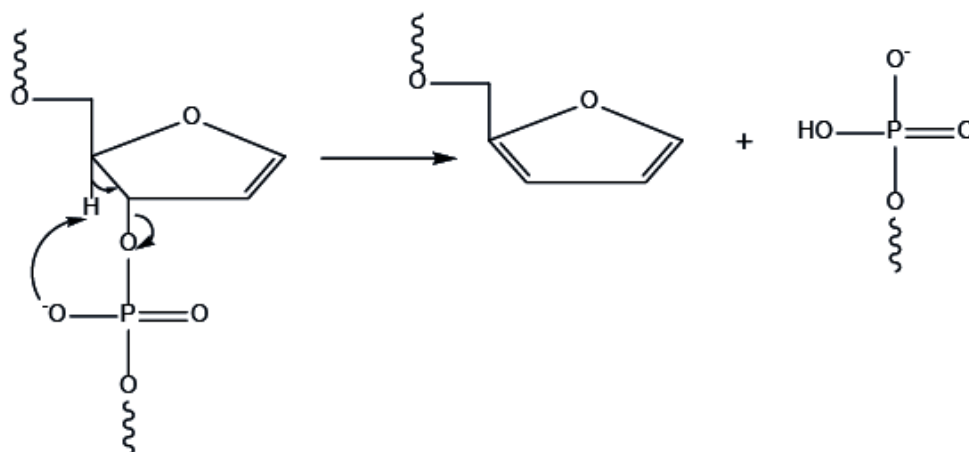


Schéma 13 : Mécanisme proposé par McLuckey et al. (122) pour la fragmentation d'un oligonucléotide en ions complémentaires (a_i-B) $^{n-}$ et w_j^{m-} .

Plus tard, Bartlett *et al.* (127) ont proposé des mécanismes qui n'envisagent pas la perte initiale de la base. Ils ont travaillé sur un oligonucléotide dont certaines liaisons phosphodiester sont remplacées par des liaisons méthylphosphonate neutres. Le premier mécanisme qu'ils ont proposé est une variante de celui publié en 1993 (122) : il fait intervenir l'oxygène chargé d'un phosphodiester situé loin de la liaison rompue, sur le squelette de l'oligomère d'ADN. Le repliement de cet oligomère permet une fragmentation de la liaison assistée par la charge du phosphodiester éloigné. Le second mécanisme ne fait intervenir aucune charge. Il est initié par l'attaque nucléophile de l'oxygène porté par le méthylphosphonate situé en 3', sur le proton du carbone 4' du sucre (Schéma 14).

En effet, il est tout à fait envisageable que plusieurs mécanismes se produisent lors de l'excitation multi-collisionnelle d'un oligonucléotide réparti sur les diverses population d'ions.

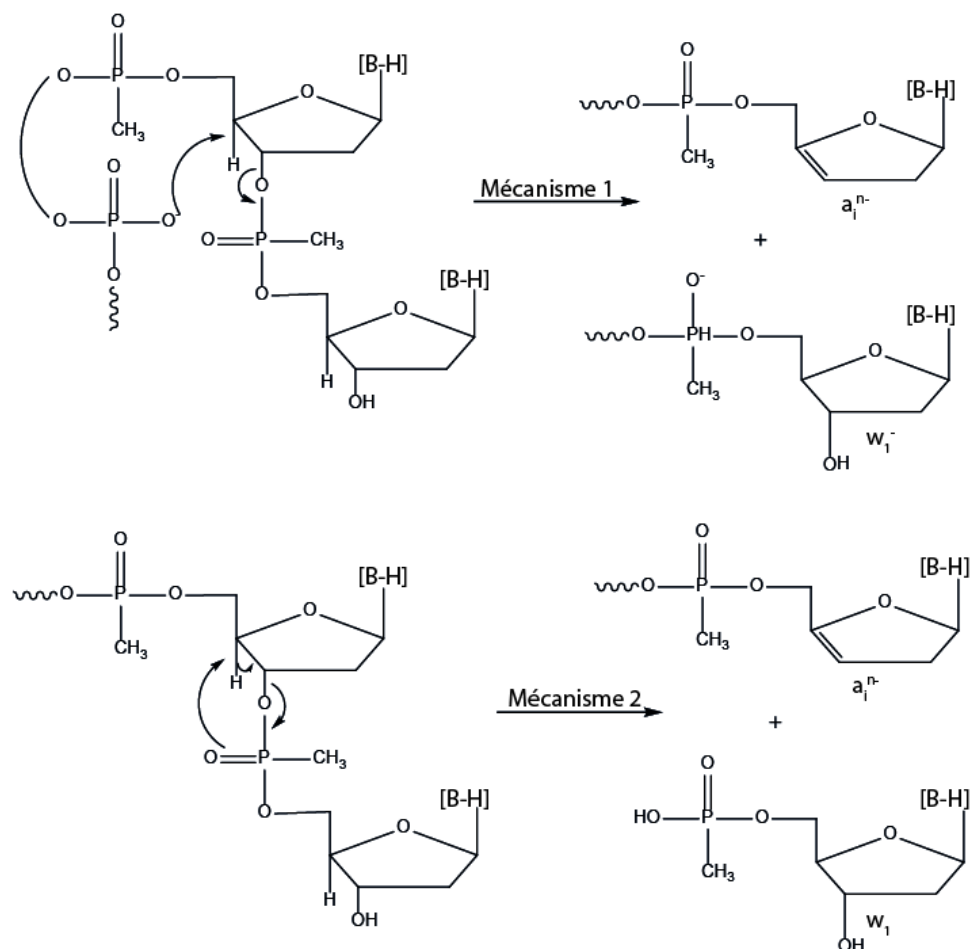


Schéma 14 : Mécanismes proposés par Barlette et al. (127) pour la fragmentation d'un oligonucléotide en ions complémentaires a_i^{n-} et w_j^{m-} .

c) Dissociation des ions à nombre impairs électrons

La dissociation des ions à nombre impairs électrons a été étudiée depuis longtemps, notamment dans le cas où la source est à impact électronique (3). En ce qui concerne la source *electrospray*, il y a encore peu d'exemples car ces méthodes sont assez récentes. La technique la plus connue est l'ECD (78), qui s'applique pour les ions multiprotonés. Récemment, l'EDD (128) a été inventé pour les ions multidéprotonés ainsi que l'ETD (129) qui peut s'appliquer aux ions multichargés positifs et négatifs. Ces techniques seront détaillées dans la partie suivante.

5. Comment activer les ions : cas de l'ADN

Il existe 2 principaux modes d'activation des ions, le premier où l'énergie se disperse rapidement sur l'ensemble des liaisons, ce qui provoque la rupture des liaisons les plus fragiles. On considère ce mode d'activation comme étant ergodique. Dans ce cas, c'est la charge d'une manière ou autre, qui oriente la fragmentation à courte ou à longue distance (ponts salins). La seconde famille d'activation implique la formation d'ions radicalaux par réduction d'état de charge qui se traduit par les fragmentations induites par le radical. Dans ce cas, la charge peut être spectatrice, certains considèrent ce mode d'activation comme étant non ergodique.

5.1. Méthodes d'activation ergodique (CID, IRMPD) utilisées avec un tandem Qh/FT/ICR.

Ces processus ont été largement décrits, car ils sont utilisés depuis plusieurs décennies et notamment sur les ions simplement chargés.

a) CID (*collision induced dissociation*)

Initialement les processus CID étaient de haute énergie (plusieurs keV). Depuis le développement des analyseurs avec des faisceaux d'ions à de faibles énergies cinétiques, la tendance a été d'étudier des collisions allant de quelques dixièmes à une centaine d'eV. Dans le mode CID de haute énergie, on accède à une excitation électronique mais aussi vibrationnelle. Il est ainsi possible de former des ions diradicalaires intermédiaires qui orientent les fragmentations où la charge n'intervient pas. C'est principalement le groupe de McCloskey (93) qui a utilisé ce mode d'activation avec la désorption FAB pour l'ionisation de l'ADN, puisqu'à l'époque la technique d'ionisation par *electrospray* venait d'être seulement introduite.

La dissociation induite par collision (CID) de basse énergie (où l'excitation est uniquement vibrationnelle) est un mode d'activation désormais populaire. Les collisions de basse énergie ont été introduites dans des années 80 par le développement de spectromètre de masse en tandem de type triple quadripôles, les pièges à ions et plus récemment dans les tandems hybrides de type Q-TOF. En ce qui nous concerne, on se limitera aux processus qui se produisent dans un tandem hybride Qh-FT/ICR (130), équipé d'un filtre de masse

quadripolaire (Q) ainsi que d'une cellule de collisions hexapolaire (h) utilisé aussi comme piège à ions. Ainsi, un ion précurseur peut être sélectionné dans le quadripôle, pour être soumis aux collisions avec un gaz noble (Ar, Kr, Xe) ou l'azote. Dans le cas de collision, à basse énergie, le rôle de la masse du gaz cible est extrêmement important pour transférer un maximum d'énergie. En première approximation, lors de la collision ion/cible ce qui importe, c'est l'énergie au centre de masse (E_{cm}). Ce paramètre peut être calculé par l'équation suivante.

$$E_{cm} = E_{lab} \frac{m_c}{m_c + m_i}$$

E_{lab} : énergie laboratoire, m_c : masse du gaz, m_i : masse de l'ion

Ainsi, plus la masse du gaz est élevée, plus la valeur de E_{cm} l'est également. A priori, par augmentation de E_{lab} , l'énergie interne (E_{int}) devrait s'accroître mais en fait à partir d'une certaine valeur de E_{lab} , cette énergie décroît. Pour que E_{cm} soit transformée intégralement en énergie vibrationnelle, il faut que la durée de vie du complexe de collision soit suffisamment longue. Ainsi, plus le complexe formé au moment de la collision possède une grande durée de vie, plus la conversion $E_{cm} \leftrightarrow E_{int}$ est efficace. Ici le principe d'ergodicité joue pleinement son rôle à des faibles énergies cinétiques. L'augmentation de l'énergie cinétique résulte en une diminution de durée de vie du complexe, ce qui est le cas le plus courant et ainsi, la valeur de E_{cm} est partiellement transformé en E_{int} . Il faut souligner que l' E_{lab} est contrôlable par simple modification des « zéro » (ou terre) de chacun des multipoles (multipoles à potentiels « flottants ») et des lentilles.

Lorsque l'énergie interne est supérieure au seuil d'énergie à fournir (énergie d'activation augmenté par le déplacement cinétique), l'ion précurseur se décompose en ions produits qui sont transmis et analysés dans la cellule ICR. Il faut souligner que cette cellule de collision fait également office de piège à ions linéaire où les ions sont accumulés avant d'être transmis vers la cellule ICR permettant d'accroître la sensibilité. Selon l'équation précédente, il est clair que plus la masse de l'ion est grande, plus E_{cm} est faible, et en conséquence E_{int} devient aussi faible. Cette situation décrit le cas des ions simplement chargés. Dans le cas des ions multichargés, les répulsions de Coulomb permettent d'affaiblir les liaisons chimiques pour conduire sous CID à des fragmentations. Dans tous les cas, c'est la charge qui oriente la fragmentation. Toutefois, dans les exemples vus précédemment, il est possible d'avoir des

fragmentations d'au moins une partie de la séquence d'ADN. Pour avoir des fragmentations complètes, il faut avoir d'autres outils.

Rappelons ici que la dissociation dans la cellule de collision externe offre de nombreux avantages. Tout d'abord, une augmentation importante de la gamme dynamique de l'instrument. Ainsi, un ion de faible abondance peut être sélectionné et lui seul et ses ions produits seront transmis vers la cellule ICR. Par ailleurs, ce mode de dissociation permet d'éviter d'avoir à introduire un gaz d'activation dans la cellule (mode SORI-CID) ce qui conduirait à une diminution du pouvoir résolutif et une augmentation du temps d'analyse. Il faut souligner que le mode d'activation collisionnelle dans l'hexapôle ne peut être considéré comme similaire à un quadripôle ni comme le mode résonant dans un piège à ion. En effet, dans l'hexapôle les collisions ont lieu par aller-retours du faisceau d'ions.

Activation collisionnelle de basse énergie par excitation résonante ou "presque" (mode SORI-CID) (sous un faible déphasage de l'ordre de centaines Hz de la résonance)

Les dissociations sous collisions dans la cellule ICR peuvent être effectuées de manière résonante par l'introduction pulsée d'un gaz de collision inerte (*e.g.*, argon) dans la cellule ICR (au contraire des collisions axiales du faisceau d'ions dans le cas de CID dans l'hexapôle de collisions). En fait, dans la cellule ICR, les ions étant piégés selon des trajectoires de faibles amplitudes, l'excitation collisionnelle de ces ions ne peut se faire qu'en augmentant le rayon de l'orbite des ions, c'est-à-dire, en augmentant leur énergie cinétique tout en évitant leur perte. En effet, dès que les rayons de trajectoire des ions augmentent trop, les ions peuvent s'échapper et être éliminés.

Dans le mode d'activation SORI-CID (131), l'ion précurseur est excité à une fréquence légèrement décalée de sa fréquence cyclotronique de 0,5 à 2 kHz. Ainsi, l'ion est alternativement activé et désactivé suivant que la fréquence d'activation est en phase ou en opposition de phase avec la fréquence de l'ion précurseur (*Figure 21*). Ce mode implique un temps d'activation long ($\sim 250 - 500$ ms), ainsi la probabilité de collision augmente suffisamment pour conduire à la dissociation. Par ce biais, l'efficacité de dissociation devrait accroître.

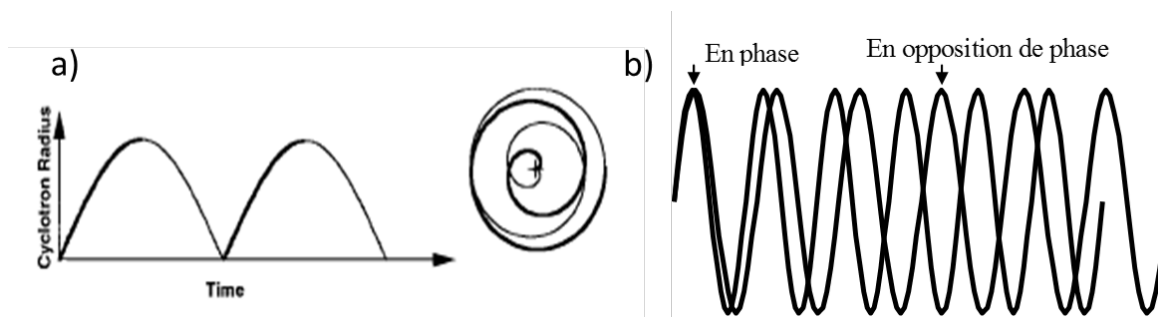


Figure 21 : (a) Evolution du rayon cyclotronique des ions en fonction du temps (45) (b) déphasage de la fréquence de résonance vis-à-vis de la fréquence des ions.

Quatre paramètres expérimentaux principaux déterminent l'efficacité de la fragmentation en mode SORI-CID : le décalage de fréquence (*frequency offset*), l'amplitude d'excitation, la durée d'excitation, et la pression du gaz (132,133). La fréquence *offset* et l'amplitude sont à optimiser pour chaque expérience afin d'obtenir un taux de fragmentation selon les besoins de recherche. Plus la fréquence *offset* est petite, plus l'accumulation d'énergie interne de l'ion précurseur est rapide, donc la constante de vitesse des fragmentations augmente. Le mode SORI-CID étant sélectif de l'ion précurseur, les ions produits ne peuvent pas être activés simultanément parce qu'ils n'ont pas la même fréquence. Les ions consécutifs qui peuvent être observés sont dus à un excès d'énergie transférée à l'ion précurseur.

L'inconvénient du mode SORI-CID est la durée d'analyse par rapport aux autres modes d'activation comme l'IRMPD (*vide infra*). En effet, le gaz introduit dans la cellule ICR pour produire les collisions et la fragmentation de l'ion précurseur provoquent une augmentation de la pression à près de 10^{-6} mbar (au lieu de 10^{-10} mbar). Par conséquent, la sensibilité et le pouvoir résolutif sont largement dégradés. De plus, cette pression élevée peut conduire à la distorsion du massif isotopique. Il est donc nécessaire après l'étape d'activation de respecter un délai de pompage nécessaire à l'obtention d'un vide suffisamment faible (de l'ordre de quelques secondes pour atteindre un vide de 10^{-9} mBar) avant d'effectuer l'étape de détection car il est souhaitable d'avoir un signal transitoire plus long. La Figure 22 démontre les différentes étapes pour une expérience SORI-CID.

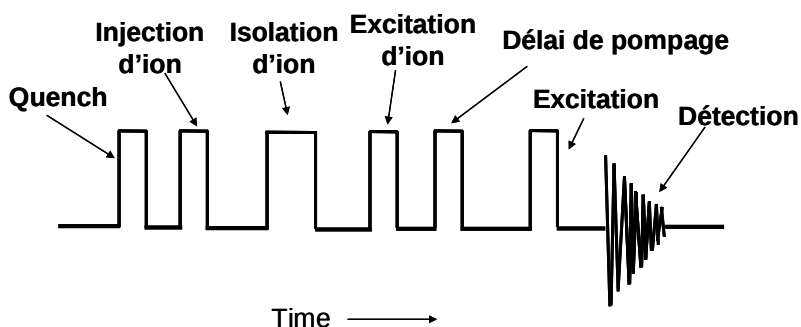


Figure 22. Séquence d'analyse pour obtenir un spectre SORI-CID (documentation Bruker).

b) IRMPD (infrared multiphoton dissociation)

Le mode d'activation IRMPD a été développé à l'origine dans le cas de l'ICR pour la caractérisation structurale de molécules de faible rapport m/z (134). Dans les années 90, McLafferty *et al.* ont démontré son intérêt pour l'étude de peptides, de protéines, d'oligonucléotides et d'oligosaccharides. Depuis, ce mode d'activation est devenu un outil très utile pour étudier la structure des biomolécules.

L'IRMPD consiste en la dissociation induite par absorption de photons infrarouges. L'ion précurseur est irradié dans la cellule ICR par un laser IR à CO_2 ($\lambda_{\text{max}} = 10,6 \mu\text{m}$) par impulsions répétées en continu. La durée de l'impulsion du laser et la puissance du faisceau laser, mesurée en pourcentage de la valeur maximale, sont les deux principaux paramètres à optimiser, puisqu'ils contrôlent la constante de vitesse de dissociation de l'ion précurseur. L'acquisition d'un spectre d'ions produits en mode IRMPD est réalisée en plusieurs étapes successives résumées sur la Figure 23.

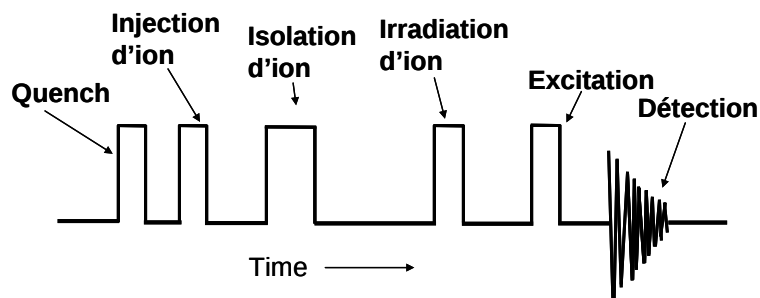


Figure 23. Séquence d'analyse pour obtenir un spectre d'activation IRMPD.

Le mode d'activation IRMPD présente l'avantage par rapport au mode SORI-CID de ne pas introduire de gaz. Donc, la résolution est préservée. En conséquence, le cycle d'analyse est plus court. Cependant, ce mode par irradiation laser n'est pas sélectif à l'ion précurseur, à la différence du mode SORI-CID. En effet, tous les ions dont les trajectoires se superposent sont contenus dans la sélection de l'angle solide du rayon infrarouge et peuvent être activés de la même manière. Les ions produits, formés lors de la dissociation de l'ion précurseur, continuent à subir cette activation, conduisant à de nombreuses fragmentations consécutives. Inversement, les ions évoluant sur une orbite plus grande que le rayon du laser IR, ne peuvent pas être activés. C'est souvent le cas lorsque l'approche de piégeage « sidekick » est utilisée. Car cette approche, permet de modifier le mouvement magnétron des ions et peut conduire à un rayon magnétron trop grand, ce qui peut engendrer une perte d'ions (*Figure 24a*). Afin de résoudre ce problème, une impulsion de radiofréquences peut être utilisée pour augmenter l'efficacité d'activation et détection (*Figure 24b*).

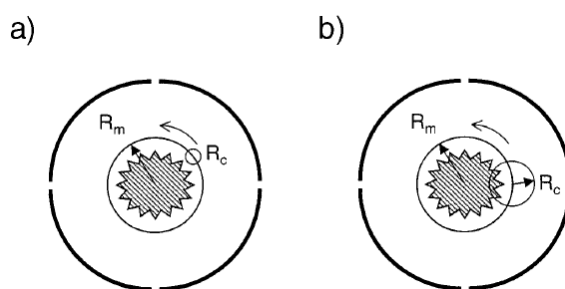


Figure 24 : Combinaison du mouvement magnétron et du mouvement cyclotronique d'un ensemble d'ions qui possède une orbite plus grande que le rayon du laser après application du sidekick : (a) sans application d'impulsion de radiofréquences, les ions ne sont pas irradiés, (b) après application d'impulsion radiofréquence, les ions sont irradiés (135).

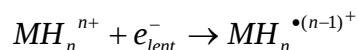
* R_m : rayon magnétron ; R_c : rayon cyclotronique

5.2. Méthodes non ergodiques (ou considérées comme) d'activation des ions impliquant un bombardement d'électrons (ou le transfert d'électrons)

Ces processus impliquent l'incident des électrons, s'appliquent à l'étude d'ions multichargés à l'exception de l'EID.

ECD (electron capture dissociation)

Pour un ion multiprotoné, la production d'ion à charge réduite est observée après capture d'un électron.



La dissociation consécutive à la capture d'électrons (ECD) (78) est très utile pour l'étude structurale des biopolymères et surtout pour les peptides et protéines. Les ions précurseurs positifs multichargés sont bombardés par des électrons de faible énergie cinétique (< 0.2 eV) conduisant à la capture d'un (ou plusieurs) électron(s) responsables de leur dissociation. L'ECD conduit préférentiellement, dans le cas des peptides, aux ruptures de liaisons plus fortes comme les ponts disulfures S-S et les liaisons N-C $_{\alpha}$, alors que d'autres liaisons fragiles telles que des liaisons peptidiques sont conservées. Ce mode de décomposition conduit à des résultats différents des autres modes d'activation, permettant ainsi d'apporter des informations structurales complémentaires. Il a été proposé que l'ECD implique des processus non-ergodiques, c'est-à-dire que les décompositions ont lieu avant dispersion de l'énergie sur tous les oscillateurs, pour rendre compte du caractère « aléatoire » des décompositions observées (78). Un mécanisme a été proposé (136) permettant de mieux comprendre le caractère relativement aléatoire des ruptures observées le long du squelette peptidique.

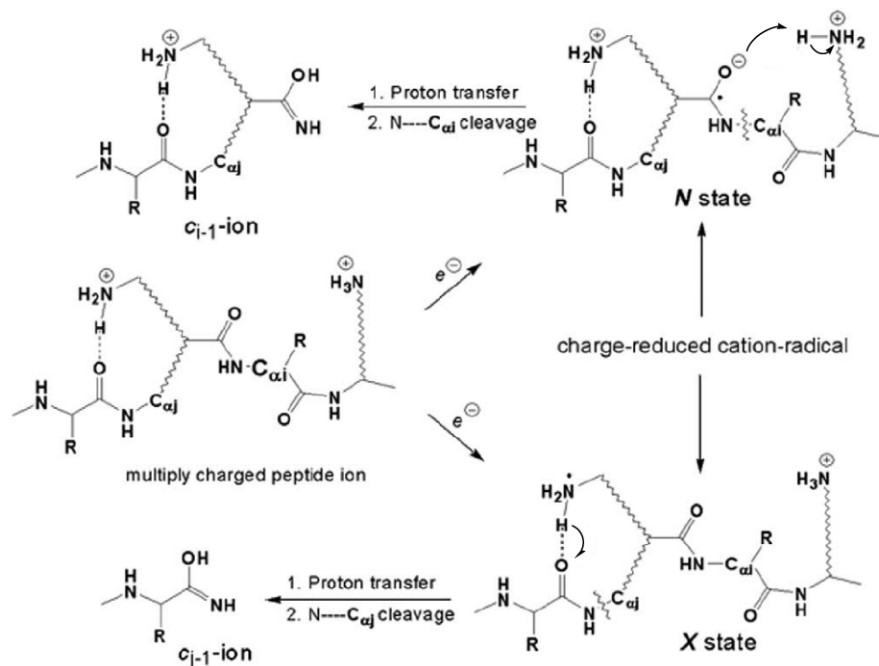


Schéma 15 : Mécanisme général du processus ECD (136).

EDD (electron detachment dissociation)

Cette méthode a été également introduite par l'équipe de Zubarev pour l'analyse des peptides multidéprotonés (1). Si la capture d'un électron est un processus exothermique, le détachement d'un électron est de nature endothermique. C'est pourquoi des électrons incidents avec une énergie cinétique de 21 eV sont utilisés pour effectuer les expériences EDD. Le mécanisme complet de l'EDD n'est pas encore entièrement élucidé, néanmoins un mécanisme a été proposé dans lequel le détachement d'électron ne s'effectue pas seulement sur le groupement acide déprotoné mais peut aussi se produire à d'autres sites de la molécule multidéprotonée. Tout comme l'ECD, les mécanismes mis en jeu par activation EDD impliquent la présence d'un processus de dissociation radicalaire. L'activation par EDD peut donc être utilisée dans la recherche de modifications structurales, dans l'analyse de complexes non-covalents, etc... Cette technique est particulièrement utile pour analyser les oligonucléotides qui sont plus facilement ionisés en mode négatif puisqu'ils possèdent des groupements acides phosphoriques. En 2005, Hakansson *et al.* ont étudié la dissociation des oligonucléotides par EDD (128). Ils ont notamment montré que, le bombardement d'électron avec une cathode directement chauffée donne de moins bon résultats au niveau du nombre

d'ions fragments et de leur intensité par rapport aux résultats obtenus lorsque les électrons sont produit à partir d'une cathode creuse chauffée indirectement (voir l'exemple de la Figure 25). Ainsi, les ions fragments simplement chargés des séries a_i , w_j et c_i ont été observés par bombardement des ions $[d(A_6-2H)]^{2-}$, dont les premiers sont radicalaires. En dehors des ions fragments simplement chargés, ils ont également observé la production d'ions fragments doublement chargés, ce qui n'est pas compatible avec le processus EDD. En effet l'EDD induit la perte d'un électron c'est-à-dire une réduction de charge.

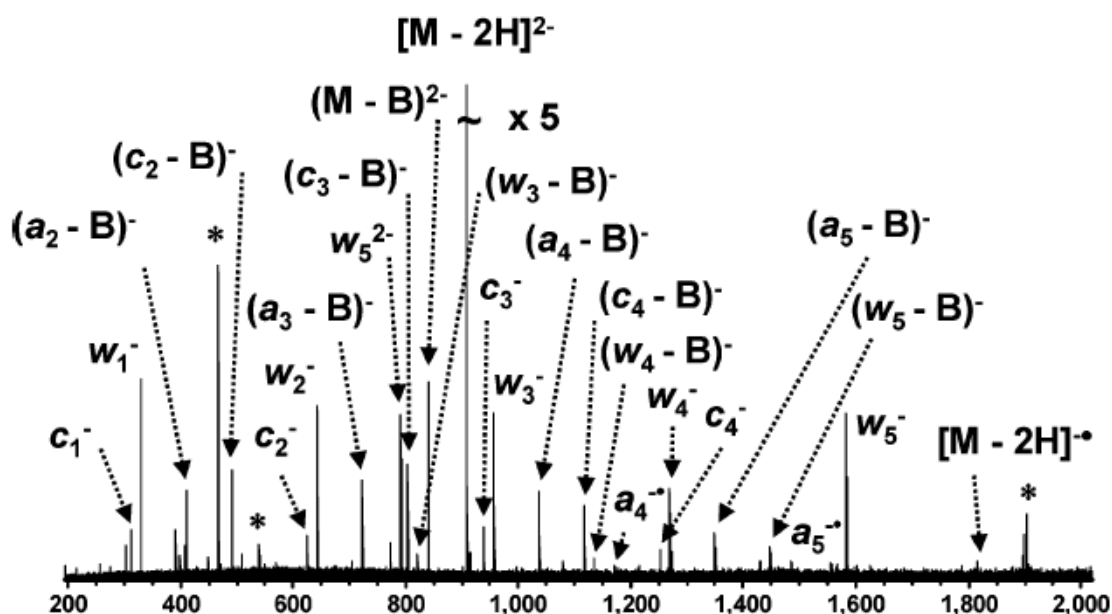


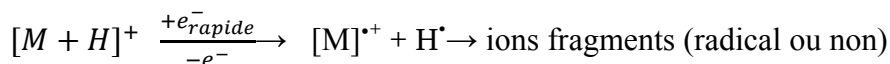
Figure 25 : Spectre EDD de $[dA_6-2H]^{2-}$ par Hakansson et al.(128)

Beaucoup d'études ont été réalisées depuis pour mieux comprendre le processus EDD (2). Le groupe de Depauw (137) a ainsi utilisé la double résonance pour distinguer l'origine des ions fragments en mode EDD. Ils ont proposé que certains ions fragments sont directement issus de l'ion précurseur, avant de perdre un électron et sont donc formés par un autre processus appelé EID.

EID (electron induced dissociation)

Ce mode qui est inhérent à la technologie utilisée pour l'EDD est similaire à l'impact électronique. O'Hair et al. ont étudié les dissociations d'un acide aminé aromatique protoné par EID (4). Ils ont comparé le spectre EID avec les fragmentations induites par collisions. Ils ont proposé que les ions fragments soient issus de l'ion précurseur qui a perdu un radical

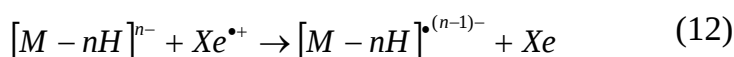
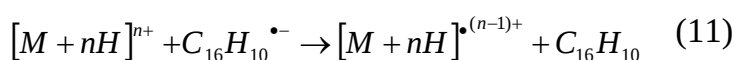
hydrogène. La formation des ions radicalaires observés peut donc être expliquée par l'équation suivante.



Il semble que selon le principe de Franck Condon, les électrons rapides excitent verticalement les ions précurseurs ce qui produirait une excitation électronique et non une excitation vibrationnelle directe.

ETD (*electron tranfert dissociation*)

Sur un principe proche de l'ECD, la dissociation d'ions multichargés (positifs ou négatifs) par transfert d'électrons ou ETD (*Electron-Transfer-Dissociation*) a été développée (138,139). Au lieu du bombardement d'électrons, un réactif chimique, par exemple chargé négativement et donneur d'électrons est introduit et réagit par réaction ion-ion avec l'espèce à fragmenter (140). Ce type d'interaction n'est possible que dans des systèmes de piégeage d'ions. Il est en effet, connu que les ions positif et négatif peuvent coexister dans un domaine particulier du diagramme de stabilité (a_z, q_z). Durant cette interaction ion/ion, un transfert d'électron a lieu pour produire la réduction de charge suivi de la dissociation. Dans ce cas le choix du réactif est primordial. Ainsi, dans le travail initial de Hunt, l'anthracène a été choisi pour être ionisé dans une source d'ionisation chimique en présence de méthane pour produire des ions réactifs $C_{14}H_{11}^{\bullet-}$. A l'aide d'un tandem multi-pièges, McLuckey a utilisé des anions nitrobenzènes (140) ou encore des anions radicaux d'azobenzène (Equation 11 et 12). Aujourd'hui, le fluoranthène est couramment employé sur des instruments commerciaux où l'ETD a été implémenté. Ce réactif conduit à des échanges d'électron particulièrement efficaces grâce à son affinité électronique relativement faible (141). Il faut souligner que l'ETD (alors nommé *n*ETD) a été appliqué également avec succès pour la dissociation d'espèces multidéprotonées de façon analogue à l'EDD (142). L'ETD est ainsi une technique applicable à la fois aux ions positifs et aux ions négatifs en utilisant différents réactifs. Récemment l'ETD a été implanté sur des instruments à transformée de Fourier.



Réactions ion-ion autre que celle utilisée en ETD

La technique de fragmentation basée sur des réactions ion-ion a été inventée par McLuckey *et al.* en 1998 et peut être vu comme les prémisses de l'ETD (143). Des réactions ion-ion permettent de réduire les états de charge d'ions multidéprotonés du cytochrome C par des molécules méthylamines (neutres) (144). L'interaction ion-ion consiste à introduire au sein du piège à ions 2 populations d'ions, positifs et négatifs, pour qu'ils réagissent ensemble en phase gazeuse. Les réactions entre ces 2 populations sont rapides à cause de l'attraction coulombienne (145). Mais elles sont aussi efficaces car, il se produit une réduction de l'état de charge de chacun des réactifs ce qui est un processus très exothermique.

Deux types d'interactions sont connus. Le premier, est l'interaction entre l'ion multidéprotoné et les ions monoprotés où les réactions impliquent des transferts de proton, l'attachement d'anion et le transfert d'anion. Le deuxième type d'interaction concerne les ions multiprotés et les ions monodéprotonés et les réactions envisagées sont des réactions de transfert de proton et de transfert de cation (145).

Références 1

1. Budnik, B. A., Haselmann, K. F., and Zubarev, R. A. (2001) Electron detachment dissociation of peptide di-anions: an electron-hole recombination phenomenon, *Chem. Phys. Lett.* 342, 299-302.
2. Wolff, J. J., Amster, I. J., Chi, L., and Linhardt, R. J. (2007) Electron Detachment Dissociation of Glycosaminoglycan Tetrasaccharides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18, 234-244.
3. Cody, R. B., and Freiser, B. S. (1979) Electron impact excitation of ions from organics: an alternative to collision induced dissociation, *Anal. Chem.* 51, 547-551.
4. Lioe, H., and O'Hair, R. A. J. (2007) 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, 1429-1437.
5. Muller, L. (2011) La spectrométrie de masse à ultrahaute résolution au service de la chimie biomoléculaire : la métabolomique et l'interactomique.
6. Alves, S., Woods, A., and Tabet, J. C. (2007) Charge state effect on the zwitterion influence on stability of non-covalent interaction of single-stranded DNA with peptides, *J. Mass Spectrom.* 42, 1613-1622.
7. Mezzache. (2002).
8. Delvolvé, A. (2006) Etude en phase gazeuse de complexes non-covalents APN/ADN : exploration de l'origine de leur stabilité.
9. Ying. (2007) Mémoire de thèse de Ying Xu.
10. Xu, Y., Afonso, C., Wen, R., and Tabet, J.-C. (2008) Investigation of double-stranded DNA/drug interaction by ESI/FT ICR: orientation of dissociations relates to stabilizing salt bridges, *J. Mass Spectrom.* 43, 1531-1544.
11. Wan, K. X., Gross, J., Hillenkamp, F., and Gross, M. L. (2001) Fragmentation mechanisms of oligodeoxynucleotides studied by H/D exchange and electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12, 193-205.
12. Monn, S. T. M., and Schuerch, S. (2007) New Aspects of the Fragmentation Mechanisms of Unmodified and Methylphosphonate-Modified Oligonucleotides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18, 984-990.
13. Kemper, P. R., and Bowers, M. T. (1983) An improved tandem mass spectrometer - ion-cyclotron-resonance spectrometer, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 52, 1-24.
14. McIver, R. T., Jr. (1970) Trapped ion analyzer cell for ion cyclotron resonance spectroscopy, *Rev. Sci. Instrum.* 41, 555-558.
15. Comisarow, M. B., Grassi, V., and Parisod, G. (1978) Fourier transform ion cyclotron double resonance, *Chem. Phys. Lett.* 57, 413-416.
16. Jurchen, J. C., Garcia, D. E., and Williams, E. R. (2003) Gas-phase dissociation pathways of multiply charged peptide clusters, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14, 1373-1386.
17. Bourgoïn-Voillard, S., Zins, E.-L., Fournier, F., Jacquot, Y., Afonso, C., Pepe, C., Leclercq, G., and Tabet, J.-C. (2009) Stereochemical Effects During [M - H]-Dissociations of Epimeric 11-OH-17 β -Estradiols and Distant Electronic Effects of Substituents at C(11) Position on Gas Phase Acidity, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20, 2318-2333.
18. Davidson. (1963) Progress in nucleic acid research, 1.

19. Lee, J. C., and Gutell, R. R. (2004) Diversity of Base-pair Conformations and their Occurrence in rRNA Structure and RNA Structural Motifs, *J. Mol. Biol.* 344, 1225-1249.
20. Dahm, R. (2008) Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research, *Hum. Genet.* 122, 565-581.
21. Jones, M. E. (1953) Albrecht K., a biographical sketch, *Yale J. Biol. Med.* 26, 80-97.
22. Lorenz, M. G., and Wackernagel, W. (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment, *Microbiol. Rev.* 58, 563-602.
23. Caspersson, T. O. (1950) *Cell Growth and Cell Function*, W. W. Norton and Co.
24. Micklos. (2003) DNA science, 3.
25. Watson, J. D., and Crick, F. H. (1953) Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid, *Nature* 171, 964-967.
26. Watson, J. D., and Crick, F. H. C. (1953) Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature (London, U. K.)* 171, 737-738.
27. Chargaff, E. (1994) Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. 1950, *Experientia* 50, 368-376.
28. Ochoa, S. (1956) Enzymatic synthesis of ribonucleic acid-like polynucleotides, *Fed Proc* 15, 832-840.
29. Holley, R. W., Apgar, J., Everett, G. A., Madison, J. T., Marquisee, M., Merrill, S. H., Penswick, J. R., and Zamir, A. (1965) Structure of a ribonucleic acid, *Science (Washington, DC, U. S.)* 147, 1462-1465.
30. Hershey, A. D., and Chase, M. (1952) Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage, *J. Gen. Physiol.* 36, 39-56.
31. Gott, J. M., and Emeson, R. B. (2000) Functions and mechanisms of RNA editing, *Annu. Rev. Genet.* 34, 499-531.
32. Hoagland, M. B., Stephenson, M. L., Scott, J. F., Hecht, L. I., and Zamecnik, P. C. (1958) A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis, *J. Biol. Chem.* 231, 241-257.
33. Davidson. (1963) Progress in nucleic acid research, *Academic press* 347.
34. Bansal, M. (2003) DNA structure: revisiting the Watson-Crick double helix, *Curr. Sci.* 85, 1556-1563.
35. Richard, J. P., and Editor (2004) *Advances in Physical Organic Chemistry, Volume 39*, Elsevier.
36. <http://farside.ph.utexas.edu/teaching/em/lectures/node28.html>.
37. Gilli, P., Bertolasi, V., Ferretti, V., and Gilli, G. (1994) Evidence for resonance-assisted hydrogen bonding. 4. Covalent nature of the strong homonuclear hydrogen bond. Study of the O-H--O system by crystal structure correlation methods, *J. Am. Chem. Soc.* 116, 909-915.
38. Jeffrey, G. A., and Editor (1997) *An Introduction to Hydrogen Bonding*, Oxford Univ Press.
39. Gabler, R. (1978) *Electrical Interactions in Molecular Biophysics: An Introduction*, Academic Press.
40. Burley, S. K., and Petsko, G. A. (1985) Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization, *Science (Washington, D. C., 1883-)* 229, 23-28.
41. Sandman, D. J. (2006) Modern Physical Organic Chemistry by Eric V. Anslyn and Dennis A. Dougherty, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 461, 147-149.
42. Petitjean, A., Khoury, R. G., Kyritsakas, N., and Lehn, J.-M. (2004) Dynamic Devices. Shape Switching and Substrate Binding in Ion-Controlled Nanomechanical Molecular Tweezers, *J. Am. Chem. Soc.* 126, 6637-6647.

43. Matta, C. F., Castillo, N., and Boyd, R. J. (2006) Extended Weak Bonding Interactions in DNA: π -Stacking (Base-Base), Base-Backbone, and Backbone-Backbone Interactions, *J. Phys. Chem. B* 110, 563-578.
44. Mecozzi, S., West, A. P., Jr., and Dougherty, D. A. (1996) Cation- π Interactions in Simple Aromatics: Electrostatics Provide a Predictive Tool, *J. Am. Chem. Soc.* 118, 2307-2308.
45. Marshall, A. G., Hendrickson, C. L., and Jackson, G. S. (1998) Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer, *Mass Spectrom. Rev.* 17, 1-35.
46. Amster, I. J. (1996) Fourier transform mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 31, 1325-1337.
47. Vartanian, V. H., Anderson, J. S., and Laude, D. A. (1995) Advances in trapped ion cells for Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 14, 1-19.
48. Lawrence, O. et al. (1930) On the production of high speed proton, *Science* 72.
49. Penning. (1936) Glow discharge at low pressure between coaxial cylinders in an axial magnetic field, *Physica* 3.
50. Sommer, H., Thomas, H. A., and Hipple, J. A. (1951) Measurement of e/M by cyclotron resonance, *Phys. Rev.* 82, 697-702.
51. Wobschall, D. (1965) Ion cyclotron resonance spectrometer, *Rev. Sci. Instrum.* 36, 466-475.
52. McIver, R. T., Jr. (1970) Trapped ion analyzer cell for ion cyclotron resonance spectroscopy, *Rev. Sci. Instrum.* 41, 555-558.
53. Marshall, A. G. (1996) Ion Cyclotron Resonance and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopies: Magnetic Partners for Elucidation of Molecular Structure and Reactivity, *Acc. Chem. Res.* 29, 307-316.
54. Comisarow, M. B., and Marshall, A. G. (1974) Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.* 25, 282-283.
55. Allemann, M., Kellerhals, H., and Wanczek, K. P. (1983) High magnetic field Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 46, 139-142.
56. Carlin, T. J., and Freiser, B. S. (1983) Pulsed valve addition of collision and reagent gases in Fourier transform mass spectrometry, *Anal. Chem.* 55, 571-574.
57. Perez, J., Petzold, C. J., Watkins, M. A., Vaughn, W. E., and Kenttamaa, H. I. (1999) Laser desorption in transmission geometry inside a Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10, 1105-1110.
58. McCrery, D. A., Peake, D. A., and Gross, M. L. (1985) Fast atom bombardment and laser desorption mass spectrometry for determination of alkyltriphenylphosphonium salts, *Anal. Chem.* 57, 1181-1186.
59. Blais, J. C., Viari, A., Cole, R. B., and Tabet, J. C. (1990) Target environment and energy deposition in particle induced desorption: californium-252 plasma desorption mass spectrometry and fast atom bombardment mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 98, 155-166.
60. Henry, K. D., Williams, E. R., Wang, B. H., McLafferty, F. W., Shabanowitz, J., and Hunt, D. F. (1989) Fourier-transform mass spectrometry of large molecules by electrospray ionization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 9075-9078.
61. Castro, J. A., Koester, C., and Wilkins, C. (1992) Matrix-assisted laser desorption/ionization of high-mass molecules by Fourier-transform mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 6, 239-241.

62. Riegner, D. E., and Laude, D. A., Jr. (1992) Collision-mediated axial ejection of radially excited ions as a mass-dependent ion loss mechanism in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 120, 103-116.
63. Brown, S. C., Kruppa, G., and Dasseux, J.-L. (2005) Metabolomics applications of FT-ICR mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 24, 223-231.
64. Ghaderi, S., Kulkarni, P. S., Ledford, E. B., Jr., Wilkins, C. L., and Gross, M. L. (1981) Chemical ionization in Fourier transform mass spectrometry, *Anal. Chem.* 53, 428-437.
65. Comisarow, M. B., and Melka, J. D. (1979) Error estimates for finite zero-filling in Fourier transform spectrometry, *Anal. Chem.* 51, 2198-2203.
66. Aarstol, M., and Comisarow, M. B. (1987) Apodization of FT-ICR spectra, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 76, 287-297.
67. Guan, S., and Marshall, A. G. (1995) Ion traps for Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: principles and design of geometric and electric configurations, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 146/147, 261-296.
68. Marshall, A. G., and Guan, S. (1996) Advantages of high magnetic field for Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10, 1819-1823.
69. Senko, M. W., Hendrickson, c. L., Emmett, M. R., Shi, S. D. H., and Marshall, A. G. (1997) External accumulation of ions for enhanced electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 8, 970-976.
70. Belov, M. E., Nikolaev, E. N., Anderson, G. A., Auberry, K. J., Harkewicz, R., and Smith, R. D. (2001) Electrospray ionization-fourier transform ion cyclotron mass spectrometry using ion preselection and external accumulation for ultrahigh sensitivity, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12, 38-48.
71. Senko, M. W., Speir, J. P., and McLafferty, F. W. (1994) Collisional Activation of Large Multiply Charged Ions Using Fourier Transform Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 66, 2801-2808.
72. Kellersberger, K. A., Yu, E., Kruppa, G. H., Young, M. M., and Fabris, D. (2004) Top-Down Characterization of Nucleic Acids Modified by Structural Probes Using High-Resolution Tandem Mass Spectrometry and Automated Data Interpretation, *Anal. Chem.* 76, 2438-2445.
73. Boering, K. A., Rolfe, J., and Brauman, J. I. (1992) Low energy collision induced dissociation: phase-shifting excitation control of ion kinetic energy in ion cyclotron resonance spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 117, 357-386.
74. Little, D. P., Speir, J. P., Senko, M. W., O'Connor, P. B., and McLafferty, F. W. (1994) Infrared Multiphoton Dissociation of Large Multiply Charged Ions for Biomolecule Sequencing, *Anal. Chem.* 66, 2809-2815.
75. Little, D. P., Aaserud, D. J., Valaskovic, G. A., and McLafferty, F. W. (1996) Sequence Information from 42-108-mer DNAs (Complete for a 50-mer) by Tandem Mass Spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.* 118, 9352-9359.
76. Cooper, H. J., Hakansson, K., and Marshall, A. G. (2005) The role of electron capture dissociation in biomolecular analysis, *Mass Spectrom. Rev.* 24, 201-222.
77. Yang, J., and Hakansson, K. (2006) Fragmentation of Oligoribonucleotides from Gas-Phase Ion-Electron Reactions, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 17, 1369-1375.

78. Zubarev, R. A., Kelleher, N. L., and McLafferty, F. W. (1998) Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A Nonergodic Process, *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 3265-3266.
79. Marshall, A. G., and Grosshans, P. B. (1991) Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: the teenage years, *Anal. Chem.* **63**, 215A-229A.
80. Delvolvé. (2006) Etude en phase gazeuse de complexes non-covalents APN/ADN: exploration de l'origine de leur stabilité, *Thèse de l'Université Pierre et Marie Curie*, 2006.
81. Comisarow, M. B., and Marshall, A. G. (1996) Frequency-sweep fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy, *J. Mass Spectrom.* **31**, 588-589.
82. Marshall, A. G., and Roe, D. C. (1980) Theory of Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectroscopy: response to frequency-sweep excitation, *J. Chem. Phys.* **73**, 1581-1590.
83. Marshall, A. G., Wang, T. C. L., and Ricca, T. L. (1985) Tailored excitation for Fourier transform ion cyclotron mass spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 7893-7897.
84. Marshall, A. G., Ricca, T. L., and Wang, T.-C. L. (1988) Tailored excitation for trapped ion mass spectrometry, p 23 pp., Ohio State University Research Foundation, USA .
85. Comisarow, M. B. (1978) Signal modeling for ion cyclotron resonance, *J. Chem. Phys.* **69**, 4097-4104.
86. Easterling, M. L., Amster, I. J., van, R. G. J., and Heeren, R. M. A. (1999) Isotope beating effects in the analysis of polymer distributions by Fourier transform mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, 1074-1082.
87. Nyquist, H. (1928) Thermal agitation of electric charge in conductors, *Phys. Rev.* **32**, 110-113.
88. Drader, J. J., Shi, S. D. H., Blakney, G. T., Hendrickson, C. L., Laude, D. A., and Marshall, A. G. (1999) Digital Quadrature Heterodyne Detection for High-Resolution Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* **71**, 4758-4763.
89. Bresson, J. A., Anderson, G. A., Bruce, J. E., and Smith, R. D. (1998) Improved isotopic abundance measurements for high resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectra via time-domain data extraction, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **9**, 799-804.
90. Gordon, E. F., and Muddiman, D. C. (2001) Impact of ion cloud densities on the measurement of relative ion abundances in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: experimental observations of coulombically induced cyclotron radius perturbations and ion cloud dephasing rates, *J. Mass Spectrom.* **36**, 195-203.
91. Goodner, K. L., Milgram, K. E., Williams, K. R., Watson, C. H., and Eyler, J. R. (1998) Quantitation of ion abundances in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **9**, 1204-1212.
92. Zhang, L.-K., Rempel, D., Pramanik, B. N., and Gross, M. L. (2005) Accurate mass measurements by Fourier transform mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* **24**, 286-309.
93. Crow, F. W., Tomer, K. B., Gross, M. L., McCloskey, J. A., and Bergstrom, D. E. (1984) Fast atom bombardment combined with tandem mass spectrometry for the determination of nucleosides, *Anal Biochem* **139**, 243-262.

94. McNeal, C. J., and Macfarlane, R. D. (1981) Observation of a fully protected oligonucleotide dimer at m/z 12637 by californium-252 plasma desorption mass spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 1609-1610.
95. Bahr, U., Aygun, H., and Karas, M. (2009) Sequencing of single and double stranded RNA oligonucleotides by acid hydrolysis and MALDI mass spectrometry, *Anal Chem* **81**, 3173-3179.
96. Yamashita, M., and Fenn, J. B. (1984) Application of electrospray mass spectrometry in medicine and biochemistry, *Iyo Masu Kenkyukai Koenshu* **9**, 203-206.
97. Covey, T. R., Bonner, R. F., Shushan, B. I., and Henion, J. (1988) The determination of protein, oligonucleotide, and peptide molecular weights by ion-spray mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2**, 249-256.
98. Loo, J. A., Edmonds, C. G., and Smith, R. D. (1990) Primary sequence information from intact proteins by electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Science (Washington, D. C., 1883-)* **248**, 201-204.
99. Nordhoff, E., Kirpekar, F., and Roepstorff, P. (1997) Mass spectrometry of nucleic acids, *Mass Spectrom. Rev.* **15**, 69-138.
100. Goodlett, D. R., Camp, D. G., II, Hardin, C. C., Corregan, M., and Smith, R. D. (1993) Direct observation of a DNA quadruplex by electrospray ionization mass spectrometry, *Biol. Mass Spectrom.* **22**, 181-183.
101. Hoaglund, C. S., Liu, Y., Ellington, A. D., Pagel, M., and Clemmer, D. E. (1997) Gas-phase DNA: conformations of oligothymidine ions, *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 9051-9052.
102. Guo, X., Bruist, M. F., Davis, D. L., and Bentzley, C. M. (2005) Secondary structural characterization of oligonucleotide strands using electrospray ionization mass spectrometry, *Nucleic Acids Res.* **33**, 3659-3666.
103. Green-Church, K. B., and Limbach, P. A. (2000) Mononucleotide gas-phase proton affinities as determined by the kinetic method, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **11**, 24-32.
104. Cheng, X., Gale, D. C., Udseth, H. R., and Smith, R. D. (1995) Charge State Reduction of Oligonucleotide Negative Ions from Electrospray Ionization, *Anal. Chem.* **67**, 586-593.
105. Muddiman, D. C., Cheng, X., Udseth, H. R., and Smith, R. D. (1996) Charge-state reduction with improved signal intensity of oligonucleotides in electrospray ionization mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **7**, 697-706.
106. Crow, F. W., Tomer, K. B., Gross, M. L., McCloskey, J. A., and Bergstrom, D. E. (1984) Fast atom bombardment combined with tandem mass spectrometry for the determination of nucleosides, *Anal. Biochem.* **139**, 243-262.
107. McLuckey, S. A., Van, B. G. J., and Glish, G. L. (1992) Tandem mass spectrometry of small, multiply charged oligonucleotides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **3**, 60-70.
108. Roepstorff, P. (1984) Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides, *Biomed. Mass Spectrom.* **11**, 601.
109. Biemann, K. (1988) Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **16**, 99-111.
110. Wan, K. X., and Gross, M. L. (2001) Fragmentation mechanisms of oligodeoxynucleotides: effects of replacing phosphates with methylphosphonates and thymines with other bases in T-rich sequences, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **12**, 580-589.
111. De, N. A., Liguori, A., Marino, L. M. T., Procopio, A., and Sindona, G. (1997) Participation of the nucléobases in the regioselective backbone fragmentation of

- nucleic acids. A molecular dynamics and tandem mass spectrometric investigation on a model dinucleoside phosphotriester, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 8, 1257-1261.
112. Rodgers, M. T., Campbell, S., Marzluff, E. M., and Beauchamp, J. L. (1995) Site-specific protonation directs low-energy dissociation pathways of dinucleotides in the gas phase, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 148, 1-23.
 113. Wang, Z., Wan, K. X., Ramanathan, R., Taylor, J. S., and Gross, M. L. (1998) Structure and fragmentation mechanisms of isomeric T-rich oligodeoxynucleotides: a comparison of four tandem mass spectrometric methods, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 9, 683-691.
 114. Russo, N., Toscano, M., Grand, A., and Jolibois, F. (1998) Protonation of thymine, cytosine, adenine, and guanine DNA nucleic acid bases: Theoretical investigation into the framework of density functional theory, *J. Comput. Chem.* 19, 989-1000.
 115. Ni, J., Mathews, M. A. A., and McCloskey, J. A. (1997) Collision-induced dissociation of polyprotonated oligonucleotides produced by electrospray ionization, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11, 535-540.
 116. Wang, P., Bartlett, M. G., and Martin, L. B. (1997) Electrospray collision-induced dissociation mass spectra of positively charged oligonucleotides, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11, 846-856.
 117. McLuckey, S. A., and Vaidyanathan, G. (1997) Charge state effects in the decompositions of single-nucléobase oligonucleotide polyanions, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 162, 1-16.
 118. Cerny, R. L., Gross, M. L., and Grotjahn, L. (1986) Fast atom bombardment combined with tandem mass spectrometry for the study of dinucleotides, *Anal. Biochem.* 156, 424-435.
 119. Rodgers, M. T., Campbell, S., Marzluff, E. M., and Beauchamp, J. L. (1994) Low-energy collision-induced dissociation of deprotonated dinucleotides: determination of the energetically favored dissociation pathways and the relative acidities of the nucleic acid bases, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 137, 121-149.
 120. McLuckey, S. A., Vaidyanathan, G., and Habibi-Goudarzi, S. (1995) Charged vs. neutral nucléobase loss from multiply charged oligoribonucleotide anions, *J. Mass Spectrom.* 30, 1222-1229.
 121. Habibi-Goudarzi, S., and McLuckey, S. A. (1995) Ion trap collisional activation of the deprotonated deoxymononucleoside and deoxydinucleoside monophosphates, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 6, 102-113.
 122. McLuckey, S. A., and Habibi-Goudarzi, S. (1993) Decompositions of multiply charged oligonucleotide anions, *J. Am. Chem. Soc.* 115, 12085-12095.
 123. Greco, F., Liguori, A., Sindona, G., and Uccella, N. (1990) Gas-phase proton affinity of deoxyribonucleosides and related nucléobases by fast atom bombardment tandem mass spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.* 112, 9092-9096.
 124. Hunter, E. P. L., and Lias, S. G. (1998) Evaluated Gas Phase Basicities and Proton Affinities of Molecules: An Update, *J. Phys. Chem. Ref. Data* 27, 413-656.
 125. Liguori, A., Napoli, A., and Sindona, G. (1994) Determination of substituent effects on the proton affinities of natural nucleosides by the kinetic method, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 8, 89-93.
 126. Wu, J., and McLuckey, S. A. (2004) Gas-phase fragmentation of oligonucleotide ions, *Int. J. Mass Spectrom.* 237, 197-241.
 127. Bartlett, M. G., McCloskey, J. A., Manalili, S., and Griffey, R. H. (1996) The effect of backbone charge on the collision-induced dissociation of oligonucleotides, *J. Mass Spectrom.* 31, 1277-1283.

128. Yang, J., Mo, J., Adamson, J. T., and Hakansson, K. (2005) Characterization of oligodeoxynucleotides by electron detachment dissociation fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Anal Chem* 77, 1876-1882.
129. Smith, S. I., and Brodbelt, J. S. (2009) Electron transfer dissociation of oligonucleotide cations, *Int. J. Mass Spectrom.* 283, 85-93.
130. Cody, R. B., Burnier, R. C., and Freiser, B. S. (1982) Collision-induced dissociation with Fourier transform mass spectrometry, *Anal. Chem.* 54, 96-101.
131. Gauthier, J. W., Trautman, T. R., and Jacobson, D. B. (1991) Sustained off-resonance irradiation for collision-activated dissociation involving Fourier transform mass spectrometry. Collision-activated dissociation technique that emulates infrared multiphoton dissociation, *Anal. Chim. Acta* 246, 211-225.
132. Laskin, J., and Futrell, J. (2000) Internal Energy Distributions Resulting from Sustained Off-Resonance Excitation in Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. II. Fragmentation of the 1-Bromonaphthalene Radical Cation, *J. Phys. Chem. A* 104, 5484-5494.
133. Gorshkov, M. V., Pasa-Tolic, L., and Smith, R. D. (1999) Pressure limited sustained off-resonance irradiation for collision-activated dissociation in Fourier transform mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10, 15-18.
134. Woodin, R. L., Bomse, D. S., and Beauchamp, J. L. (1978) Multiphoton dissociation of molecules with low power continuous wave infrared laser radiation, *J. Am. Chem. Soc.* 100, 3248-3250.
135. Hofstadler, S. A., Sannes-Lowery, K. A., and Griffey, R. H. (2001) m/z-Selective infrared multiphoton dissociation in a Penning trap using sidekick trapping and an rf-tickle pulse, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15, 945-951.
136. Syrstad, E. A., and Turecek, F. (2005) Toward a general mechanism of electron capture dissociation, *J Am Soc Mass Spectrom* 16, 208-224.
137. Kinet, C., Gabelica, V., Balbeur, D., and De, P. E. (2009) Electron detachment dissociation (EDD) pathways in oligonucleotides, *Int. J. Mass Spectrom.* 283, 206.
138. Stephenson, J. L., Jr., and McLuckey, S. A. (1997) Charge reduction of oligonucleotide anions via gas-phase electron transfer to xenon cations, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11, 875-880.
139. Syka, J. E. P., Coon, J. J., Schroeder, M. J., Shabanowitz, J., and Hunt, D. F. (2004) Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 9528-9533.
140. Pitteri, S. J., Chrisman, P. A., and McLuckey, S. A. (2005) Electron-Transfer Ion/Ion Reactions of Doubly Protonated Peptides: Effect of Elevated Bath Gas Temperature, *Anal. Chem.* 77, 5662-5669.
141. Chi, A., Bai, D. L., Geer, L. Y., Shabanowitz, J., and Hunt, D. F. (2007) Analysis of intact proteins on a chromatographic time scale by electron transfer dissociation tandem mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom.* 259, 197-203.
142. Coon, J. J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and Syka, J. E. P. (2005) Electron Transfer Dissociation of Peptide Anions, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16, 880-882.
143. Xia, Y., and McLuckey, S. A. (2008) Evolution of Instrumentation for the Study of Gas-Phase Ion/Ion Chemistry via Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19, 173-189.
144. McLuckey, S. A., Van, B. G. J., and Glish, G. L. (1990) Reactions of dimethylamine with multiply charged ions of cytochrome c, *J. Am. Chem. Soc.* 112, 5668-5670.
145. Pitteri, S. J., and McLuckey, S. A. (2005) Recent developments in the ion/ion chemistry of high-mass multiply charged ions, *Mass Spectrom. Rev.* 24, 931-958.

Chapitre II : Partie expérimentale

1. Préparation des échantillons

Les ADNs utilisés :

Table 1. Les oligonucléotides utilisés et leur masse moléculaire

Rapport masse/charge (m/z) $[M-nH]^{n-}$					
	Masse moléculaire	n=1	n=2	n=3	n=4
ADN 12-mer					
3'-T ₄ (GC) ₂ A ₄ -5'	3642.652	3641.644	1820.318	1213.209	909.655
ADN 6-mer					
3'-GCATGC-5'	1791.343	1790.335	894.663	596.106	-
3'-GGGTTT-5'	1837.337	1836.329	917.661	611.438	-
3'-GTTTTT-5'	1787.324	1786.316	892.654	594.767	-
3'-TTCTTT-5'	1747.318	1746.310	872.651	581.431	-
3'-TTATTT-5'	1771.329	1770.321	884.657	589.435	-
3'-TTTTTT-5'	1762.318	1761.310	880.151	586.431	-

Les 2'-déoxynucléotides-5'-monophosphates

Table 2. Les 2'-déoxynucléotides-5'-monophosphates utilisés et leur masse

Masse/charge (m/z) $[M-nH]^{n-}$			
	masse moléculaire	n=1	n=2
2'-déoxyguanosine-5'-monophosphates	347.063	346.056	172.525
2'-déoxyadénine-5'-monophosphates	331.068	330.061	164.527
2'-déoxycytidine-5'-monophosphates	307.057	306.050	152.521
2'-déoxyuracile-5'-monophosphates	308.041	307.174	153.013

Tous les brins ADN ont été obtenus à partir d'EUROFINS MWG Biotech (Ebersberg, Allemagne) et utilisés sans étape de purification supplémentaire. Tous les autres produits chimiques et les 2'-déoxynucléotides-5'-monophosphates ont été achetés chez Sigma-Aldrich

Chimie (St Quentin Fallavier, France). Des échantillons ont été préparés en utilisant l'eau déminéralisée (18,2 M Ω) et méthanol de qualité HPLC en proportion 80/20.

En mode négatif, les échantillons sont dilués dans le solvant eau/méthanol 80/20 à la concentration finale de 20 μ M. Les complexes non-covalents dinucléotides sont dilués dans la même condition en ajoutant 1 mM d'acétate ammonium.

En mode positif, les échantillons sont dilués dans les mêmes conditions qu'en mode négatif en ajoutant 1 mM d'acétate ammonium.

2. Système utilisé : ESI-Qh-FTICR

Dans notre étude, un spectromètre de masse hybride Qh-FT/ICR (Apex-Qe™ de Bruker Daltonics) a été utilisé (*Figure 1*). Il s'agit d'un instrument en tandem équipé d'un aimant supraconducteur de 7 Tesla activement blindé, d'une cellule cylindrique dite « infinie » et d'une source externe ESI de type Apollo II à injection hors axe. Les ions sont transmis au moyen de lentilles à restrictions appelées couramment « ion funnel ».

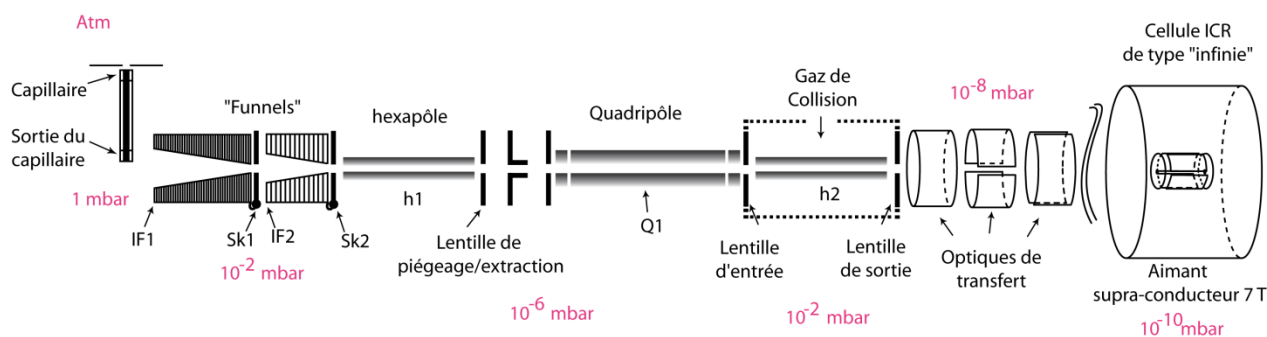


Figure 1. Schéma du Qh-FTICR (documentation Bruker)

La cellule ICR cylindrique est de type « infinie », cette amélioration de géométrie permet d'éliminer l'éjection des ions selon l'axe z (1). Ce problème d'éjection est lié à la dimension finie de la cellule. La conception de la cellule « infinie » est basée sur la possibilité de moduler le champ électrique d'excitation d'une cellule infiniment longue à une cellule avec une dimension finie. Pour cela, les plaques de piégeages sont composées de 11 segments reliés par 10

résistances de $1\text{ k}\Omega$ permettant l'application d'un potentiel RF variable le long des plaques de piégeage (Figure 2). L'élimination de l'éjection suivant l'axe z permet une excitation des ions avec un rayon d'orbite plus grand, conduisant au renforcement du rapport signal sur bruit. Il en résulte une meilleure précision de masse, et une procédure d'excitation prévisible. En pratique sur les spectres de masse l'utilisation d'un rayon d'excitation plus grand conduit à l'observation de la troisième harmonique pour les signaux les plus intenses.

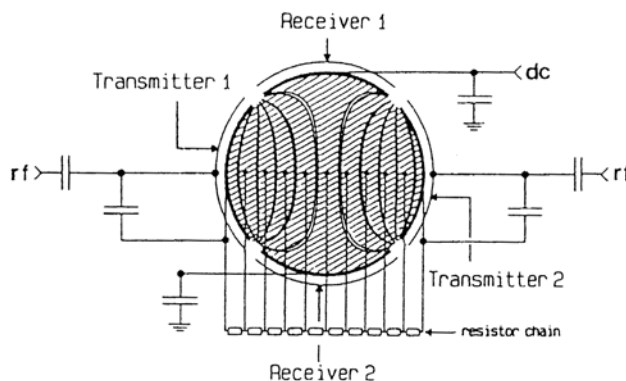


Figure 2. Schéma la de la cellule « infinie » présentant les 11 segments de la plaque de piégeage reliés par une série de résistances.

La spectrométrie de masse à transformée de Fourier couplée à l'ionisation par électronébulisation est un outil puissant (2) notamment pour l'étude de systèmes non-covalents. Etant une source de désorption/ionisation douce, l'ESI est capable de préserver les associations non-covalentes pendant la désorption des agrégats à partir de la solution. De plus, pour les systèmes macromoléculaires, les spectres de masse produits en mode ESI montrent une série d'ions multichargés à des valeurs m/z réduites et donc facilite leur analyse. Ceci donne accès à l'étude de molécules de très hautes masses moléculaires avec des analyseurs caractérisés par une gamme de m/z modeste.

Les ions formés dans la source à pression atmosphérique sont focalisés et transférés dans un filtre quadripolaire qui permet de sélectionner un certain ion, qui peut être ensuite activé dans une cellule de collision, faisant également office de piège linéaire (h2). Dans le dernier cas l'accumulation des ions dans le piège linéaire h2 est possible avant leurs injections dans la cellule ICR, la sensibilité et la gamme dynamique peuvent être encore plus renforcées (3-5).

2.1. Conditions expérimentales de la source *electrospray* et les paramètres du traitement des spectres de masse.

(a) : En mode négatif, les solutions d'ADN et de 2'-déoxynucléotides-5'-monophosphates ont été infusées dans une source d'électronébulisation Apollo II à débit de 120 L.h^{-1} avec l'aide de gaz de nébulisation N_2 chauffé à 150°C . Une tension de 3500 V est appliquée au capillaire d'introduction. La sortie du capillaire de transfert est fixée à 300 V : Le skimmer I est fixé à 40V et le skimmer II est fixé à 8V .

(b) : En mode positif les solutions d'ADN ont été infusées dans une source d'électronébulisation Apollo II à débit de 120 L.h^{-1} avec l'aide de gaz nébulisation N_2 chauffé à 200°C . Une tension de -3000 V est appliquée au capillaire. La sortie du capillaire a été fixée à -300 V : Le skimmer I est fixé à -40V et le skimmer II est fixé à -6V .

(c) : Tous les spectres de masse ESI ont été acquis avec le logiciel xmass (version 6.1, Bruker Daltonics). La gamme m/z est fixée de 200 à 2000 Th . Le signal transitoire a été amplifié et numérisé à l'aide de 512K points résultant de l'enregistrement d'un signal dans le domaine temporel de $0,47 \text{ s}$ transformé en domaine fréquentiel par une transformée de Fourier (un remplissage de zéro et de Sinbell apodisation). Les rapports m/z expérimentaux ont été comparés aux m/z théoriques et des erreurs de mesure moins de 5 ppm sont retenues. Les pics des spectres de masse (spectres ESI) ont été marqués à l'aide de nomenclature de McLuckey (6) qui a été modifiée ainsi (Schéma 1) : afin de décrire la perte de base nucléique dans la molécule, des formes radicales ou anion, la nomenclature a été modifiée à l'aide du capital B (Schéma 1) au lieu de BH pour nucléobase neutre. Une apostrophe a été utilisée pour montrer la perte de H (*i.e.*, 'B). Un anion ou une espèce radicale, ont ainsi été notés 'B⁻ ou 'B[•].

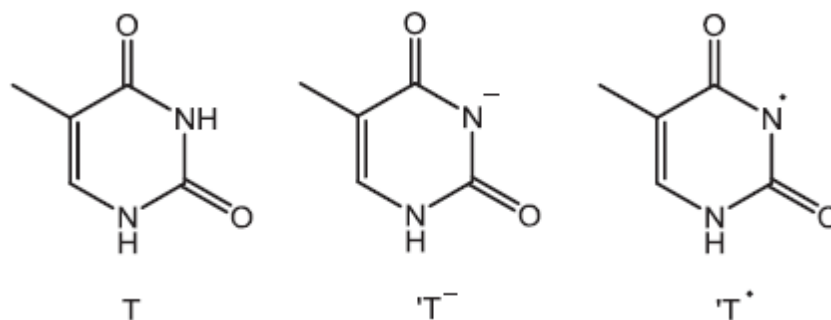


Schéma II.1 : Nomenclature utilisée pour décrire la nucléobase (thymine) en phase gazeuse.

3. Paramètres de l'instrument et conditions des expériences en MS/MS

3.1. SORI-CID et l'IRMPD

Les modes d'activations (SORI-CID) ont été accomplis à l'aide d'argon comme gaz de collision. Un décalage de fréquence de 600 Hz est appliqué pendant un temps de 250 ms. Un retard de 2 s de pompage a été utilisé avant les étapes d'excitation et de détection. Tous les spectres de masse ont été étalonnés en mode interne. Les ions sont excités en utilisant une amplitude d'excitation du 7.8 V_{p-p} pour les oligonucléotides 6mer, 6 V_{p-p} pour les 2'-déoxynucléotides-5'-monophosphates et de 5.5 V_{p-p} pour les complexes non-covalents dinucléotides. Les expériences IRMPD ont été réalisées avec un laser CO₂ 25 W (Synrad, Mukilteo, WA, Etats-Unis) à une longueur d'onde de 10,6 µm. L'énergie d'irradiation de photons a été fixée à 50% de la puissance maximal du laser. Un temps d'irradiation variable de 50 à 80 ms a été imposé.

3.2. EDD-EID

Pour les expériences d'activation en mode EDD, les électrons ont été produits à partir d'une cathode creuse chauffée indirectement (diamètres intérieur et extérieur de 3.5 mm et 7.6 mm, respectivement), située à 88 mm de la cellule ICR. Ils ont ensuite été introduits dans la cellule ICR. Un courant de chauffage de 1.5A a été appliqué à un élément chauffant situé derrière la cathode. Une électrode de verre (6 mm de diamètre intérieur) située immédiatement devant la cathode a été portée à -20 V. Le temps d'irradiation des électrons et une tension de polarisation ont été variés d'une expérience à l'autre et sont décrits dans le tableau suivant:

Table 3. Temps d'irradiation et tension de polarisation pour utilisés les expériences EDD-EID

	Temps d'irradiation (s)	Tension de polarisation (ECD bias V)
EDD _{ADN 6mer}	3	19.5
EID _{2'-déoxynucléotide-5'-monophosphate}	3	13
EDD (ou charge stripping) _{ADN}	0.1	30

Références 2

1. Caravatti, P., and Allemann, M. (1991) The infinity cell: a new trapped-ion cell with radiofrequency covered trapping electrodes for Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Org. Mass Spectrom.* 26, 514-518.
2. Hendrickson, C. L., and Emmett, M. R. (1999) Electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 50, 517-536.
3. Senko, M. W., Hendrickson, C. L., Emmett, M. R., Shi, S. D. H., and Marshall, A. G. (1997) External accumulation of ions for enhanced electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 8, 970-976.
4. Wang, Y., Shi, S. D. H., Hendrickson, C. L., and Marshall, A. G. (2000) Mass-selective ion accumulation and fragmentation in a linear octopole ion trap external to a Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer, *Int. J. Mass Spectrom.* 198, 113-120.
5. Belov, M. E., Anderson, G. A., Angell, N. H., Shen, Y., Tolic, N., Udseth, H. R., and Smith, R. D. (2001) Dynamic range expansion applied to mass spectrometry based on data-dependent selective ion ejection in capillary liquid chromatography fourier transform ion cyclotron resonance for enhanced proteome characterization, *Anal. Chem.* 73, 5052-5060.
6. McLuckey, S. A., Van, B. G. J., and Glish, G. L. (1992) Tandem mass spectrometry of small, multiply charged oligonucleotides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 3, 60-70.

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Etude des désoxy-oligonucléotides multidéprotonés par *electron detachment dissociation* (EDD).

1.1. Introduction

L'*electrospray* est une source d'ionisation douce permettant d'analyser des espèces de haute masse moléculaire telles que les oligonucléotides (1-3). Cette source conduit à la production d'espèces multichargées intactes en phase gazeuse à partir de macromolécules qui peuvent même préserver des interactions non covalentes comme, par exemple au sein des duplexes d'ADN (4). Différentes techniques d'activation en phase gazeuse ont été utilisées pour dissocier les oligonucléotides, la plus commune étant la dissociation induite par collision (CID) (5,6). Cependant, dans ce cas, les séries d'ions fragments de séquences d'ADN riches en thymine (4) peuvent être incomplètes (7,8). En fait, il a été montré que la première étape de dissociations d'ADN multidéprotoné implique la perte d'une base nucléique B_i (formation de $[M-nH-B_i]^{n-}$) qui induit consécutivement la formation d'ions produits complémentaires $[a_i-B_i]^{n-}$ et w_j (9-11). Or, la perte de la thymine est thermodynamiquement défavorisée en raison de sa relative faible affinité protonique ce qui explique la grande stabilité des oligonucléotides riches en thymine sous CID (12,13).

Le processus d'activation par capture d'électrons (ECD) a été développé à l'origine par Zubarev *et al* (14-16). Cette méthode est généralement appliquée à des molécules multiprotonées en utilisant des électrons à faible énergie cinétique (0-2 eV). La capture d'électrons étant exothermique (5-7 eV) en raison de la diminution de l'état de charge, elle induit la rupture de liaisons covalentes par un processus radicalaire (17). Ce mode de dissociation est largement utilisé pour l'étude de peptides présentant des modifications post-traductionnelles. En effet, le processus ECD se produit aléatoirement le long du squelette peptidique permettant de préserver des groupements labiles comme les groupements phosphates et donc ceux de l'ADN (17,18). Complémentaire à l'ECD, l'EDD (dissociation par détachement d'électrons) est dédiée aux molécules multidéprotonées. Or, le mode ion négatif est choisi pour analyser l'ADN en raison de la présence de plusieurs groupements phosphates considérés comme de forte acidité en phase gazeuse. Généralement, le processus EDD est produit par des électrons ayant une énergie cinétique significativement plus élevée que pour l'ECD (> 10 eV) (19-21). Le mouvement de l'électron est lié à une longueur d'onde

qui dépend de l'énergie cinétique, qui permet ou non par interférence avec l'ion multichargé de provoquer le détachement d'un ou plusieurs électrons (*electron stripping*) (22,23). Il faut noter que, sous collisions de haute énergie cinétique (24,25) (plusieurs keV) le processus de détachement d'électrons (ou *electron stripping*) peut être observé. Ce processus est observé surtout dans les collisions de haute énergie mais aussi pour des processus induits par bombardement d'électrons. Xu *et al.* ont étudié les fragmentations d'oligonucléotides doubles brins associés à des médicaments par EDD (21). Ils ont observé une bonne efficacité de détachement d'électrons mais les ions fragments sont produits avec une très faible abondance. Hakansson *et al.* (26) ont étudié des simples brins d'oligonucléotides doublement chargés (*i.e.*, 6 mer) par EDD et ils ont observé des ions fragments dont certains diffèrent de ceux produits avec des méthodes d'activation ergodiques telles que le CID ou l'IRMPD. En particulier, la présence d'ions radicaux de la série $a_i^{\bullet-}$ a pu être mise en évidence. Récemment, à l'aide d'expériences de double résonance pour éjecter un des radicaux de la série $a_i^{\bullet-}$ formé pendant des expériences EDD, ils observent une diminution de l'abondance des ions produits $[a_i-T]^{\bullet-}$. Ce résultat suggère que les ions fragments $[a_i-T]^{\bullet-}$ sont produits grâce aux dissociations consécutives des ions radicaux de la série $a_i^{\bullet-}$ par des processus radicalaires. Différentes méthodes d'activation peuvent être utilisées pour obtenir le détachement d'électrons à partir des molécules multidéprotonées. Par exemple, ce processus peut avoir lieu par photodétachement d'électrons (EPD) sous irradiation UV (27, 28). En utilisant cette méthode, Gabélica *et al.* (27) ont montré que le détachement d'électrons est dépendant de la nucléobase (présence de la guanine). Cependant, des ions fragments sont peu observés en mode EPD. L'objectif de cette étude était de comparer les différences de fragmentations de l'ADN multidéprotoné par activation CID et EDD. Les expériences de double résonance et de MS³ ont été réalisées sur des ions à nombre impair d'électrons, afin d'obtenir des détails supplémentaires sur les mécanismes de l'EDD. De ce fait, la contribution respective des processus de l'EDD et de l'EID dans les spectres MS/MS a pu être démontrée. Le comportement et l'influence des nucléobases dans les processus EDD ont été examinés. Enfin les mécanismes ont été proposés pour expliquer les fragmentations impliquant des processus radicalaires.

1.2. Résultats

1.2.1. Spectres de masse ESI d'ADN 6-mer d(T_2CT_3) en mode négatif

La *Figure 1* montre le spectre de masse ESI de l'ADN d(T_2CT_3) enregistré en mode négatif. Le pic principal correspond à l'ion doublement chargé $[M-2H]^{2-}$ (m/z 872), très intense, ce qui permet facilement d'effectuer des expériences MS/MS particulières telles que la double résonance ou les expériences MS^3 séquentielles. On observe également des espèces déprotonées cationisées, pour lesquelles un ou plusieurs protons sont remplacés par un ou plusieurs cations sodiums, ces ions étant de même état de charge que l'ion principal c'est-à-dire doublement déprotonés. Par contre, les ions intacts ayant d'autres états de charge ne sont pas observés à l'exception de l'ion $[M-3H]^{3-}$ (m/z 581) qui est détecté avec une très faible abondance. Il faut noter que ces ions pourraient être formés dans la source ESI, mais le spectromètre de masse est optimisé pour la transmission de l'ion doublement chargé. Notamment le quadripôle est réglé pour favoriser le transfert des ions dans la zone de m/z autour de 900, ce qui conduit à défavoriser la transmission des ions de m/z inférieurs et donc les ions de plus hauts états de charge. De même, le temps de vol entre la cellule ICR et la cellule de collision peut induire une discrimination des ions selon leurs rapports m/z . Concernant les ions fragments en source, on observe un seul ion de la série y_j (y_5^{2-} m/z 720), cet ion fragment probablement produit par des réactions d'hydrolyse dans les gouttelettes (ou les agrégats) lors de leur déprotonation (ou par désorption).

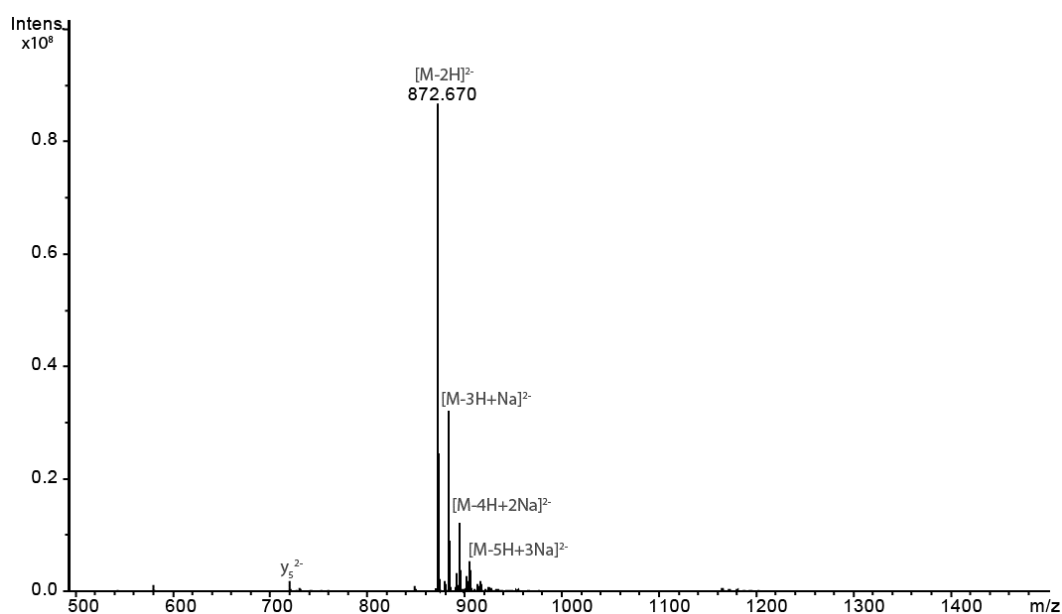


Figure 1 : Spectre de masse ESI en mode négatif d'ADN 6-mer (T_2CT_3).

1.2.2. Activation d'ADN 6-mer multidéprotoné par SORI-CID

Une série d'ADN 6-mer [*i.e.*, d(GT₅), d(G₃T₃), d(T₂AT₃), d(T₂CT₃), d(T₆) et d(GCATGC)] contenant un nombre de thymine variable, a été étudié par le mode SORI-CID. Une faible amplitude d'excitation SORI a été choisie (3,4 V) pour limiter le nombre de dissociations consécutives. Les molécules doublement déprotonées sont les plus abondantes dans les spectres de masse ESI. Ces ions doublement chargés ont été sélectionnés et activés en SORI-CID dans les mêmes conditions, le spectre SORI-CID de l'ion [d(GT₅)-2H]²⁻ (*m/z* 892) (*Figure 2a*) présente l'ion w₅²⁻ (*m/z* 768) sans formation de son analogue simplement chargé w₅⁻ (*m/z* 1537). Toutefois, la série complète d'ions fragments w_j⁻ est détectée, mais ces ions sont produits selon une très faible abondance pour la plus part à l'exception de l'ion w₅²⁻ (*m/z* 768). Notez que la perte de nucléobase (G) ([M-2H-G]²⁻, *m/z* 817) est détectée alors qu'aucune perte de thymine n'est observée. L'ion w₅²⁻ porte toute la charge initiale de l'ion précurseur donc l'ion fragment complémentaire [a₁-G₁]⁻ (*m/z* 115) ne peut pas être formé.

Le spectre SORI-CID de l'ion [d(G₃T₃)-2H]²⁻ (*m/z* 917) (*Figure 2b*) présente les ions complémentaires w_j⁻/[a_i-B_i]⁻ (avec j = 3,4 et i + j = 6) correspondants aux ruptures dans la région riche en guanine. A nouveau, l'ion [a₁-G₁]⁻ (*m/z* 115) n'est pas formé puisque l'ion w₅²⁻ reste toujours présent. Néanmoins, l'abondance relative de l'ion w₅²⁻ diminue tandis que celle des ions w₄²⁻ et w₄⁻ est renforcée. Les pertes directes de G sont favorisées par l'affinité protonique important de cette nucléobase, et en particulier l'ion fragment interne [G2:G2]⁻ (*m/z* 506) apparaît.

Les spectres SORI-CID des ions [d(T₂AT₃)-2H]²⁻ (*m/z* 884) (*Figure 2c*) et [d(T₂CT₃)-2H] (*m/z* 872) (*Figure 2d*) présentent des ions fragments dus aux pertes directes de bases A et C, respectivement. Cependant, le couple d'ions fragments complémentaires [a₃-B₃]⁻/w₃⁻ (*m/z* 705 et *m/z* 929, respectivement) apparaît avec des abondances similaires. L'abondance relative de l'ion [a₃-A₃]⁻ (*m/z* 705) est nettement plus élevée que celle de l'ion [a₃-C₃]⁻ (*m/z* 705). De la même manière, l'ion fragment [M-2H-A₃]²⁻ (*m/z* 817) est nettement plus abondant que l'ion fragment analogue [M-2H-C₃]²⁻ (*m/z* 817). Enfin, parmi les ions produits de faibles abondances, la série d'ions complète w_j est détectée, soit sous forme d'ions simplement chargés (j = 1, 2 et 3) soit d'ions doublement chargés w_j²⁻ (j = 4 et 5).

Le spectre SORI-CID de l'ion [dT₆-2H]²⁻ (*m/z* 880) (*Figure 2e*) présente également la série complète d'ions w_j⁻. De plus, la série d'ions impliquant la perte de thymine ([a_i-T_i]⁻, i =

2-5) a été détectée en très faible abondance. Cela montre que la perte de thymine se fait avec une très faible constante de vitesse de dissociation.

Enfin, le spectre SORI-CID de $[d(\text{GCATGC-2H})]^{2-}$ (m/z 894) de (*Figure 2f*) qui présente une seule base thymine est plus informatif. En effet ce spectre présente, en particulier, plus d'ions fragments internes (*i.e.*, $[\text{C2:C2}]^-$, $[\text{T4:T4}]^-$, $[\text{A3:T4}]^-$ et $[\text{C2:T4}]^-$ m/z 446, m/z 481, m/z 794 et m/z 1083, respectivement) comparés aux autres spectres d'ADN étudiés. En outre, l'abondance de l'ion w_1^- (m/z 306) a été fortement renforcée (dû à la perte de G) et les pertes de bases guanine, cytosine et adénine ont donné la série d'ions $[\text{M-2H-B}_i]^-$ (m/z 1639, m/z 1655 et m/z 1679, respectivement) et en conséquence la série d'ions $[\text{a}_i\text{-B}_i]^-$ est détectée (sauf pour $i = 1$ et 4).

Par activation collisionnelle, tous les ions d'oligonucléotides 6-mer conduisent à une série d'ions fragments simplement chargés w_j^- (avec $j < 4$) en fonction de la séquence d'ADN et plus particulièrement de l'affinité protonique des nucléobases. L'ion complémentaire de w_3^- , $[\text{a}_3\text{-B}_3]^-$ a été détecté bien que $\text{B} = \text{T}$. Les ions simplement chargés w_5^- n'ont jamais été observés, alors que l'ion simplement chargé w_4^- est produit en compétition avec l'ion doublement chargé w_4^{2-} dans la plupart des cas. Dans le cas d'une séquence nucléotidique plus aléatoire [*i.e.*, (GCATGC)] présentant une seule thymine, les couples d'ions $[\text{a}_i\text{-B}_i]^-/w_j^-$ ont été détectés (sauf pour $i = 1, 4$ en raison de la formation de w_5^{2-} qui annihile la formation de $[\text{a}_1\text{-G}_1]^-$ et de la présence de thymine, respectivement).

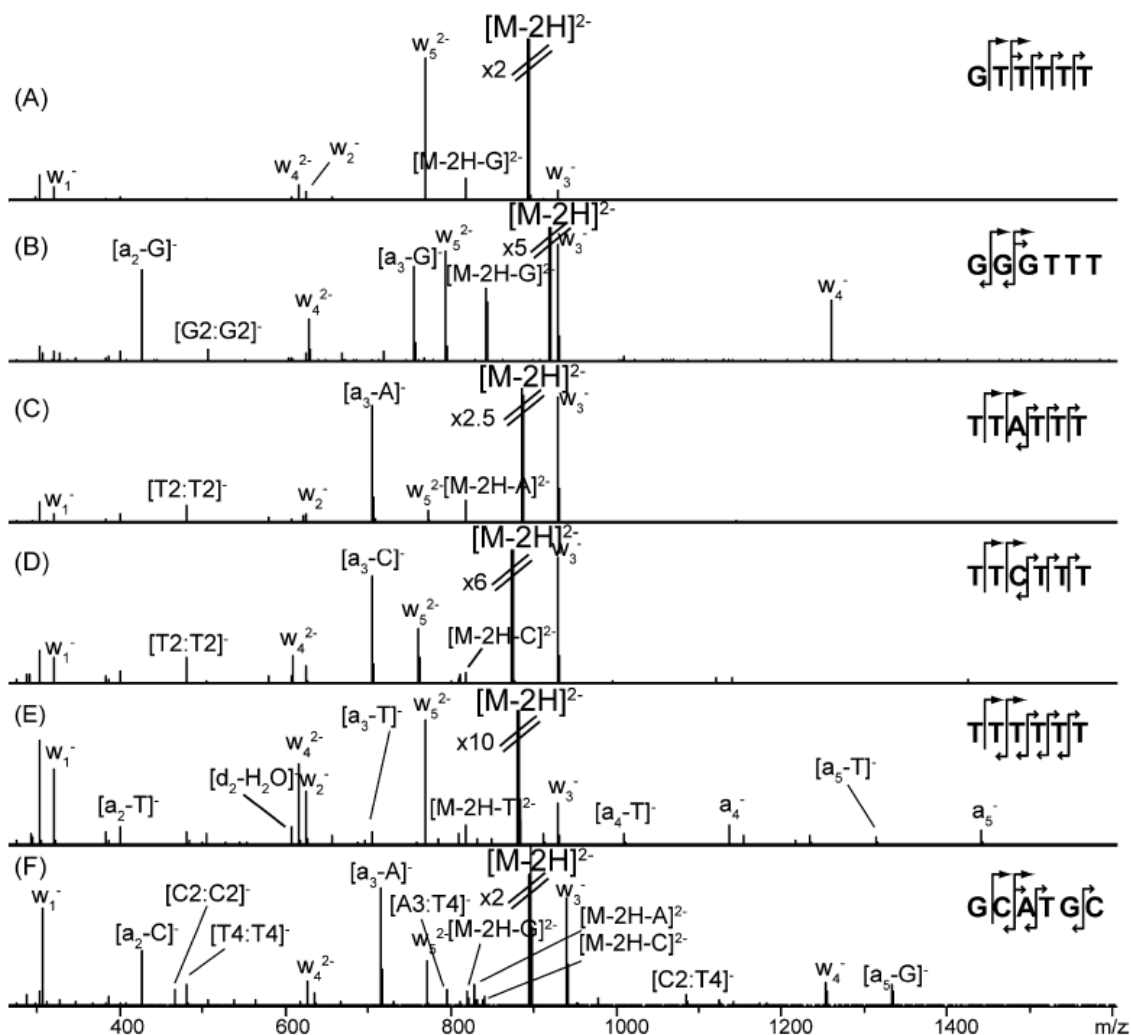


Figure 2. Spectres SORI-CID d'ions doublement déprotonés d'ADN 6-mer. (a) $[d(GT_5)-2H]^{2-}$ (m/z 892), (b) $[d(G_3T_3)-2H]^{2-}$ (m/z 917), (c), $[d(T_2AT_3)-2H]^{2-}$ (m/z 884), (d) $[d(T_2CT_3)-2H]^{2-}$ (m/z 872), (e) $[d(T_6)-2H]^{2-}$ (m/z 880) et (f) $[d(GCATGC)-2H]^{2-}$ (m/z 894). La flèche plus grande indique les ions simplement chargés et la flèche plus petite les ions doublement chargés.

1.2.3. Spectres EDD/EID des ADN 6-mer déprotonés $d(T_2AT_3)$ et $d(T_2CT_3)$

La Figure 3a montre le spectre EDD-EID de l'ion doublement déprotoné $[d(T_2AT_3)-2H]^{2-}$ (m/z 872) (les attributions des ions produits sont données dans le Table 1). Ce spectre d'ions produits affiche une série complète d'ions fragments simplement chargés w_j^- permettant une détermination simple de la séquence nucléotidique. Il est à noter que les abondances relatives des ions produits w_3^- (m/z 929) et w_5^{2-} (m/z 760) dans le spectre EDD-EID et le spectre SORI-CID (Figure 1c) sont similaires. Par contre, les ions simplement

chargés w_4^- (m/z 1218) et w_5^- (m/z 1522), absents de spectre SORI-CID, sont détectés dans le spectre EDD-EID. Il faut remarquer que l'abondance des ions de la série w_j^- augmente avec la taille des ions produits, sauf pour l'ion w_3^- pour lequel elle est renforcée en raison de la présence de l'adénine à une position favorisant sa perte. L'ion de charge réduite $[M-2H]^-$ (m/z 1745) produit par détachement d'un électron a été également détecté. En principe, l'ensemble des ions fragments présents sur le spectre EDD est produit par la décomposition consécutive de cet ion radical. En particulier, les ions fragments à nombre impair d'électrons sont probablement obtenus par décompositions consécutives de l'ion $[d(T_2AT_3)-2H]^-$. L'attribution de ces pics est ambiguë, car ces ions peuvent correspondre soit à la série d'ions z_j^- , soit à la série a_i^- (pour $i = j = 4$ et 5). De plus, deux ions produits liés à la perte inattendue de la thymine (i.e., $[a_4-T]^-$ (m/z 994) et $[a_5-T]^-$ (m/z 1298) (ou $[z_5-T]^-$) ont été détectés. Ces derniers et les ions fragments w_4^- et w_5^- n'ayant pas été observés dans le spectre SORI-CID, sont probablement produits à partir de la dissociation d'anions à nombre impair d'électrons, (*Figure 1c*). Ces ions produits pourraient être spécifique au mode d'activation EDD.

Le spectre EDD-EID d'ion doublement chargé de $d(T_2CT_3)$ (*Figure 3b*) montre des ions fragments semblables à ceux observés pour $d(T_2AT_3)$. Il en est de même pour les ions produits impliquant la perte de base thymine, $[z_j^-T]^-/[a_i^-T]^-$. Le rapport d'abondance entre les ions fragments w_3^- et w_5^{2-} est similaires à ceux observés dans le spectre SORI-CID de l'ion $[M-2H]^{2-}$ pour $d(T_2CT_3)$ (*Figure 1d*). L'abondance relative de l'ion $[a_3-C_3]^-$ (m/z 705) et celle de son ion complémentaire w_3^- (m/z 929) sont légèrement inférieurs à celui de l'ion $[a_3-A_3]^-$ (m/z 705) et w_3^- (m/z 929) du spectre EDD-EID de $[d(T_2AT_3)-2H]^{2-}$ (*Figure 3a et b*). En principe, les ions fragments w_3^- ainsi que les ions w_4^- et w_5^- , doivent être produits à partir de la décomposition consécutive de l'ion $[M-2H]^-$ (anion à nombre impair d'électrons), cependant, par la formation de l'ion doublement chargée w_5^{2-} , une autre voie de décomposition doit être considérée. Il convient de souligner que tous les ions formés dans la source ont été éjectés par une étape de double isolement pour l'ion précurseur, une première étape d'isolement s'opérant dans le filtre quadripôle et une seconde, plus précise dans la cellule ICR. Ainsi, les ions doublement chargés ($[M-2H-B]^{2-}$ et w_5^{2-}) doivent être formés pendant l'étape de bombardement d'électrons. Et donc, ils sont probablement produits directement à partir de l'ion précurseur $[M-2H]^{2-}$ par des processus EID (29) et non par dissociation d'ions à charge réduite.

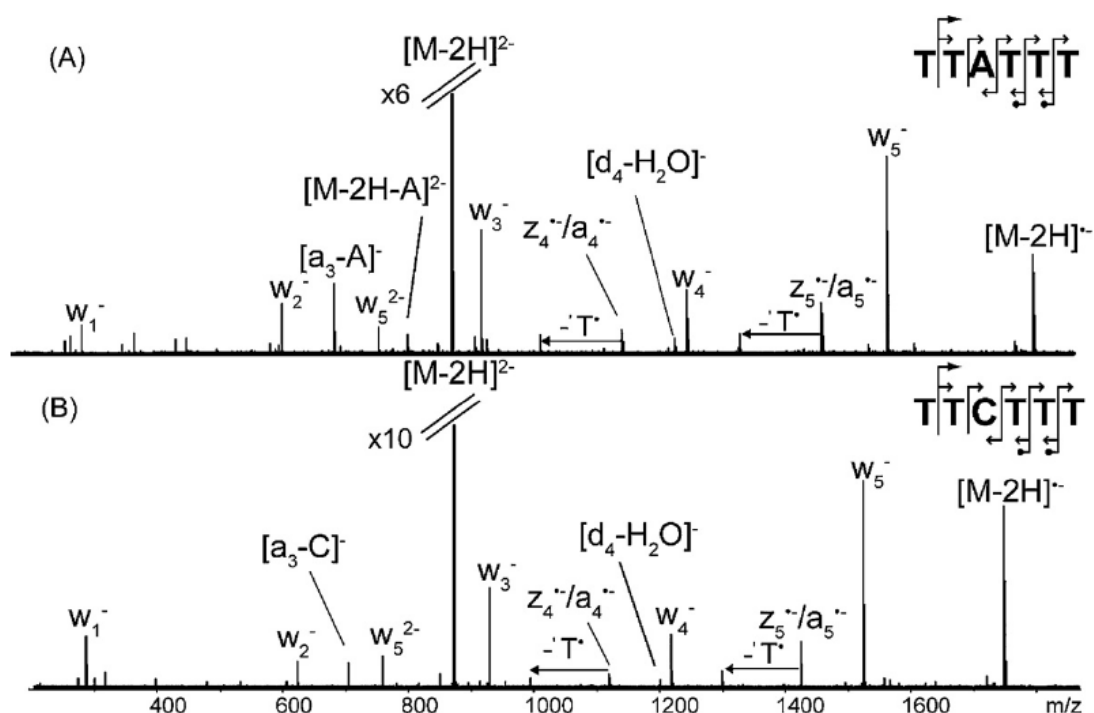


Figure 3. Spectres EDD de $[M-2H]^{2-}$ (a) m/z 884 pour $d(T_2AT_3)$ et (b) m/z 872 pour $d(T_2CT_3)$ ADN. La flèche associée à un point (•) indique la formation d'un ion radical.

Table 1. Ions fragments observés dans le spectre EDD-EID of $[T_2AT_3]^{2-}$

attribution	théorique (m/z)	observé (m/z)	erreur (ppm)
w_1^-	321.04878	321.04776	-3.2
w_2^-	625.09482	625.09290	-3.1
w_5^{2-}	772.61888	772.61622	-3.4
$[a_3-AH]^-$	705.12158	705.11938	-3.1
$[M-2H-AH]^{2-}$	817.13148	817.12847	-3.7
$[M-2H]^{2-}$	884.65873	884.65592	-3.2
w_3^-	929.14086	929.13927	-1.7
$[a_4-T_4]^-$	1018.17918	1018.17725	-1.9
z_4^-/a_4^-	1143.21428	1143.21287	-1.2
$[d_4-H_2O]^-$	1224.18612	1224.18591	-0.2
w_4^-	1242.19848	1242.19766	-0.7
$[a_5-T_5]^-$	1322.22522	1322.22653	1.0
z_5^-/a_5^-	1447.25977	1447.26154	1.2
w_5^-	1546.23723	1546.24072	2.3
$[M-2H]^-$	1769.31692	1769.31392	-1.7

1.2.4. Expériences de double résonance et MS³

Afin d'obtenir plus d'informations sur les différents processus impliqués par l'activation EDD/EID et pour élucider l'origine des ions fragments doublements chargés, des expériences de double résonance (*Figure 4*) ont été réalisées. Dans ce cas, l'anion à nombre impair d'électrons $[M-2H]^-$ est continuellement éjecté en utilisant une excitation résonante pendant les expériences d'activation EDD-EID. Avec une amplitude d'excitation résonante suffisamment élevée, l'ion $[M-2H]^-$ peut être éjecté de la cellule ICR avant de subir des dissociations consécutives. En conséquence, seuls les ions fragments générés à partir de la décomposition directe de l'ion précurseur doublement chargés $[M-2H]^{2-}$ sont détectés dans cette expérience de double résonance. Toutefois, si l'ion de charge réduite $[M-2H]^-$ se dissocie avec une constante de vitesse très élevée, alors ses ions fragments peuvent être tout de même produits avant son éjection complète et pourront être détectés sur le spectre de double résonance sous EDD. Cette expérience de double résonance a été utilisée pour l'étude de constantes de vitesse de dissociation d'ions fragments intermédiaires (30-33) et également appliquée pour étudier la dissociation de peptides en mode ECD (34). Par ailleurs, cette approche, qui peut donner une idée sur l'origine des ions fragments, est très utile pour étudier les mécanismes de dissociation (32, 35-39).

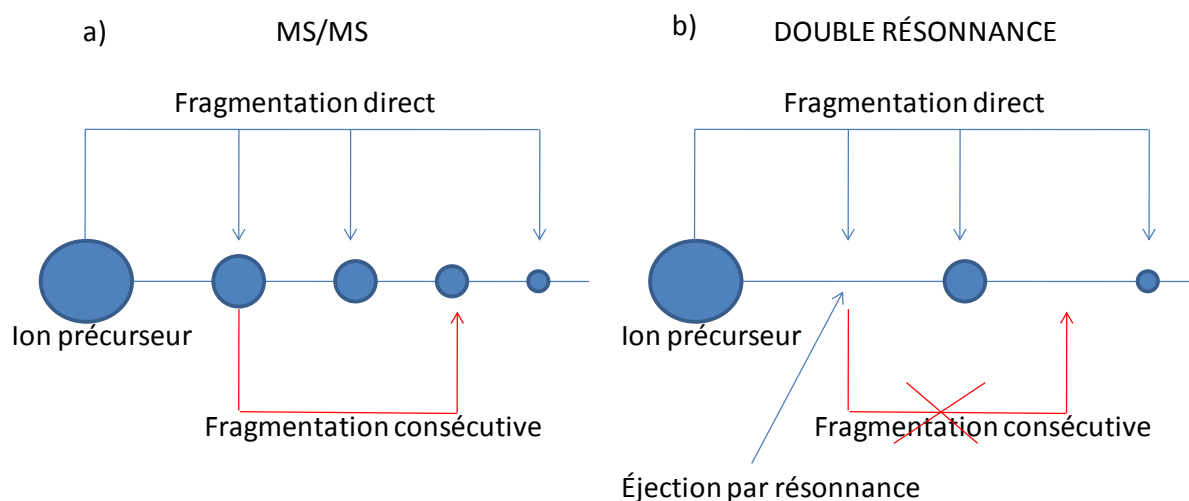


Figure 4 : a) Spectre MS² b) spectre de double résonance de l'ion $[M-2H]^-$ où l'ion fragment est éjecté continuellement pendant l'activation du précurseur, par conséquent les ions fragments consécutifs issus de ce dernier ne peuvent pas être détectés.

Récemment Hakansson *et al.* ont utilisé cette approche pour l'étude des mécanismes de dissociation d'oligonucléotides déprotonés [24]. Les spectres de double résonance de $[M-2H]^-$ générés par détachement d'électrons de $[M-2H]^{2-}$ sous activation EDD pour $d(T_2AT_3)$ et $d(T_2CT_3)$ (Figure 5a et 5c) présentent des ions fragments semblables à ceux observés dans les spectres SORI-CID (Figure 1c et d), sauf l'ion w_4^- qui n'était pas formé sous CID de l'ion doublement déprotoné de $d(T_2AT_3)$ et $d(T_2CT_3)$. Ici la formation de l'ion w_4^- peut être due à une décomposition avec une grande constante de vitesse de l'ion intermédiaire $[M-2H]^-$ qui est donc produit bien avant l'éjection de $[M-2H]^{2-}$. Les ions fragments doublement chargés $[M-2H-B]^{2-}$ et w_5^{2-} détectés dans les spectres EDD-EID (Figure 3a et b) sont préservés dans le spectre de double résonance alors que les ions produits d'une part a_4^-/z_4^- et a_5^-/z_5^- et ainsi que les ions $[a_4-T]^-$ et $[a_5-T]^-/[z_5-T]^-$ ont disparu des spectres double résonance. Cela signifie que les constantes de vitesse de formation de ces ions fragments sont suffisamment faibles pour que ceux-ci ne puissent pas être produits avant l'éjection de l'ion intermédiaire de charge réduite. Des expériences MS^3 peuvent également donner des informations complémentaires sur ces ions fragments et confirmer nos hypothèses précédentes. L'anion à nombre impair d'électrons $[M-2H]^-$ produit par détachement de l'ion $[M-2H]^{2-}$ a été activé par SORI-CID (Figure 5 b et d). La majorité des ions produits simplement chargés détectés dans les spectres MS^3 (EDD-EID/SORI-CID) de $[M-2H]^-$ étaient aussi présents dans les spectres EDD-EID des ions précurseurs $[d(T_2AT_3)-2H]^{2-}$ et $[d(T_2CT_3)-2H]^{2-}$ (Figure 3a et b). Cependant, l'ion fragment $[a_3-A_3]^-$ (m/z 705) produit à partir de la séquence $d(T_2AT_3)$ est absent bien que l'ion produit correspondant $[a_3-C_3]^-$ (m/z 705) de $d(T_2CT_3)$ soit détecté en faible abondance. Il faut noter que l'abondance relative de la série d'ions w_j^- est fortement réduite par rapport à celle des couples d'ions à nombre impair d'électrons a_i^-/z_n^- . L'abondance des ions fragments w_j^- augmente avec la taille des ions produits. Enfin, comme attendu, les ions produits doublements chargés ne sont pas détectés dans les spectres MS^3 (EDD-EID/SORI-CID). Ces expériences ont également suggéré que les ions fragments $[a_i-T]^-/[z_n-T]^-$ sont susceptibles d'être produits par une dissociation radicalaire et non pas directement à partir de l'ion précurseur $[M-2H]^{2-}$. En fait, les ions radicalaux a_i^-/z_n^- perdent un radical thymine pour donner l'ion fragment $[a_i^-/z_n^--(T-H)]^-$ (équivalent à $[a_i/z_n-(T-H)]^-$).

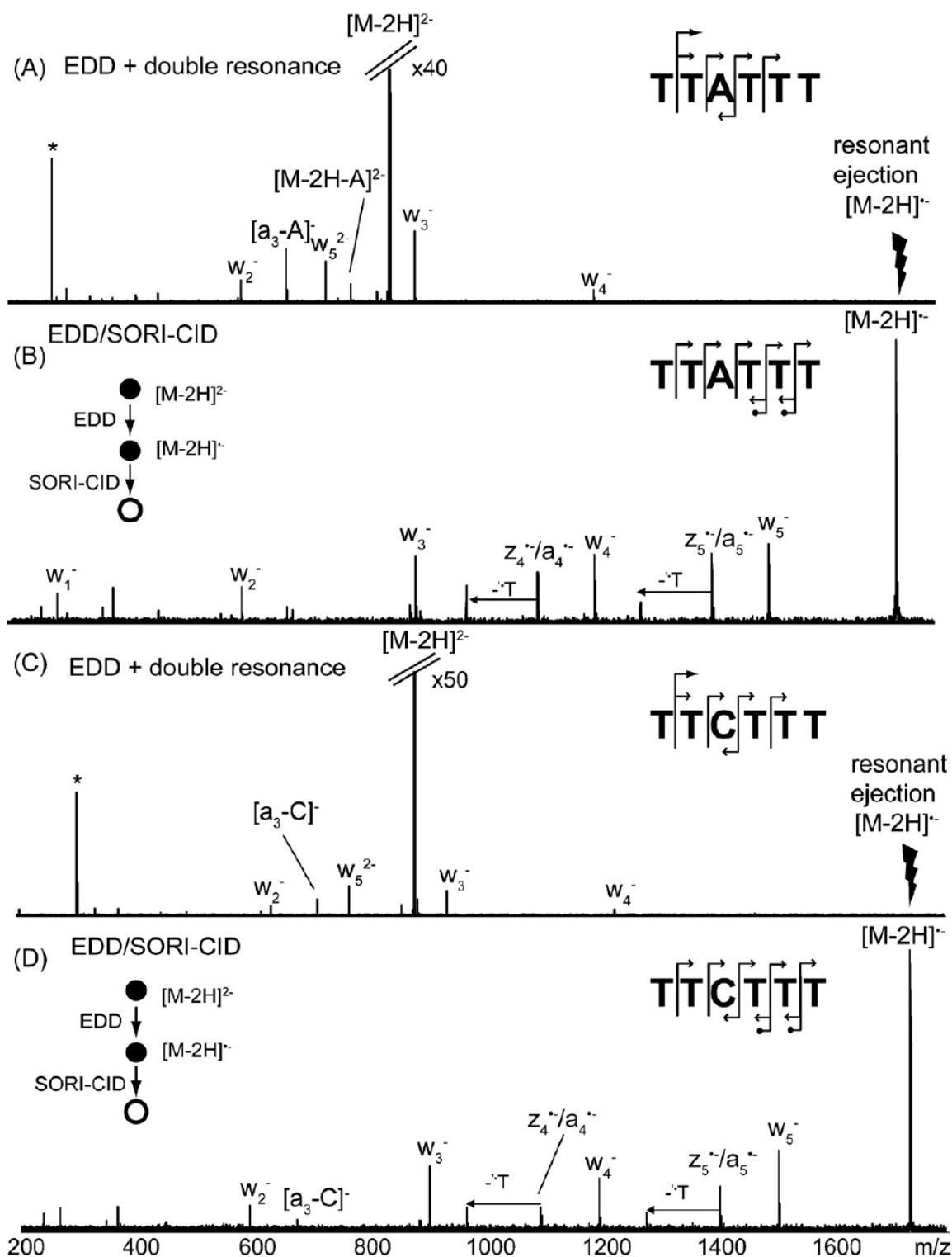


Figure 5. Spectres de double résonance (avec une énergie d'éjection de 19 V) de l'ion impair d'électrons $[M-2H]^-$ obtenu par des processus EDD à partir de (a) $d(T_2AT_3)$ m/z 894 et (c) $d(T_2CT_3)$ m/z 872 et expérience MS^3 EDD/SORI-CID ($[M-2H]^-$) de (b) $d(T_2AT_3)$ et (d) $d(T_2CT_3)$.

1.2.5. Spectre EDD-EID d'ADN 6-mer déprotonés

Des brins d'ADN riches en thymine en association avec des peptides ont été étudié avec succès par notre groupe (40). Dans ce travail, nous voulions étendre nos connaissances sur la dissociation d'autres séquences d'ADN. Puisque les spectres EDD-EID de $d(T_2AT_3)$ et $d(T_2CT_3)$ (Figure 3) présentent des ions fragments semblables, nous avons effectué les expériences EDD-EID sur des systèmes du type $d(GT_5)$ et $d(G_3T_3)$. Ces séquences d'ADN ont été choisies en raison de la présence soit d'une, soit de trois guanines qui étaient censées améliorer l'efficacité du processus EDD. Les séquences $d(T_6)$ et $d(GCATGC)$ sont également choisies afin de comparer nos résultats avec ceux antérieurs obtenus par Hakansson *et al.* [23]. Contrairement aux exemples précédents (Figure 3 a et b), les ions à nombre impair d'électrons a_5^- et z_5^- ainsi que la série d'ions w_j^- ont été détectés, indépendamment dans le spectre EDD du $[d(GT_5)-2H]^{2-}$ (Figure 6 a). Une série complète d'ions w_j^- a été détectée alors qu'un seul ion de la série d_m^- l'est (d_5^- , m/z 1562). En outre, les ions à nombre impair d'électrons a_5^- (m/z 1463) et z_5^- (m/z 1438) sont accompagnés par leurs ions satellites en raison de la perte de la thymine radicalaire (par exemple, $[a_5-(T-H)]^-$ (m/z 1338) et $[z_5-(T-H)]^-$ (m/z 1313)). L'ion w_5^- (m/z 1357) ainsi que l'ion $[w_5-(T-H)]^-$ (m/z 1411) ont été également observés. La perte de guanine neutre (G) à partir de l'ion précurseur $[M-2H]^{2-}$ (m/z 892) ainsi que l'ion de charge réduite $[M-2H]^-$ (m/z 1785) ont été observés mais la perte de la guanine radicalaire ($[G-H]^\bullet$) n'a pas été détectée.

Le spectre EDD-EID de $[d(G_3T_3)-2H]^{2-}$ (Figure 6.b) montre des ions fragments similaires à ceux détectés sur le spectre EDD-EID de $[d(GT_5)-2H]^{2-}$. La différence entre ces spectres EDD-EID est la présence spécifique d'ion fragment $[a_i-B_i]^-$ (i.e., $[a_2-G_2]^-$ m/z 426 et $[a_3-G_3]^-$ m/z 755) à partir de $[d(G_3T_3)-2H]^{2-}$. La perte de la guanine radicalaire a été détectée à partir de l'ion fragment à nombre impair d'électrons z_5^- ainsi que la perte de thymine radicalaire à partir de z_5^- dans le spectre EDD-EID de $[d(GT_5)-2H]^{2-}$. Pour la séquence $d(T_6)$, certaines ambiguïtés sont apparues car les ions w_j^- ont les mêmes rapports m/z que des ions d_i^- . Le spectre EDD-EID de la séquence $[d(T_6)-2H]^{2-}$ (Figure 6c) montre la série complète d'ions w_j^-/d_i^- . En plus des ions fragments radicalaires a_4^-/z_4^- (m/z 1134) et a_5^-/z_5^- (m/z 1438), des ions satellites produits par la perte consécutive de thymine radicalaire ont été détectés.

Enfin, dans le spectre EDD-EID de $d(GCATGC)$ (Figure 6d), une série incomplète d'ions $[a_i-B_i]^-$ est détecté comme dans le spectre SORI-CID (Figure 2f). Seul l'ion z_5^- (m/z 1442) à nombre impair d'électrons (sans son ion satellite $[z_5-G_5]^-$) est détecté. En général,

tous les spectres EDD-EID de $[M-2H]^{2-}$ ont montré des ions fragments similaires (par exemple, la série d'ions simplement chargés w_n^- et l'ion doublement chargés w_5^{2-}). La thymine radicalaire est libéré à partir des ions à nombre impair d'électrons, a_i^- ou z_j^- .

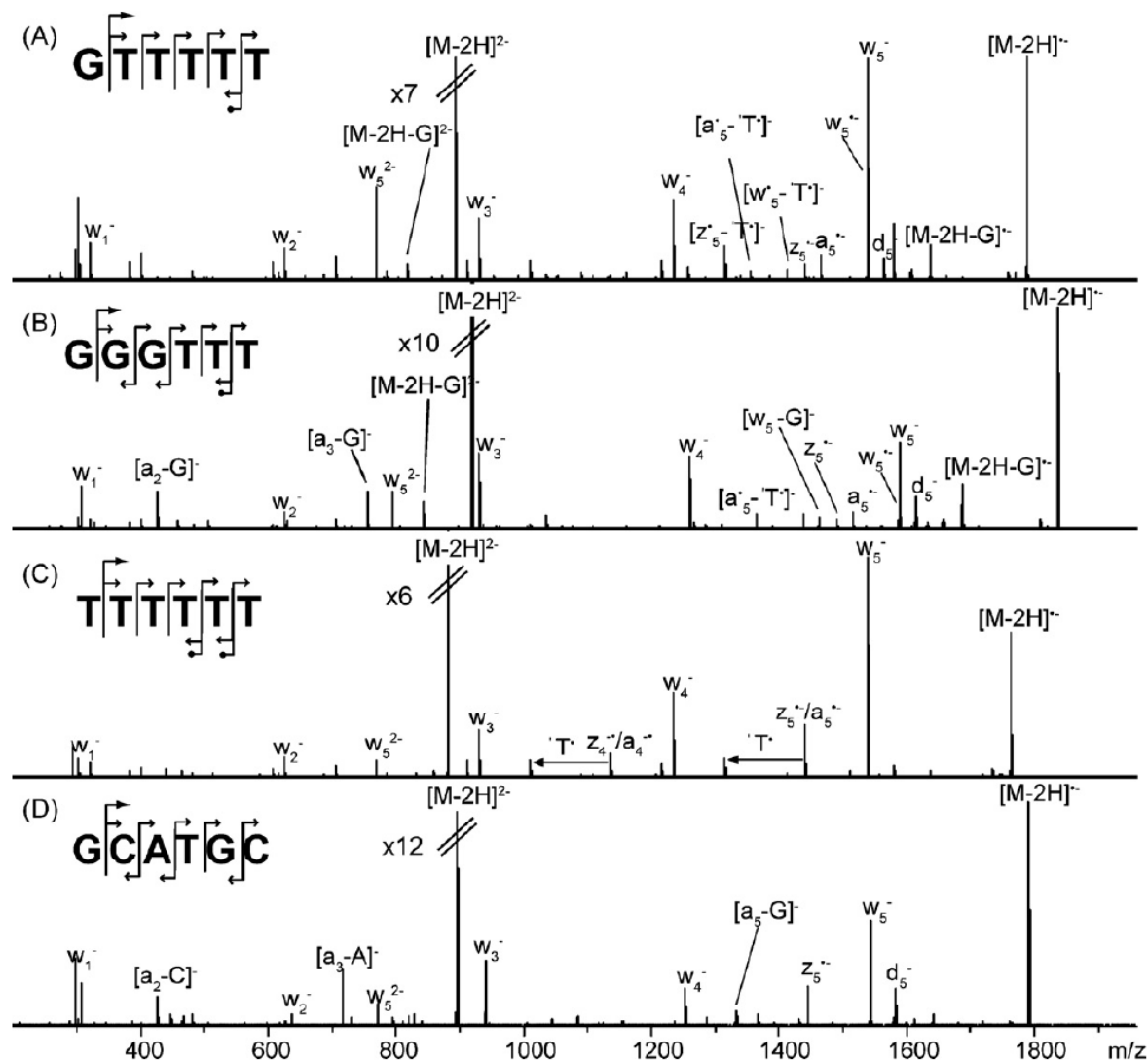


Figure 6. Spectres EDD de l'ADN (a) $d(GT_5)$ m/z 892, (b) $d(G_3T_3)$ (m/z 917), (c) dT_6 (m/z 880) et (d) $d(GCATGC)$ (m/z 894).

1.2.6. Spectres EDD d'ADN de plus grande taille (12-mer multidéprotonés)

La Figure 7 montre le spectre EDD de l'ion $[M-4H]^{4-}$ pour l'ADN 12-mer ($T_4(GC)_2A_4$) qui est auto-complémentaire. La perte d'un ou deux électrons mène à des anions radicalaires. La majorité des ions produits est de la série simplement chargé w_j^- , mais cette série n'est pas complète, un seul ion fragment triplement chargé w_{11}^{3-} est détecté avec une forte abondance. Cet ion fragment présente un comportement similaire à celui de l'ion w_5^- présent dans les spectres EDD des ADN 6-mer. Aucun ion fragment de la série $[a_i-B_i]$ n'est détecté. Au contraire des spectres EDD d'oligonucléotide 6-mers, le spectre EDD de l'ADN 12-mer multidéprotoné présente très peu d'ions fragments. Aucune série complète d'ions n'est détectée. L'ion de charge réduite est toutefois détecté avec une forte abondance relative. Ce comportement peut être expliqué par le fait que les liaisons faibles, comme des liaisons non covalentes, peuvent être préservées dans ce mode d'activation. De plus, cet ADN est auto-complémentaire et peut conduire à la conformation de type *Hairpin*. Dans ce cas, même si les liaisons covalentes sont rompues après le détachement d'électrons, le système est toujours associé par des liaisons non-covalentes. En outre, les deux ions radicaux peuvent se recombiner pour former un ion à nombre pair électron (41).

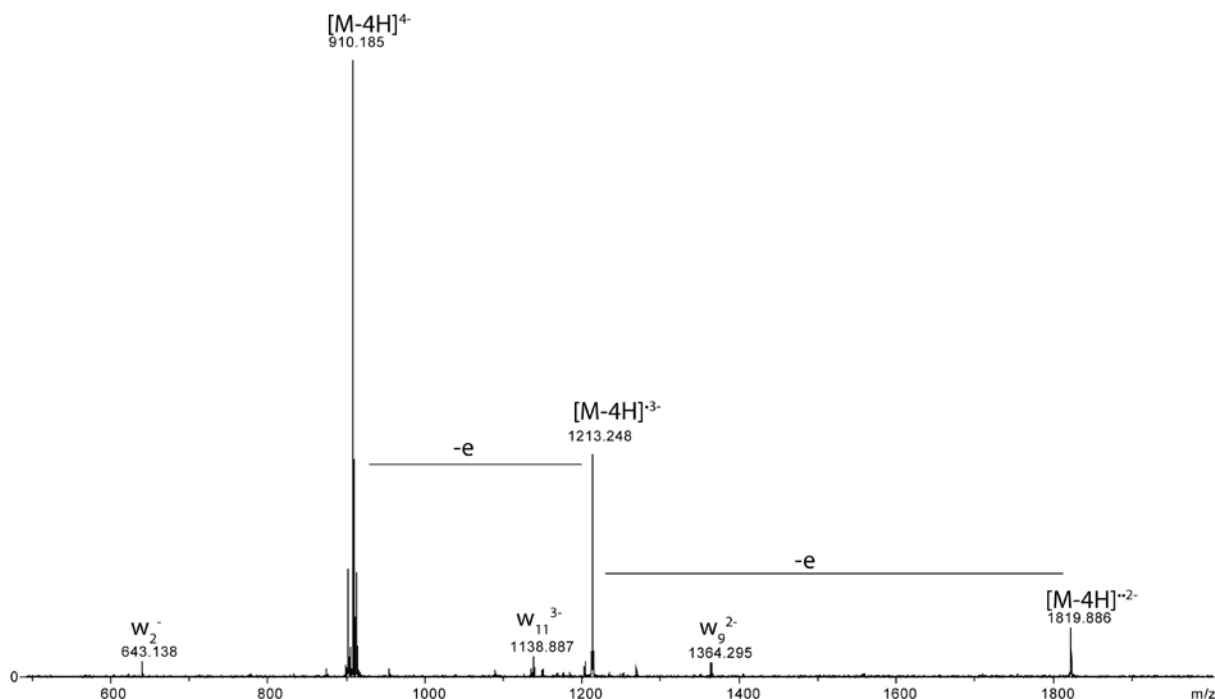


Figure 7. Spectre EDD d'oligonucléotide 12 mer $T_4(GC)_2A_4$ $[M-4H]^{4-}$ m/z 910,18.

1.2.7. Comparaison des spectres EDD/SORI-CID et SORI-CID d'ADN 12mer multidéprotoné

Le spectre EDD de l'oligonucléotide 12-mer (*Figure 7*) ne présente pas assez d'ions fragments, mais l'abondance des ions de charge réduite est relativement élevée. En comparant les résultats obtenus, par activation EDD, à partir des ions précurseurs $[M-4H]^{4-}$ (12-mer) et $[M-2H]^{2-}$ (6-mer). Nos résultats ont montré que l'efficacité de détachement d'électrons augmente lorsque l'état de charge de l'ion précurseur augmente. Cependant, l'efficacité de fragmentation n'augmente pas significativement avec l'état de charge. Afin d'améliorer l'efficacité de fragmentation, l'ion de charge réduite $[M-4H]^{3-}$ est isolé et ensuite activé par SORI-CID (*Figure 8b*). Des fragmentations importantes ont été obtenues. Les ruptures produites sous SORI-CID sont davantage « nucléobase » dépendant que dans le spectre MS^3 (EDD/SORI-CID) (*Figure 8a*). En particulier, dans le spectre CID, les informations de séquence sont absentes au niveau de la partie riche en thymine. En SORI-CID, seulement deux ions fragments, d_2^- et d_4^- , sont détectés avec une faible abondance pour la série d_n . Les ions produits de la série z_n ne sont pas détectés, mais les ions de la série $[a_i-B_i]^{n-}$ sont beaucoup plus abondants que dans le spectre EDD/SORI-CID.

Le spectre EDD/SORI-CID montre plus d'ions fragments par rapport au spectre SORI-CID et donne une série complète d'ions w_j . L'ion fragment w_{11}^{3-} a été observé avec une très forte abondance relative, alors que dans le spectre SORI-CID, cet ion n'est pas détecté et aucune série d'ion complète n'est produite. En plus de la série d'ion w_j^{m-} , le spectre EDD/SORI-CID présente 4 séries incomplètes : d_i^{n-} , a_i^{n-} , $[a_i-B]^{n-}$, z_j^{m-} . Il faut noter que dans le spectre EDD/SORI-CID les ions radicalaires sont de la série a_n et z_n , et sont observés dans des hauts rapports m/z . La série d'ions radicalaires commence à partir de $a_6^{•2-}$ pour la série a_n , et pour la série de z_n , deux ions fragments $z_{10}^{•2-}$ (m/z 1507), $z_{11}^{•2-}$ (m/z 1604) sont observés. Toutefois, la perte de base à partir de ces ions n'est pas observée. Seul l'ion $[a_7-G_7]^{2-}$ est détecté, celui-ci peut être obtenu à partir de l'ion $a_7^{•2-}$ (m/z 956), mais il peut aussi être formé indépendamment de ce dernier, par les voies de fragmentation conventionnelles parce que la base guanine est facilement protonée. Dans ce cas, cette rupture est favorisée par un mécanisme classique (impliquant une excitation vibrationnelle), ce qui est en accord avec le fait que cet ion possède une intensité importante dans le spectre SORI-CID. On observe aussi la série d'ion d_n qui n'est pas radicalaire, sauf l'ion fragment $d_{11}^{•3-}$. La perte des bases neutres guanine, cytosine et adénine à partir de l'ion précurseur est observée dans le spectre

Chapitre III : Résultats et discussion

EDD/SORI-CID, tandis que dans le spectre SORI-CID la perte de la cytosine n'est pas observée sans raison précise. Pour avoir une vision plus claire des différents fragments obtenus, les ions observés sur les spectres sont reportés sur la séquence (Schéma 1). Il est évident que la séquence est incomplète dans le spectre SORI-CID en particulier dans la région riche en thymine (-TTTT-), tandis que le spectre EDD/SORI-CID permet un séquençage complet.

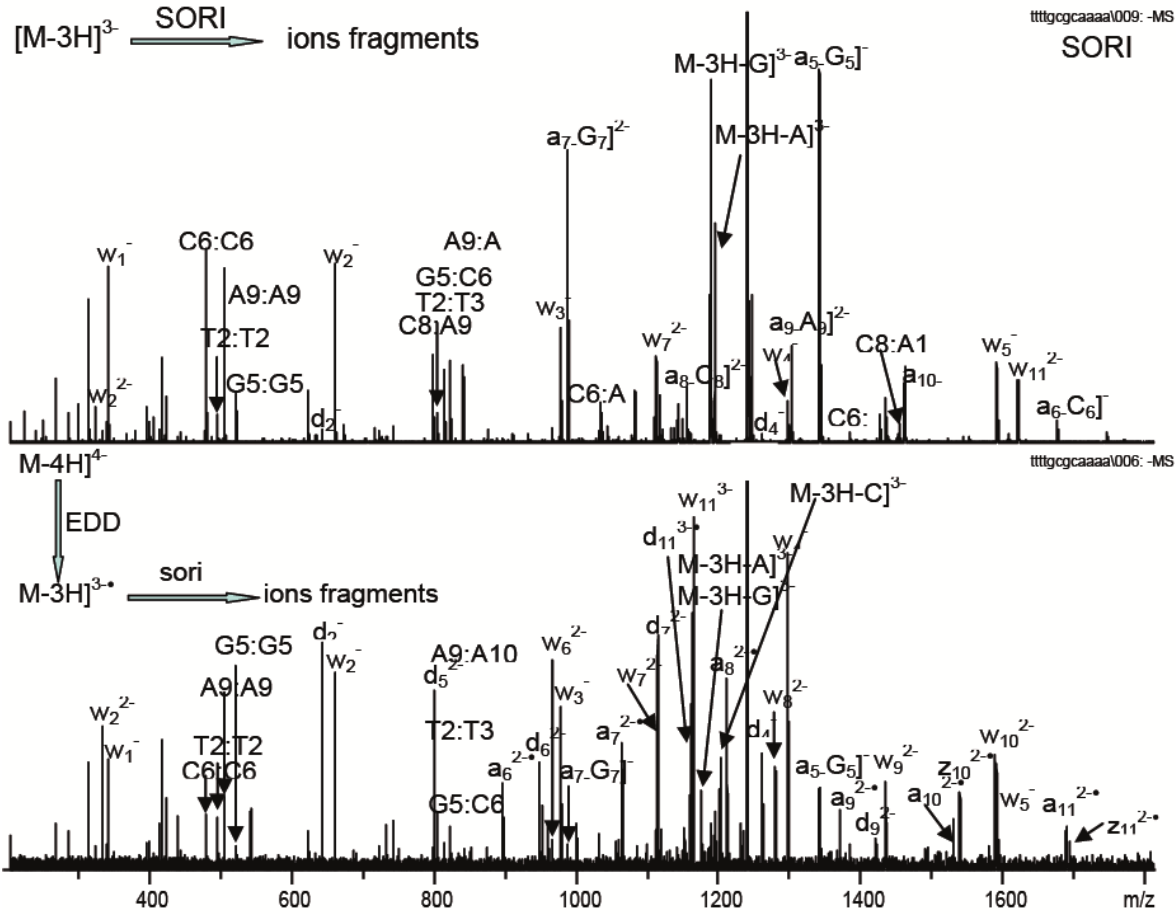


Figure 8. (a) Spectre SORI-CID de $[M-3H]^{3-}$ et (b) spectre EDD/SORI-CID de $[M-4H]^{4-}$ de l'ADN $T_4(GC)_2A_4$.



Schéma 1. Fragmentations observées pour l'ADN multidéprotoné par SORI-CID (en haut) et par EDD/SORI-CID (en bas)

1.3. Discussion

L'ion doublement chargé w_5^{2-} a été détecté dans les spectres SORI-CID pour toutes les séquences d'ADN 6-mers étudiées sans formation d'ion simplement chargé w_5^- et de son ion complémentaire. Ce comportement peut être lié à la position initiale des charges qui sont localisées dans les groupes phosphate (Schéma 2). Le fragment $[a_1-B_1]^-$ ne présente aucun groupement phosphate et devrait donc être perdu en tant que neutre après dissociation des complexes de type ion-dipôle (42,43). Le spectre SORI-CID de l'ion $[dT_6-2H]^{2-}$ (m/z 880) produit une série d'ions $[a_i-T_i]^-$ ($i = 2-5$) impliquant une perte de base thymine. Cette perte est difficile à rationaliser par un chemin réactionnel classique. En effet, Gross *et al.* (7) considèrent la formation d'un intermédiaire zwitterion formé par un transfert intramoléculaire de proton à partir du phosphate en position 5' concerté avec la perte de la base. Il a été démontré que la substitution du OH des diesters par des méthyl-phosphates en position i ($i = 1-4$) conduit à une diminution de l'abondance des ions $[a_{i+1}-B_{i+1}]^-$ ce qui est cohérent avec cette hypothèse (10). Contrairement aux spectres SORI-CID des ion $[M-2H]^{2-}$, leurs spectres EDD-EID montrent la production de l'ion simplement chargé w_5^- , cet ion étant probablement produit selon une voie de fragmentation de type radicalaire. Dans le spectre SORI-CID des ions $[d(T_2AT_3)-2H]^{2-}$ et $[d(T_2CT_3)-2H]^{2-}$ et dans les spectres de double résonance des ions de charge réduite, l'abondance relative de l'ion $[a_3-A_3]^-$ est plus élevée que celle de l'ion $[a_3-C_3]^-$. Ce comportement peut être expliqué par la formation de zwitterions (44-46) qui pourraient être produits au cours de l'étape de désolvatation. La protonation de dA est favorisée parce que son affinité protonique qui est légèrement supérieure à celle de dC ($AP_{dG} > AP_{dA} > AP_{dC} \gg AP_{dT}$ (47)). La Figure 1f montre le spectre SORI-CID de l'ion $[d(GCATGC)-2H]^{2-}$ (m/z 894) dans lequel l'abondance de l'ion w_1^- (m/z 306) est fortement renforcée par rapport à celle de son ion complémentaire (*i.e.*, $[a_5-G]^-$, m/z 1332). En fait, l'ion w_1^- peut être produit par la décomposition consécutive de nombreux autres ions fragments tandis que l'ion $[a_5-G]^-$ peut subir des dissociations consécutives et produire des ions fragments internes ($[C2:C2]^-$ (m/z 466), $[C2:T4]^-$ (m/z 1083) et $[T4:T4]^-$ (m/z 481)). Cette hypothèse est confirmée par les expériences IRMPD sur l'ion $[GCATGC-2H]^{2-}$ (m/z 894) effectuées sous différentes durées d'irradiation laser (0,04 s, 0,06 s, 0,08 s et 0,1 s pour chaque expérience). L'ion fragment $[a_5-G_5]^-$ n'est pas détecté, alors que l'abondance de l'ion w_1^- a considérablement augmentée avec le temps d'irradiation laser, tandis que celle des autres ions produits a diminué. Cela montre que l'ion w_1^- a plusieurs origines et est donc renforcé par décompositions consécutives.

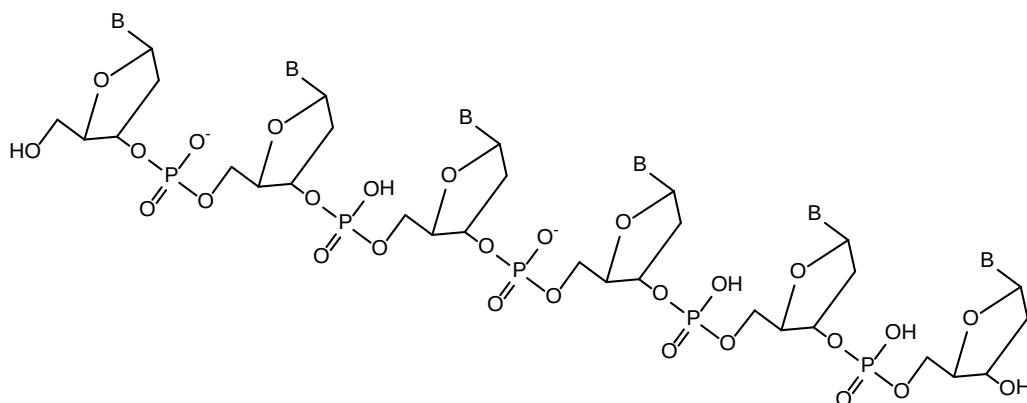


Schéma 2. Séquence d'ADN 6-mer. La charge se trouve sur un ou plusieurs groupes phosphate.

Le spectre double résonance (EDD-EID de $[T_2AT_3-2H]^{2-}$, m/z 884 avec éjection de $[T_2AT_3-2H]^-$ m/z 1769) (Figure 3a) et le spectre en mode MS^3 (EDD-EID de $[d(T_2AT_3)-2H]^{2-}$ suivi par SORI-CID de l'ion intermédiaire $[d(T_2AT_3)-2H]^+$) (Figure 3c) ont montré que l'ion $[a_3-A_3]^-$ est produit à partir de l'ion $[M-2H]^{2-}$ par un chemin passant probablement par la formation de l'ion $[M-2H-A]^{2-}$ comme un intermédiaire. Les ions produits doublement chargés n'ont pas été détectés dans le spectre d'activation en mode MS^3 (EDD-EID/SORI-CID) des ions $[M-2H]^+$ produits à partir des ions $[d(T_2AT_3)-2H]^{2-}$ et $[d(T_2CT_3)-2H]^{2-}$, alors qu'ils étaient présents dans le spectre de double résonance de ces mêmes oligonucléotides (Figure 3a et c). Ce résultat confirme que les ions doublements chargés détectés dans les spectre EDD-EID (Figure 2a et b) sont produits directement à partir de l'ion précurseur $[M-2H]^{2-}$ par des processus EID avant le détachement d'électrons (48). En fait, l'EID se produit lorsque l'énergie d'activation est inférieure à l'énergie de détachement d'un électron mais est suffisamment élevée pour promouvoir une excitation électronique. En utilisant cette méthode Lioe *et al.* ont comparé le mode EID avec le mode CID de faible énergie sur des acides aminés protonés. Ils ont considéré que la fragmentation en EID implique en même temps des excitations électroniques et vibrationnelles (49). Cette méthode a été également appliquée pour fragmenter des saccharides glycosaminoglycanes monochargés (50).

Les ions fragments à nombres impairs d'électrons qui sont isomères en séquence ($i = j = 4$) (a_4^-/z_4^- et a_5^-/z_5^-) avec leurs ions analogues sont toujours présents dans les spectres de double résonance des ions de charge réduite produits à partir des ions $[d(T_2AT_3)-2H]^{2-}$ et $[d(T_2CT_3)-2H]^{2-}$. Ces ions ne sont pas détectés dans les spectres MS^3 (EDD-EID/SORI-CID) des ions $[d(T_2AT_3)-2H]^{2-}$ et $[d(T_2CT_3)-2H]^{2-}$, ainsi que les ions satellites $[a_4^--T]^-$ et $[a_5^--T]^-$.

$/[z_5^{\bullet}-T^{\bullet}]^{\bullet}$ (équivalent aux ions $[a_4-T_4]^{\bullet}$ et $[a_5-T_5]^{\bullet}/[z_5-T_5]^{\bullet}$). Ceci est cohérent avec l'hypothèse que $[a_4^{\bullet}-T^{\bullet}]^{\bullet}$ et $[z_5^{\bullet}-T^{\bullet}]^{\bullet}/[z_5^{\bullet}-T^{\bullet}]^{\bullet}$ sont produits à partir des décompositions consécutives des ions $a_4^{\bullet}$ et $a_5^{\bullet}/z_5^{\bullet}$ par perte radicalaire d'une base thymine ($T^{\bullet}$).

Les ions simplement chargés w_5^- ont disparu des spectres de double résonance des ions de charge réduite produits à partir des ions $[d(T_2AT_3)-2H]^{2-}$ et $[d(T_2CT_3)-2H]^{2-}$ mais les ions w_4^- (m/z 1242 et m/z 1218) sont encore présents. Néanmoins, dans les spectres SORI-CID des ions $[d(T_2AT_3)-2H]^{2-}$ et $[d(T_2CT_3)-2H]^{2-}$, ces ions w_4^- ne sont pas détectés. Notre hypothèse est que ces ions w_4^- ont été produits à partir d'un processus de dissociation de grande constante de vitesse ce qui implique qu'ils sont produits avant que l'éjection des ions à charge réduite $[M-2H]^{\bullet}$ ne soit complète.

Pour confirmer notre hypothèse, des expériences de double résonance de l'ion $[d(T_2CT_3)-2H]^{\bullet}$ avec différentes amplitudes d'éjection ont été réalisées. Une telle évolution en fonction de l'amplitude de la double résonance n'a été effectuée que pour les peptides. Cette expérience permet l'obtention d'informations sur la cinétique des différents processus de dissociations [51]. Lorsque l'amplitude d'éjection des ions est augmentée jusqu'à $0.75 V_{p-p}$, l'ion de charge réduite $[M-2H]^{\bullet}$ a disparu (*Figure 9*), mais l'abondance des ions fragments reste inchangée. En fait, si la constante de vitesse de dissociation (k_d) est plus grande que celle de l'éjection (k_e), certains ions fragments peuvent être observés en dépit de l'éjection de l'ion de charge réduite intermédiaire. L'ion radical $a^{\bullet}$ et ses séries d'ions consécutifs $[a_i^{\bullet}-T^{\bullet}]^{\bullet}$ ont disparu à partir $4 V_{p-p}$ (*Figure 9*). Enfin, l'ion w_5^- a disparu à partir de $19 V_{p-p}$, alors que l'ion w_4^- était encore présent.

Il faut noter que, à $19 V_{p-p}$, l'ion fragment w_5^- (m/z 1546) a probablement été éjecté directement par excitation hors résonance (comme en SORI-CID avec une grande amplitude) parce que sa fréquence est relativement proche de celle de l'ion de charge réduite. Dans ce cas cet ion peut être produit par les mêmes voies de fragmentation discutées pour l'ion w_4^- .

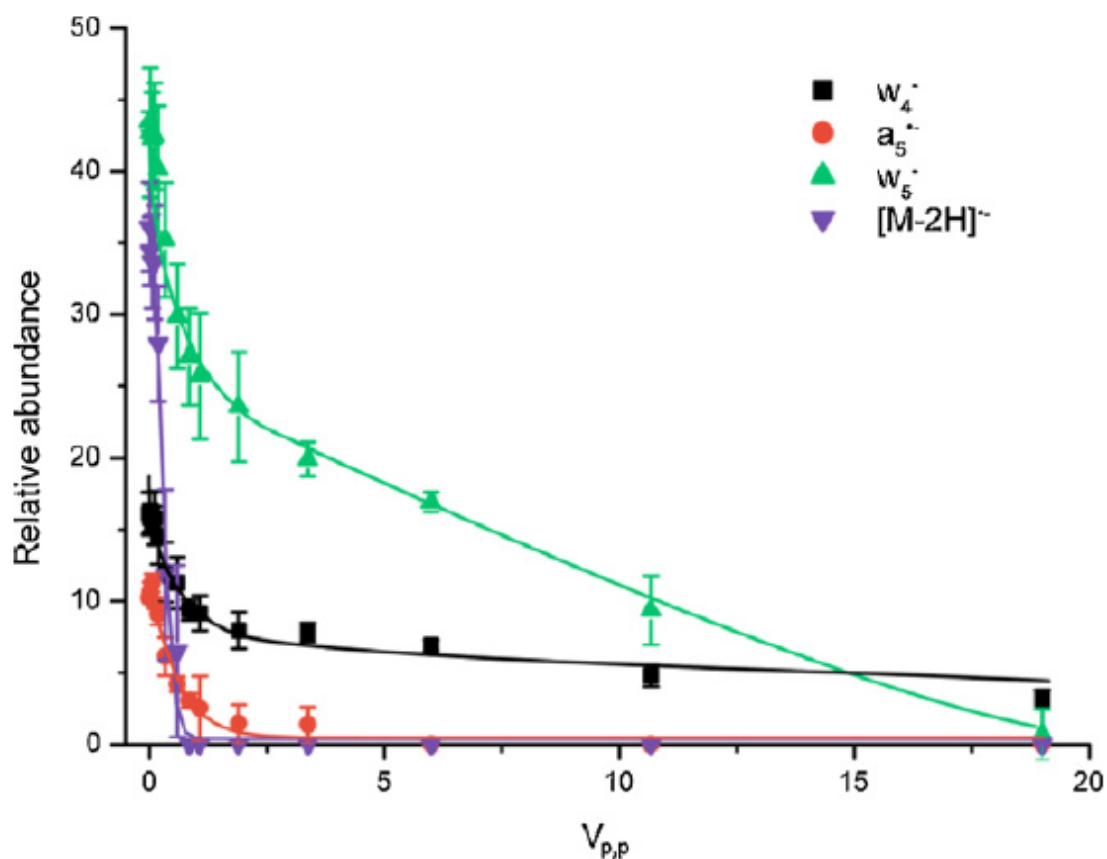


Figure 9. Courbes d'abondance relative des ions fragments en fonction de l'amplitude d'éjection des ions $[M-2H]^-$ lors des expériences de double résonance.

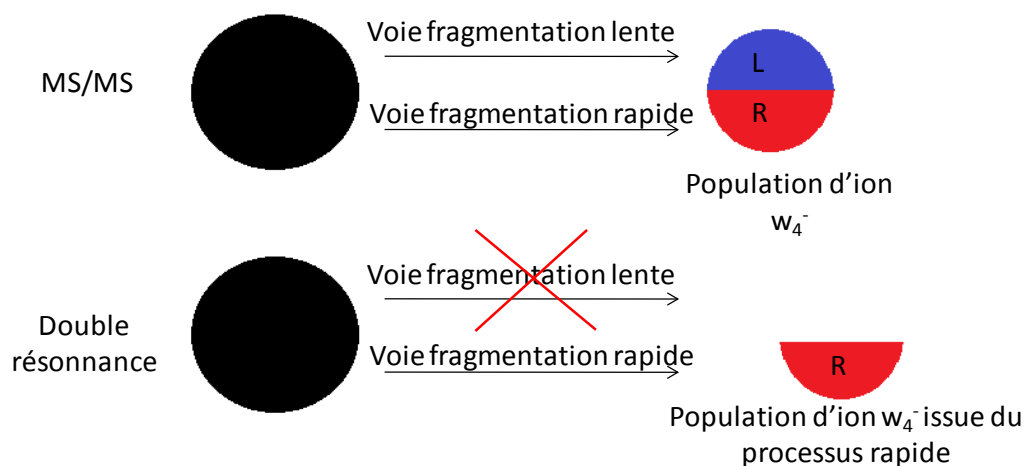


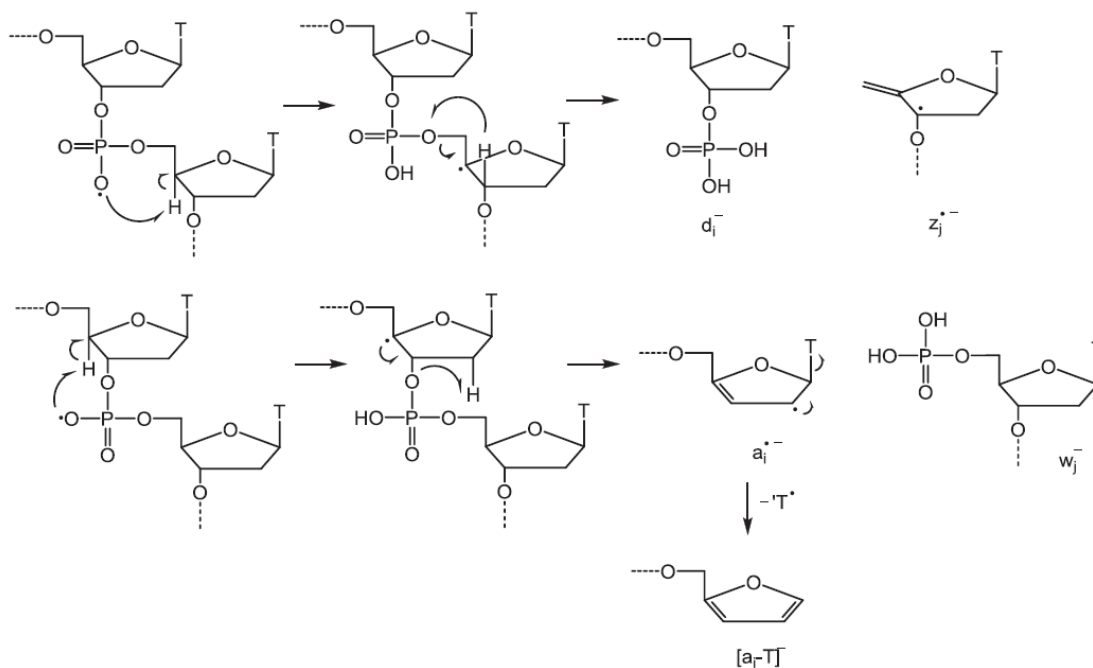
Figure 10. Expérience de double résonance de $[M-2H]^-$ dans lequel les ions w_4^- issus d'un processus à grande constante de vitesse de dissociation peuvent être détectés.

En particulier, dans le cas de l'ion w_4^- , l'évolution suggère qu'il existe plusieurs populations d'ions fragments qui se dissocient avec des constantes de vitesse différentes. À notre avis, la population d'ions qui est issue de la dissociation avec k_d faible correspond aux complexes ion-dipôle de plus longue durée de vie (par exemple, $[w_4^-, a_2^{\bullet}]$) qui sont éjectés avant leur dissociations (*i.e.*, $[w_4^-, a_2^{\bullet}] \rightarrow w_4^- + a_2^{\bullet}$). L'existence de tels complexes a été examinée en particulier dans le cas des peptides et leur formation permet d'expliquer la formation d'ions fragments c_i^{*+}/z_j^{*+} en plus des ions $c_i^{'+}/z_j^{'+}$ habituellement observés (34). Cela explique probablement pourquoi sur la courbe de double résonance les ions $a_i^{\bullet-}$ et w_j^- présentent une tendance similaire. Il est à noter que même avec une amplitude d'éjection relativement élevée, une partie de la population des ions w_4^- n'est pas perdue (*Figure 10*), correspondant donc à des processus de dissociations avec k_d élevé. Nous ne pouvons pas exclure qu'une fraction des ions fragments w_4^- et w_5^- pourrait venir de processus de dissociation «classique» (induits par la charge). Dans le spectre de SORI-CID de l'ion $[M-2H]^{2-}$ pour l'oligonucléotide $d(T_2AT_3)$, les ions w_4^{2-} et w_5^{2-} ont, en effet, été détectés. De la même façon, l'ion de charge réduite $[M-2H]^{\bullet-}$ pourrait donner des ions w_4^- et w_5^- par un processus non-radicalaire. Dans ce cas, le radical doit être localisé sur le neutre perdu.

De plus, nos expériences ont montré que la thymine est l'unique nucléobase perdue sous forme radicalaire. Hakansson *et al.* (26) ont réalisé une expérience EDD sur l'ion $[d(A_6)-2H]^{2-}$ et ont trouvé la même série d'ions radicaux isomères en séquence ($a_4^{\bullet-}/z_4^{\bullet-}$ et $a_5^{\bullet-}/z_5^{\bullet-}$) avec des ions satellites correspondants à la perte de l'adénine radical. Ces résultats suggèrent que cette base peut également être perdue par un processus radicalaire, mais cette hypothèse doit être confirmée par des expériences de double résonance, parce que l'adénine peut facilement être perdue par un mécanisme induit par la charge, comme il est montré par SORI-CID.

L'abondance relative des ions w_j^- présents sur les spectres d'activation en MS^3 EDD-EID/SORI-CID de $[d(T_2AT_3)-2H]^{2-}$ et $[d(T_2CT_3)-2H]^{2-}$ augmente avec la valeur m/z des ions produits. Ce comportement reflète la distribution régulière de la charge le long de la séquence et montre que la fragmentation en mode EDD est indépendante de la séquence nucléotidique. Très probablement, les charges négatives sont localisées sur tous les groupements phosphates en compétition. Dans un travail récent de dissociation par photodétachement d'électrons (EPD), Gabelica *et al.* ont démontré que l'efficacité de détachement d'électrons est dans l'ordre $dG_6 > dT_6 > dA_6 > dC_6$. L'efficacité de photodétachement est donc fortement dépendante de la base (51). En particulier, la guanine qui possède la plus faible énergie d'ionisation et une faible affinité électronique des bases nucléiques (52, 53), a donné une plus

grande efficacité de détachement d'électrons sous EPD UV à la longueur d'onde de 260 nm. D'autres études ont montré que lorsque le brin d'ADN contient la guanine, la plus haute orbitale moléculaire occupée peut être située sur la base et non sur le phosphate (54,55). En se basant sur nos résultats expérimentaux, un mécanisme est proposé pour la dissociation par voie radicalaire de l'ADN sous activation EDD (*Schéma 3*) dans lequel la charge est spectatrice. Il est considéré que la charge négative est localisée sur le groupe phosphate. Le détachement d'électron donne lieu à un radical phosphate instable. Dans le *Schéma 3a*, un transfert 1-5 d'hydrogène donne un radical tertiaire plus stable. Consécutivement, un transfert 1-4 d'hydrogène, conduit à la formation des ions fragments complémentaires $z_j^{\bullet-}$ et d_i^- . Enfin, la perte de $T^{\bullet}$ donne l'ion $[z_i-T]^-$. Ainsi, dans un processus très analogue, (*Schéma 3b*), il est possible également d'expliquer la formation des ions fragments $a_i^{\bullet-}$, $[a_i-T_i]^-$ et w_j^- .



Scheme 2. Proposed mechanism for DNA electron detachment dissociation.

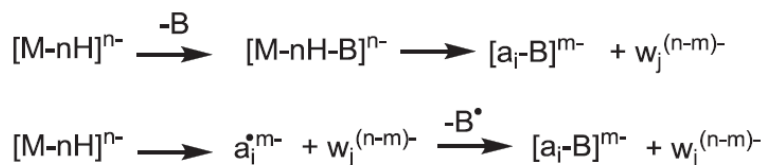


Schéma 3. Mécanisme proposé pour expliquer la dissociation de l'ADN multidéprotoné par voies radicalaire .

1.4. Conclusion

L'activation EDD des molécules multidéprotonées d'ADN montre une perte abondante de la thymine radicalaire. Celle-ci est favorisée par un processus radicalaire alors qu'elle est très défavorisée (voire même absente) par des processus de dissociation conventionnels induits par la charge en raison de sa relative faible affinité protonique. En fait, avec les modes d'activation vibrationnelle, la perte de nucléobases est la première rupture menant aux séries d'ions complémentaires $[a_i-B_i]^-$ et w_j^- . Nos expériences MS^3 séquentielles (EDD/SORI-CID) et de double résonance ont montré que tous les ions fragments impliquant la perte de la thymine proviennent de la série radicalaire a_i^- . La combinaison de double résonance et d'EDD/SORI-CID MS^3 permet le découplage des deux processus responsables de la production des ions fragments produits à partir de l'EID et de ceux produits à partir d'EDD. Les résultats des expériences séquentielles d'EDD, EDD/SORI-CID (MS^3) et de double résonance confirment la conclusion de Kinet *et al.* [48] : la perte de base en EDD survient après clivage de la séquence alors qu'en activation vibrationnelle, la perte de nucléobase est à l'origine des clivages de séquence d'ADN (Schéma 3). Nous avons présenté une évolution de l'abondance des ions fragments en fonction de l'amplitude de résonance d'éjection en mode EDD afin d'obtenir des informations sur les constantes de vitesse des différents processus de dissociation. Deux mécanismes impliquant des voies radicalaires ont été proposés concernant seulement la base thymine, car la perte des autres nucléobase sous forme radicalaire n'a pas été observée. Les expériences d'EDD avec l'oligonucléotide 12-mer ont montré que l'efficacité de détachement d'électrons augmente avec l'état de charge, mais le nombre d'ions fragments est très limité, ce qui peut être dû à des liaisons non-covalentes intramoléculaires. Enfin, il a été démontré que des processus EDD sont « aléatoires » le long de la séquence alors que certains clivages plus spécifiques sont produits sous EID. La technique EDD est un outil complémentaire à l'activation vibrationnelle (CID, IRMPD) pour la détermination de la structure de l'ADN. En outre, les méthodes EDD et EDD/SORI-CID permettent l'obtention de fragmentations particulières des oligonucléotides.

2. Etude de mononucléotides déprotonés par dissociation induite par électron (EID)

2.1. Introduction

L'étude des décompositions d'oligonucléotides déprotonés a été menée avec succès en utilisant des méthodes ergodiques d'activation tels que le CID (5,6,56) et l'IRMPD (57). Les spectres de dissociations obtenus par ces méthodes d'activation présentent des ions fragments similaires car ils sont basés sur des processus impliquant une excitation vibrationnelle (58, 59). Dans de telles conditions d'activation, le processus de fragmentation de l'ion précurseur à nombre pair d'électrons est principalement conduit par la charge. En conséquence, l'orientation des fragmentations dépend fortement de l'affinité protonique de chaque groupe fonctionnel dans l'espèce moléculaire chargée (dans le cas où il n'existe pas de zwitterion) (60). Quelques années auparavant, avec des systèmes multichargés des méthodes d'activation par bombardement d'électrons impliquant des processus radicalaires ont été développées telles que l'ECD (*electron capture dissociation* 0-2 eV) pour les ions positifs multichargés (14,16,61). Les ions multiprotonés sont en mesure d'accepter un ou plusieurs électrons (par étape). La capture d'un électron est exothermique (5-7 eV) (62) en raison de la diminution de l'état de charge et de plus, l'apparition de site radicalaire conduit à des espèces chargées moins stables. L'espèce de charge réduite distonique produit consécutivement des clivages de liaisons covalentes (semblables ou non à ceux observés en CID). L'ECD comme l'ETD (63) est largement utilisé pour la caractérisation des macromolécules biologiques. Cependant, ces méthodes ont été rarement appliquées pour l'étude de fragmentation de l'ADN, car ces espèces sont généralement analysées par spectrométrie de masse en mode d'ions négatifs. Plus récemment, les modes EPD (*electron-photo-detachment*) (27,28) et l'EDD (*electron-detachment-dissociation*) (19,21,26) ont été utilisés pour la production d'ions fragments de molécules d'ADN multidéprotonées. Le processus de détachement d'électrons (*electron stripping*) nécessite un bombardement par des électrons dont l'énergie cinétique est supérieure à 20 eV. L'EDD a été appliqué avec succès sur des désoxy-oligonucléotides multidéprotonés conduisant à des ions fragments complémentaires à ceux formés avec des méthodes d'excitations vibrationnelles (48,64). Pour l'EDD, la durée d'irradiation par les électrons (quelques secondes) est beaucoup plus longue que pour l'ECD (généralement

inférieure à 100 ms) (21,65) à cause de la probabilité d'interaction avec des électrons rapides. Par ailleurs, il a été montré que des dissociations induites par électrons (EID) a lieu concomitamment avec des processus EDD (48). Comme l'EDD, l'EID est effectué avec des électrons dont l'énergie cinétique est élevée, mais cette technique peut être utilisée avec des espèces simplement chargées négativement ou positivement (23,29,66-68). O'Hair *et al.* ont comparé les fragmentations produites sous CID et l'EID d'acide aminé aromatique protoné (49). Ils ont observé que le processus EID produit des fragmentations très différentes et complémentaires à celles produites en mode CID de basse énergie. Zubarev *et al.* (69) ont étudié l'activation de peptides protonés par ionisation électronique dissociative (méthode d'activation également appelée EID mais impliquant un autre processus que celui étudié ici). Comparé au CID, les différences observées sont dues à la formation de structure distonique des ions précurseurs. Dans nos précédents travaux, des expériences de MS³ séquentielle de type EDD/SORI-CID sur les ions $[M-nH]^+$ produits à partir de $[M-nH]^n$ avec activation EDD, et les expériences de double résonance ont permis de clarifier l'origine des ions fragments produits par EDD mais aussi simultanément par EID. Ces résultats ont montré en particulier, que les processus EDD se produisent de façon aléatoire le long de la séquence là où il y a la charge, tandis que les processus EID dépendent essentiellement des propriétés électroniques de nucléobases (comme en mode CID). Dans ce travail, nous avons comparé les dissociations produites à partir des 2'-désoxynucléotide-5'-monophosphate déprotonés par EID et par CID. Les voies de dissociations des 2'-désoxynucléotides-5'-monophosphates ont déjà été étudiées par CID (60,70-72) et plus récemment par photodissociation sous ultra basse pression (73-75) et en APPI (76). Habibi-Goudarzi et McLuckey, ont étudié sous CID de faible énergie du 2'-désoxynucléotide-5' and -3' monophosphate (60) et ont montré que la perte de nucléobase est nettement plus favorisée par la présence d'un groupe phosphate en position 3' plutôt qu'en position 5'. *En revanche, l'acidité de la base libre (ou de son radical) et la basicité en phase gazeuse des nucléobases engagé dans la liaison N-C semblent jouer un rôle important.* La décomposition de ces ions précurseurs conduit à davantage d'ions fragments en mode EID par rapport au mode SORI-CID. En particulier, les spectres EID affichent certains ions fragments à nombre impair d'électrons qui ne sont pas détectés dans les spectres SORI-CID. Ce comportement reflète le rôle d'une excitation électronique dont nous parlerons plus loin. Notre principal objectif était d'atteindre un modèle basé sur une meilleure compréhension mécanistique des processus EID. Des expériences MS³ séquentielles, de double résonance et d'échanges H/D ont également été réalisées afin d'éclaircir certains mécanismes de fragmentations. De cette manière, nos résultats suggèrent que des ions fragments peuvent

former des complexes qui conduisent à la formation de certains ions fragments impliquant le clivage d'une ou deux liaisons covalentes sans affecter le système non-covalentes.

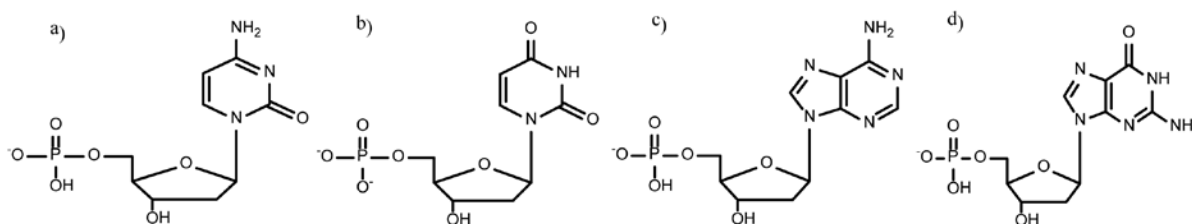


Schéma 4 : Structure des 2'-désoxynucléotide-5'-monophosphate.

2.2. Résultats et discussion

2.2.1. Spectres d'activation par SORI-CID et EID des 2'-désoxynucléotide-5'-monophosphates

Sous EID, le 2'-désoxyguanosine-5'-monophosphate déprotoné présente un comportement particulier qui sera discuté plus tard.

Le *Tableau 1* présente les intensités relatives des ions produits à partir des ions précurseur 2'-désoxynucléotide-5'-monophosphates par activations SORI-CID et EID. Les spectres de dissociations correspondantes (*Figure 11*) sont caractérisés par des ions fragments en grande partie similaires. Dans tous les cas, l'ion fragment principal est $[M-H-B]^-$ (m/z 195) produit par la perte de base. Les ions fragments complémentaires (les nucléobases déprotonées ($[B-H]^-$)) sont également observés dans les spectres SORI-CID des ions précurseurs $[CMP-H]^-$ (m/z 306), $[UMP-H]^-$ (m/z 307), $[AMP-H]^-$ (m/z 330). La formation de ces ions fragments a été étudiée en détail par Rodger *et al.* (77) qui ont proposé que les deux ions complémentaires $[M-H-B]^-$ et $[B-H]^-$ étaient produits par un mécanisme intramoléculaires de type E2 à partir de la structure déprotonée. En fait, ce processus est une *syn*-élimination, dirigée par la charge négative, le site 5'-phosphate attaque le proton au 2' β C-H (en β de cycle désoxyribose), car cette réaction est stériquement plus favorable. Il convient de noter que, l'élimination E2 intramoléculaire exige que le proton en position 2'C et le groupe partant soit antipériplanaire (60), ce qui n'est stériquement pas possible avec le système étudié. Ce type de réaction pourraient être possible à partir de 3'-phosphate. Cela pourrait expliquer pourquoi le seuil d'énergie nécessaire pour perdre une base à partir du 2'-désoxynucléotide-5'-monophosphate est plus élevé que celle nécessaire pour le 2'-désoxynucléotide-3'-

monophosphate (60). Un mécanisme alternatif peut être proposé en considérant que la dissociation du 2'-désoxynucléotide-5'-monophosphate déprotoné se produisent à partir d'une population d'anions présentant une structure zwitterion (ZW) (*i.e.*, deux charges négatives et une charge positive) plutôt qu'une forme canonique simplement chargée. Pendant la désolvatation de l'ensemble chargé, un proton peut être transféré à la nucléobase. Une telle protonation ne devrait pas se produire avec la thymine et l'uracile, en raison de leur faible basicité respectives (47). En conséquence, les formations compétitives de $[U-H]^-$ et $[(UMP)-H-U]^-$ ne doivent avoir lieu. Or, ces deux espèces anioniques complémentaires sont détectées à m/z 111 et à m/z 195, respectivement (*Table 1*). Par conséquent, le mécanisme impliquant un ZW comme forme intermédiaire, doit être écarté. Ainsi, pour observer l'ion uracile déprotoné (et perdre sa forme complémentaire neutre), un autre mécanisme doit être envisagé. En considérant un processus par étapes, on peut supposer que le transfert de proton en $2pC$ vers le groupe phosphate déprotoné en 5' permet d'assister la formation de la base déprotonée. A partir de ce processus, la formation d'un complexe ion-dipôle ($[(UMP-H)-B]$, B^-) se produit avec une insaturation en C_2-C_1 . Durant la deuxième étape, un transfert de protons intra ion-dipôle entre les deux partenaires a lieu à partir du groupe phosphate vers l'uracile déprotoné. Ainsi, l'acidité de la nucléobase en phase gazeuse doit jouer un rôle dans l'évolution du rapport ($r = [(M-H)-B]^- + [(M-H)-B-H_2O]^- / [B-H]^-$). Nos résultats en SORI-CID présentent des rapports d'abondances qui suivent l'ordre suivant : $GMP > AMP > UMP > CMP$. Cette évolution suggère de comparer seulement deux à deux les nucléobases de la même famille purine (nucléobase G, A) et pyrimidine (nucléobase U, C). Le rôle joué par l'acidité n'est pas la seule cause, en effet, l'énergie d'excitation appliquée influence fortement ce rapport (r) comme l'a montré le travail de Kebarle (70) où il y a compétition entre une rupture simple du complexe et réarrangement par transfert de proton.

Chapitre III : Résultats et discussion

Table 1 : Abondance relative des ions fragments produits dans les spectres SORI-CID et EID de 2'-désoxynucleotides-5'-monophosphates déprotoné (ions radicaux en gras) $r = ([(\text{M-H})\text{-BH}]^- + [(\text{M-H})\text{-BH-H}_2\text{O}]^-) / [\text{B-H}]^-$

	m/z	CMP		UMP		AMP		GMP	
		CID(EID)		CID(EID)		CID(EID)		CID(EID)	
$[\text{M-H-43}]^-$	263	0.09 (0)							
$[(\text{M-H})\text{-BH}]^-$	195	0.64 (0.39)	195	0.79 (0.43)	195	0.54 (0.43)	195	0.58 (0.31)	
$[(\text{M-2H})\text{-BH}]^{\bullet-}$	194								(0.03)
$[(\text{M-H})\text{-BH-H}_2\text{O}]^-$	177	0.18 (0.29)	177	0.15 (0.25)	177	0.21 (0.41)	177	0.06 (0.1)	
$^{1,4}\text{A}^-$			166	0 (0.08)			166		(0.05)
$^{2,4}\text{A}^-$			136	0 (0.07)					
B^-	110	0.05 (0)	111	0.07 (0)	134	0.24 (0.16)	149	0.32 (0.05)	
$[\text{B-H}]^{\bullet-}$									(0.3)
H_2PO_4^-	97	0.03 (0.32)	97	0 (0.17)	97	0.01			
$[\text{M-H- C}_5\text{H}_7\text{O}_2]^{\bullet-}$									(0.16)
r		16		13.5		3 (5)		2 (2.5)	

Une tendance similaire est observée en mode EID. Cependant, les pertes consécutives de $[\text{B}+\text{H}_2\text{O}]$ sont renforcées alors que les ions de nucléobases puriques ($[\text{B-H}]^-$) diminuent partiellement et disparaissent pour les bases pyrimidiques. On peut noter que les pertes consécutives reflètent une plus grande énergie interne des 2'-désoxynucléotides-5'-monophosphates déprotonés. Néanmoins, à partir des études de Kebarle, il faut s'attendre à une augmentation d'abondance de l'anion $[\text{B-H}]^-$ lorsque l'énergie est plus forte (rupture directe) ce qui n'est pas observée dans nos résultats, puisque l'abondance de l'ion $[\text{B-H}]^-$ diminue (ou disparaît) (70). La perte de H_2O à partir des ions fragments $[(\text{XMP-H})\text{-X}]^-$ ($\text{X} = \text{C}, \text{U}, \text{A}$ ou G) a été observée pour les 2'-désoxynucléotides -5'-monophosphates déprotonés. McLuckey *et al* (60) ont proposé que les pertes d'hydroxyle 3' $\alpha\text{C-OH}$ et du proton 4' $\alpha\text{C-H}$ étaient à l'origine de ce processus. Une contribution mineure est observée pour H_2PO_4^- (m/z 97), la formation de cet ion est expliquée par un mécanisme de type E2 dans lequel la charge négative du groupe phosphate attaque le 4' $\text{H}\alpha\text{C-H}$ du sucre. L'abondance des ions H_2PO_4^- dans les spectres EID est généralement supérieure à celle des spectres SORI-CID correspondants. Cette tendance ne peut pas être expliquée uniquement en considérant l'acidité et le mode d'activation (SORI-CID vs EID). Il faut noter que l'ion fragment $[\text{M-H-H}_3\text{PO}_4]^-$ n'a

pas été détecté alors que l'ion H_2PO_4^- l'est. Cela indique que l'acidité de H_3PO_4 est beaucoup plus élevée que celui de $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_3\text{PO}_4]$, et donc que la durée de vie de l'ion dipôle $[\text{H}_2\text{PO}_4^-, (\text{M}-\text{H}-\text{H}_3\text{PO}_4)]^-$ est trop courte pour permettre l'échange de proton. La perte de 43 u à partir des ions précurseurs correspond à CONH *via* un mécanisme proche de type rétro Diels-Alder (60).

D'un point de vue général, les spectres EID des 2'- désoxynucléotides-5'-monophosphates déprotonés affichent plus d'informations par rapport au SORI-CID. La perte de H_2O est également détectée avec plus d'abondance dans les spectres EID. Dans de telles conditions, des ions fragments supplémentaires tels que les ruptures croisées du sucre « cross-ring cleavages » sont beaucoup plus abondantes que celles détectées dans les spectres SORI-CID (78) (*vide infra*). Ces ions fragments sont très utiles pour déterminer l'emplacement des substituants du désoxyribose (Schéma 5). Ces clivages sont principalement observés sous collisions à haute énergie (de l'ordre de quelques keV) connues pour produire une excitation électronique ainsi que qu'avec des méthodes d'activation impliquant un bombardement par électrons lentes ou rapides, ECD et EDD (63,64,79).

Outre la perte de nucléobase et la formation de l'ion fragment H_2PO_4^- , les spectres EID affichent dans plusieurs cas, des ions fragments radicalaires. La formation de ces ions radicaux sera discutée en détail avec le 2'-désoxyguanosine-5'-monophosphate déprotoné (*vide infra*).

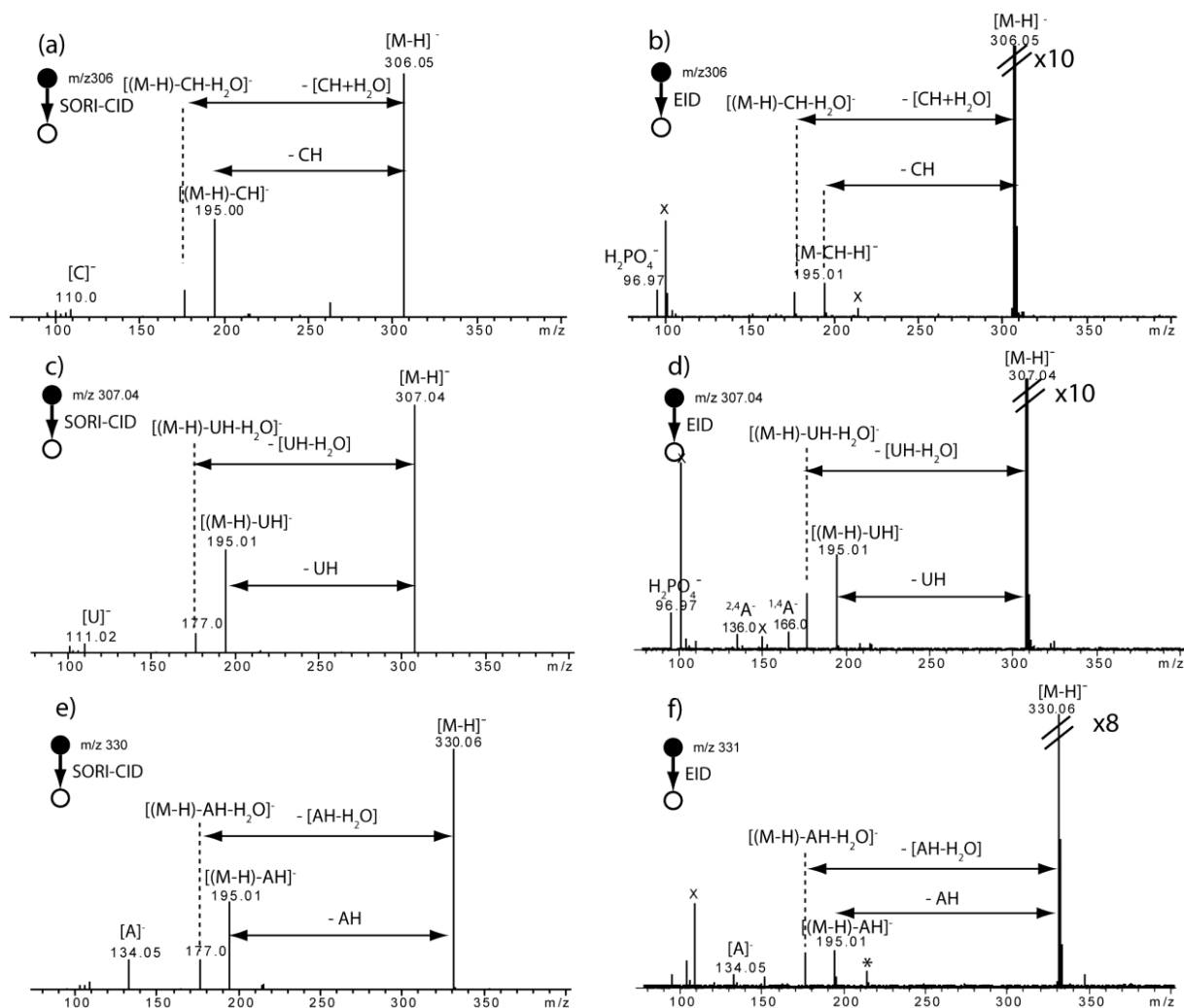


Figure 11: (a) Spectres SORI-CID et (b) EID de 2'-desoxycytidine-5'-monophosphate déprotoné (m/z 306). (c) Spectres SORI-CID et (d) EID de 2'-desoxyuridine-5'-monophosphate déprotoné (m/z 307). (e) Spectres SORI-CID et (f) EID de 2'-desoxyadenosine-5'-monophosphate déprotoné (m/z 330).

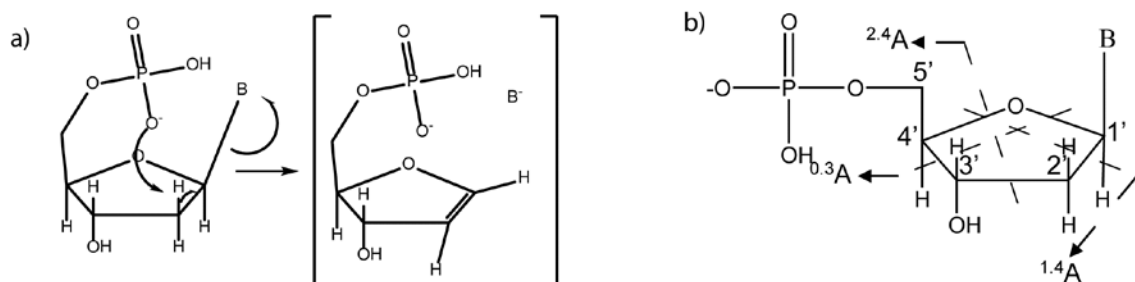


Schéma 5: a) Mécanisme proposé pour la perte de nucléobase, b) nomenclature de la fragmentation de ribose (78).

2.2.2. SORI-CID et EID du 2'-désoxyguanosine-5'-monophosphate déprotoné.

Le spectre SORI-CID du 2'-désoxyguanosine-5'-monophosphate déprotoné (m/z 346) est présenté dans la *Figure 12a*. Les ions fragments principaux ont été détectés à m/z 195 et m/z 150 correspondent respectivement à la perte de la nucléobase (G) et à la formation de la guanine déprotoné ($[G-H]^-$, m/z 150). Le spectre EID de 2'-désoxyguanosine-5'-monophosphate déprotoné (*Figure 12b*) montre l'ion m/z 195 comme ion fragment principal. Sa perte d'eau consécutive m/z 177 est produite avec une abondance analogue à celles des autres spectres EID. Les ions fragments m/z 139 et m/z 166 sont identifiés comme des espèces anioniques à nombre impair d'électrons qui ont été produites à partir de la rupture du cycle ribose ($^{1,4}A$ et $^{0,3}A$).

Il faut noter que les ions fragments à m/z 247 et m/z 149 n'ont pas été observés en mode CID ni sur les spectres EID des autres nucléotides. Ce dernier est attribué à l'anion radical $[G-2H]^-$ (ce qui est confirmé par sa composition élémentaire $C_5H_3N_3O^-$ déterminée à partir des mesures précises de masse). La base non-radicalaire déprotonée est attendue à m/z 150 ($C_5H_4N_3O^-$). Celle-ci est détectée mais avec une très faible abondance. L'ion fragment m/z 149 ($C_5H_3N_3O^-$) est un anion à nombre impair d'électrons correspondant à la guanine déshydrogénée. Sa formation pourrait impliquer formellement la perte d'un $H^\bullet$ à partir de la guanine déprotonée à m/z 150. En fait, la formation d'une telle espèce à nombre impair d'électrons $[B-2H]^-$ a été déjà considérée pour expliquer certains ions fragments générés par des voies particulières dans des conditions d'EID (49). L'équation suivante peut expliquer l'origine de ces espèces chargées radicalaires, utilisant des bombardements d'électrons relativement rapides (*i.e.*, énergie cinétique des électrons d'environ 20 eV) ce qui donne très probablement une excitation électronique verticale produite dans le niveau d'excitation électronique plutôt que d'énergie vibrationnelle.



Ce processus peut être considéré plutôt que celui par étape proposé dans la littérature pour l'ion positif $[M + H]^+$, impliquant une excitation électronique (49) qui peut entraîner un électron dans l'orbitale la plus haute occupée vers un détachement possible ce qui conduirait à un ion doublement chargé qui pourrait capturer un électron de faible énergie cinétique présent dans la distribution d'énergie cinétique des électrons incidents. En ce qui nous

concerne pour les ions négatifs c'est qu'il y ait une excitation électronique de manière verticale (Principe de Franck Condon) compte tenu de la durée de l'interaction entre les électrons rapides et l'ion doublement chargé. Un tel passage peut reconduire à une redistribution d'énergie interne vers des niveaux plus bas à condition que les surfaces de potentiel se croisent, ce qui est le cas pour des systèmes polyatomique. Ainsi les ions de charge réduite produite par le détachement d'électron doivent posséder une distribution d'énergie interne constituée d'énergie électronique et vibrationnelle. La présence d'énergie d'excitation électronique devrait favoriser des processus radicalaires pendant que l'énergie vibrationnelle favorise des processus induits par la charge. En fait, les deux voies sont assez similaires car ils comportent, un état électronique excité. L'électron peut migrer ainsi vers différents sites.

Dans le spectre EID du 2'-désoxyguanosine-5'-monophosphate déprotoné (*Figure 12b*), la nucléobase oxydée sous forme de radical anion $[G-2H]^-$ est formée avec la plus grande abondance relative. Cela signifie que sa formation est favorisée et/ou cette espèce oxydée est la plus stable. Différentes structures de $[G-2H]^-$ donc, certains tautomères et d'autres mésomères peuvent être proposées (Schéma 6) en considérant la formation de formes distoniques (la modélisation est en cours pour les ions a_{di}) (80). Notez que la guanine est la base nucléique caractérisée par la plus haute affinité électronique (EA) (81) et l'observation précédente d'un ion fragment à m/z 149 suggère aussi, par analogie, que le neutre $C_5H_3N_5O$ ($[G-2H]$) doit être caractérisé par une valeur plus élevée d'EA que les formes oxydées des autres bases nucléiques.

La présence du deuxième signal supplémentaire à m/z 247, correspondant à une composition élémentaire $C_5H_6N_5O_5P^-$, est inattendue parce que la formation de cet anion radicalaire correspondant implique formellement la perte du résidu ribose radicalaire (c'est à dire, $C_5H_5O_3^\bullet$). L'existence de cet ion implique que le phosphate et la guanine sont maintenus ensemble. Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer la formation de l'ion m/z 247:

(i) soit l'ion précurseur à nombre pair d'électrons, dans un état électronique excité s'isomérise en un complexe ion-dipôle suffisamment stable permettant la perte du résidu ribose radical oxydé $C_5H_5O_3^\bullet$. Cela pourrait se faire par un processus par étapes qui pourrait être initié par le clivage homolytique de la liaison C-C entre le sucre et la base nucléique.

(ii) ou selon une voie d'isomérisation moléculaire similaire, après la perte du sucre, une liaison covalente se forme entre la base nucléique et le phosphate.

Dans tous les cas, l'ion produit m/z 247 doit être une espèce anionique à nombre impair d'électrons considérés comme étant dans une forme distonique. Ce point sera discuté plus tard (*vide infra*).

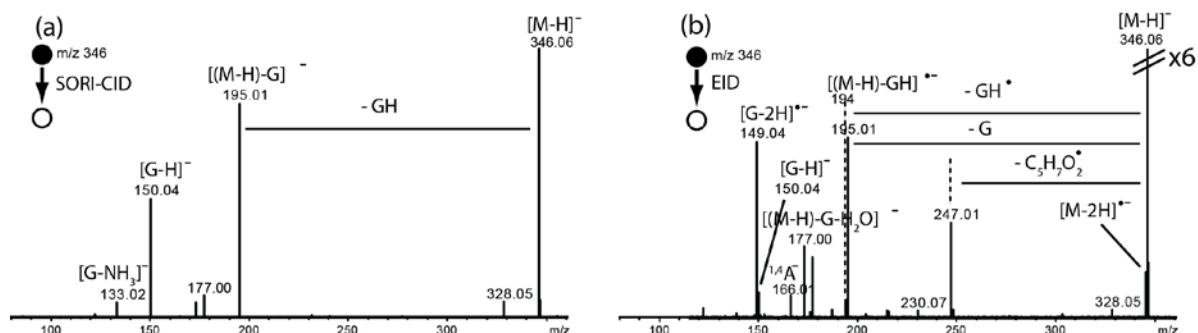


Figure 12 : a) Spectre SORI-CID b) Spectre EID de 2'-désoxyguanosine 5'-monophosphate

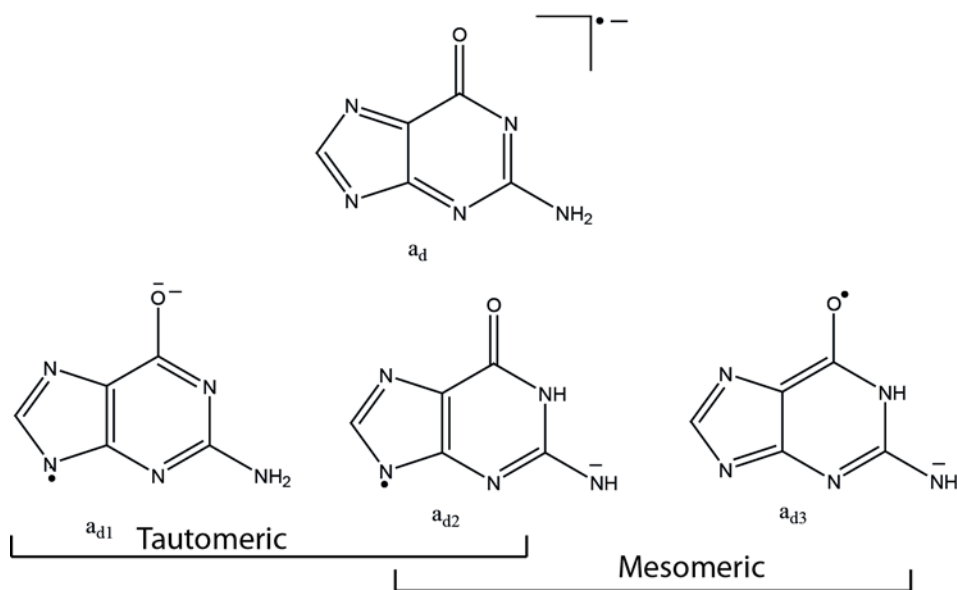


Schéma 6 : Différentes structures proposées pour la base guanosine sous forme distonique où la charge et le radical sont séparés.

2.2.3. Échange H/D

Une expérience d'échange proton/deuteron (H/D) a été réalisée par la mise en solution de 2'-desoxyguanosine-5'-monophosphate dans CH_3OD (Figure 13). Le pic de l'ion précurseur à m/z 346 est déplacé à m/z 351, ce qui correspond avec 5 échanges H/D. L'ion fragment m/z 247 a été déplacé à m/z 252 indiquant la présence de cinq deutérons à la place de 5 protons. La guanine oxydée et chargée sous forme de anionique radicalaire $[\text{G}_{\text{D}4}\text{-2D}]^{\bullet-}$ a été détectée à m/z 151 (déplacé de 2 th). Ceci indique que deux protons labiles sont échangés par deux deutérons sont restés sur cet ion radicalaire. Compte tenu de la perte à partir de l'ion m/z 252 (5D à partir de m/z 247) on doit considérer que, les trois deutérons absents dans l'ion m/z 151 (au lieu de m/z 149) montrent que les deux seuls qui restent sont sur des positions échangeables (ce qui exclut la liaison C-H de la purine).

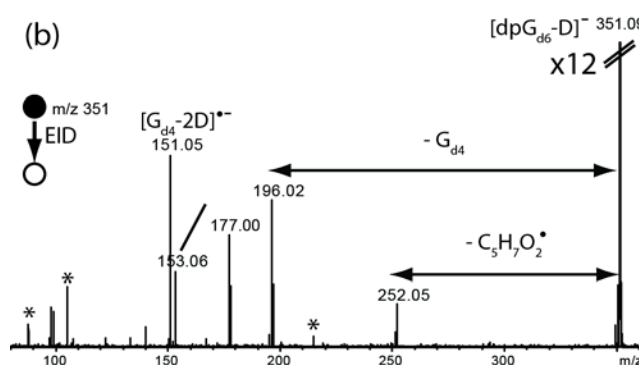


Figure 13 : Spectre EID de 2'-désoxyguanosine 5'-monophosphate dans lequel 5 protons sont échangés par 5 deutériens (m/z 351).

2.2.4. Spectre IRMPD en mode MS^3 de l'ion fragment $[(\text{M-H})\text{-C}_5\text{H}_7\text{O}_2]^{\bullet-}$ m/z 247 produit à partir de l'ion m/z 346 $[\text{M-H}]^-$.

La Figure 15 montre le spectre MS^3 du 2'-désoxyguanosine-5'-monophosphate déprotoné (EID (m/z 346)/IRMPD (m/z 247)). Le spectre de dissociation MS^3 présente seulement l'ion fragment m/z 149 correspondant à la nucléobase sous forme d'un anion radical $[\text{G-2H}]^{\bullet-}$, ce qui est en accord avec la dissociation consécutive du complexe ion-dipôle de structure à élucider (m/z 247).

Des expériences de double résonance (EID sur ion m/z 346 avec éjection simultanément de l'ion m/z 247) avec une énergie d'éjection variable sur l'ion m/z 247 ont été réalisées, mais l'abondance relative de l'ion m/z 149 reste inchangée (32). Cela indique que le complexe ion-dipôle se dissocie consécutivement avec une constante de vitesse très élevée. Ainsi cette dernière est plus grande que la constante de vitesse d'éjection.

Grâce aux expériences de mobilité ionique de Bowers *et al.* (81) il a été montré que le 2'-désoxyguanosine-5'-monophosphate déprotoné est caractérisé en phase gazeuse par une conformation *syn* dans laquelle le groupe phosphate est proche de la nucléobase (guanine) par une liaison non-covalente intra-moléculaire.

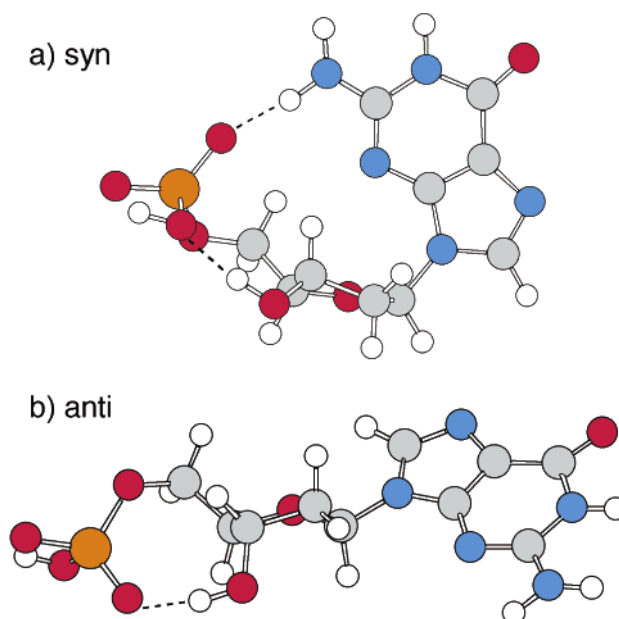


Figure 14. Exemple de structure (a) « Syn » et (b) « anti » prédit par AMBER pour [dGMP-H]⁻ (81).

Nos expériences ont montré que cette interaction non-covalente a été préservée pendant l'EID de [GMP-H]⁻ [ion fragment m/z 247 (Figure 15)]. Ce comportement présente des analogies avec l'ECD qui peut permettre le clivage de liaison covalente, sans affecter les groupes labiles (par exemple les groupes phosphates) et les liaisons non-covalentes (82,83).

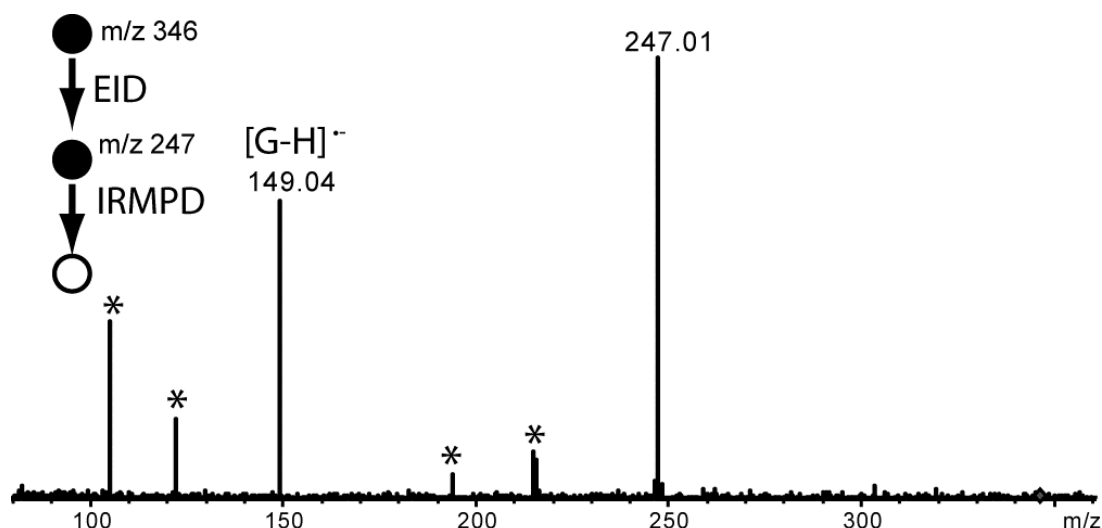


Figure 15 : Spectre MS^3 : l'ion précurseur (m/z 346) est activé par bombardement électrons. l'ion fragment m/z 247 est ensuite sélectionné et activé par IRMPD.

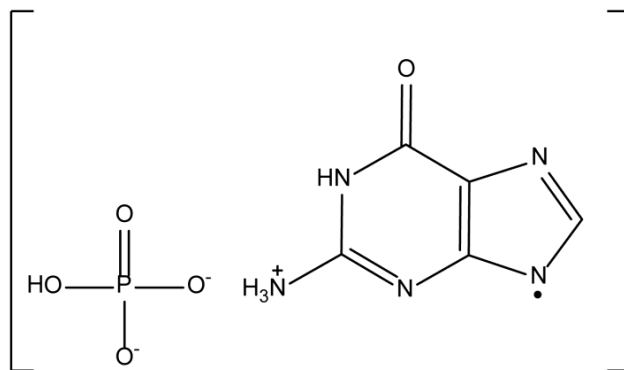


Schéma 7 : Structure proposée pour l'ion dipôle m/z 247(déplace à m/z 252 avec les échanges H/D), dans lequel la liaison non covalente est de type pont salin.

2.2.5. Formation et dissociation de l'ion $[GMP-2H]^-$ à l'aide d'expériences MS^3 séquentielle.

Il faut remarquer que, la perte de $H^\bullet$ à partir de l'ion précurseur a été généré selon une grande constante de vitesse rendant cette espèce sous une abondance de 25% du pic de base des ions fragments dans le spectre EID de $[GMP-2H]^-$. Une telle perte de radical $H^\bullet$ a également été décrite dans le cas de la photodissociation du tryptophane protoné (84). Il a été proposé que cette perte était la première étape expliquant la formation d'ions fragments consécutifs par voie radicalaire (49,84). Dans ce cas, l'expérience de double résonance ne peut pas être faite, car l'ion intermédiaire $[M-2H]^-$ (m/z 345) à éjecter est trop proche de l'ion précurseur $[M-H]^-$ (m/z 346) au risque d'être éjecté.

Afin de démontrer cette hypothèse, une expérience MS^3 a été effectuée. La Figure 16a présente le spectre d'isolement de l'ion $[GMP-2H]^-$, selon une isolement suffisamment

efficace pour effectuer une expérience MS^3 séquentielle. Dans le spectre d'EID (m/z 346)/IRMPD (m/z 345) (MS^3) (Figure 16b), l'ion m/z 247 a été détecté, ainsi que les ions radicalaux guanine (m/z 149). L'ion $[M-G-2H]^-$ (m/z 194) a été observé sur le spectre MS^3 EID/IRMPD alors que sur le spectre EID les deux ions fragments $[M-G-2H]^-$ et $[M-G-H]^-$ (m/z 194 et m/z 195) sont détectés. L'ion fragment à m/z 166 ($^{1,4}A$) dans ce spectre MS^3 , est identifié comme un ion fragment radical ($C_4H_7O_5P^\bullet$).

Cette expérience a confirmé que les ions fragments caractéristiques du mode EID sont produits par la dissociation consécutive de l'ion $[M-2H]^-$. Dans l'expérience d'échanges H/D (Figure 13) le pic à m/z 247 a été déplacé à m/z 252, indiquant l'introduction de cinq deutérons, ce qui signifie que l'hydrogène radicalaire perdu à partir de l'ion précurseur lors de l'activation EID ne fait pas partie des protons échangeables.

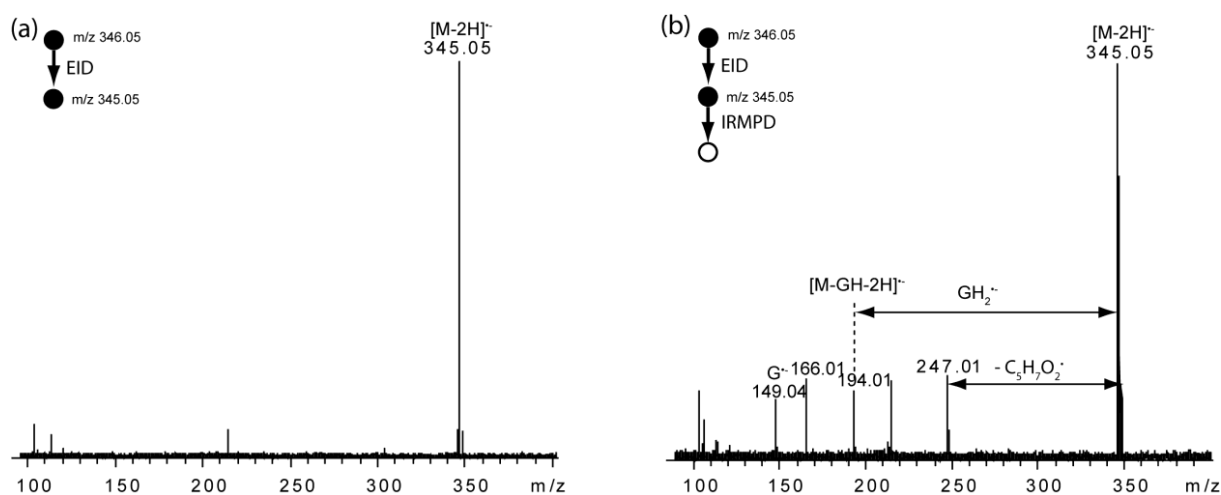


Figure 16 : a) Isolement de l'ion $[M-2H]^-$ m/z 345, b) activation par IRMPD de l'ion $[M-2H]^-$ m/z 345

2.2.6. Abondance relative des nucléobases radicalaires et du complexe ion-dipôle.

Les expériences EID sur les espèces déprotonées ont également été effectuées pour les autres nucléotides-5'-monophosphates (Figure annexe). Les spectres de ces derniers présentent des comportements similaires à ceux des spectres EID des 2'-désoxynucléotides-5'-monophosphates.

Les rapports d'abondance des ions à nombre pair et impair électrons des nucléobases ($[B-2H]^-/[B-H]^-$) et ($I_c^-/[B-H]^-$) (I_c correspond au complexe ion dipôle $[B+H_3PO_4-2H]^-$) est présenté dans la Figure 12. Le spectre EID de la guanosine déprotonée ($[GMP-H]^-$) présente

un ion fragment abondant correspondant à nucléobase sous forme d'anion radical ($[G-2H]^{\bullet-}$). Le spectre EID de l'adénosine-5'-monophosphate présente en compétition les deux ions $[B-2H]^{\bullet-}$ et $[B-H]^{\bullet-}$ selon des abondances similaires. Pour les spectres des (2'-désoxy)-cytidine-5'-monophosphate et de (2'-désoxy)- uridine-5'monophosphate, seule les nucléobases à nombre pair d'électrons ont été détectées.

Les spectres EID des (2'-désoxy)-nucléotide-5'-monophosphates ont montré que l'abondance relative des anions à nombre impair d'électrons suit l'ordre des affinités électroniques ($C \approx U < A \ll G$) (53). L'abondance relative des ions fragments $[B-2H]^{\bullet-}$ semble être corrélée avec l'abondance relative du complexe ion dipôle $[Ic^{\bullet-}]/[B-H]^{\bullet-}$. Les complexes ion-dipôles ont été détectés seulement dans les spectres EID des (2'désoxy)-nucléotide-5'-monophosphates qui présentent aussi la nucléobase radicalaire. Cela confirme que celle-ci est produite par dissociation consécutive du complexe ion-dipôle à m/z 247.

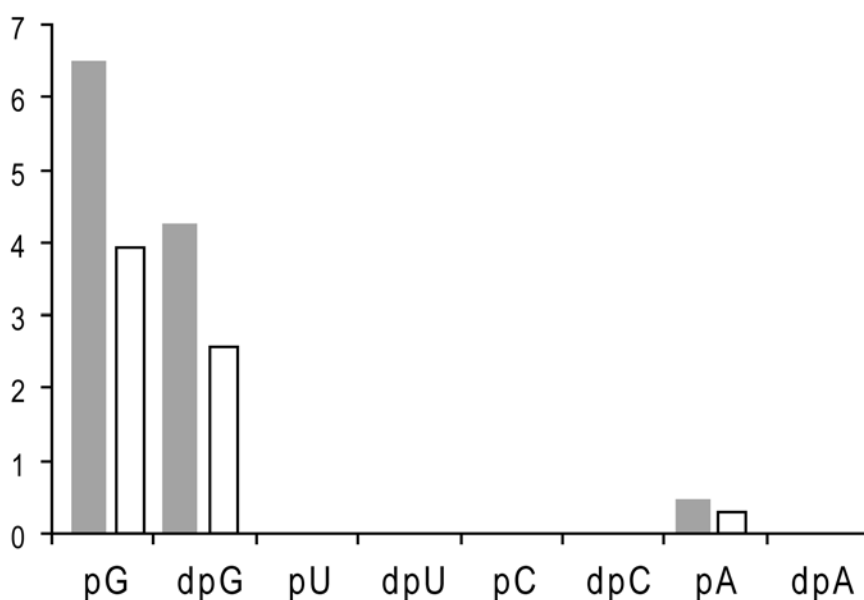


Figure 17 : Rapport des abondances relatives des nucléobase à nombre impair/pair d'électrons (gris) et des complexes ion-dipôle à nombre impair/pair d'électrons (blanc)

2.2.7. Discussion et mécanismes proposés

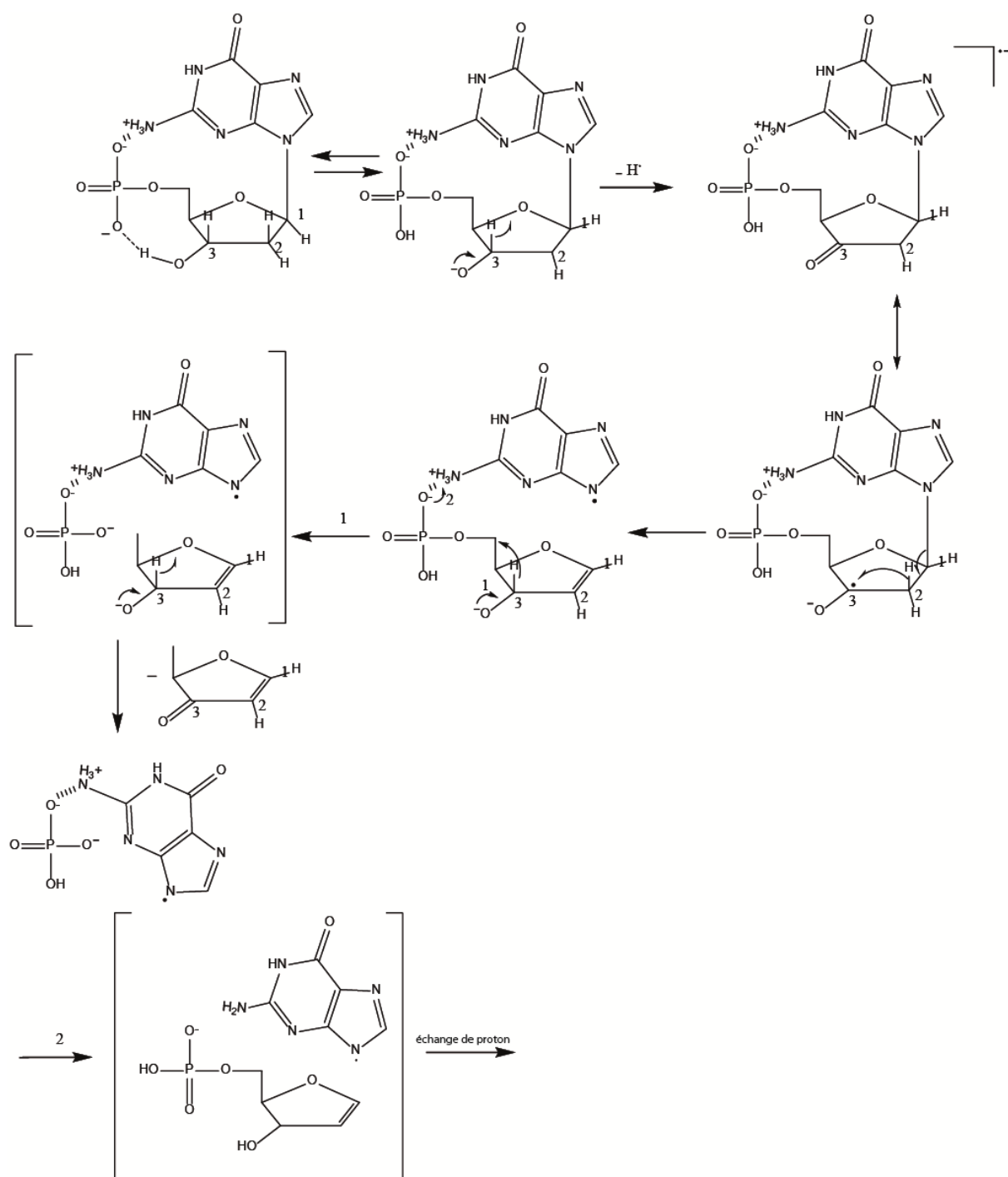
Les expériences EID réalisées sur des mononucléotides déprotonés nous ont permis de proposer un mécanisme expliquant la formation du complexe ion dipôle (m/z 247) et de la base radicalaire $[B-2H]^{\bullet-}$. Nous avons considéré que la conformation de l'ion précurseur en

phase gazeuse est en conformation *syn* comme l'a proposé Bower *et al.* (81). Cependant nous proposons que la liaison non covalente entre la guanine et le groupe phosphate est de type pont salin et non pas une liaison hydrogène, parce que ce type de liaison est bien plus forte que la liaison hydrogène.

Tout d'abord, nous envisageons une perte de H[•] assistée par la charge. Ensuite une migration de H[•] provoque une rupture homolytique de la liaison C1-N (23). Après cette rupture les fragments forment un complexe ion-dipôle. Deux voies de fragmentation sont alors envisageables, la première implique une attaque de la charge négative de l'oxygène sur l'hydrogène du groupe C3-OH ce qui va générer un hydrure. Ce dernier va ensuite provoquer la rupture de la liaison C5-O. Le deuxième mécanisme implique l'attaque de la charge négative de l'oxygène sur le proton de la base, ce qui neutralise les charges donc, le pont salin n'existe plus. Avant la dissociation il peut y avoir un échange de proton ce qui donne soit la nucléobase sous forme d'anion radical ([B-2H]^{•-} *m/z* 149) soit l'ion fragment *m/z* 195.

Il faut noter que ces mécanismes ont été proposés avant l'expérience MS³ sur l'ion [GMP-2H]^{•-}. Cette expérience avec les échanges H/D conforte ces mécanismes. En effet, les ions fragments sont issus de l'ion précurseur qui perd un H[•] et celui-ci n'est pas l'un des protons échangeables. Il ne peut donc être que dans les positions C1, C2 et C3 (Schéma 8).

Chapitre III : Résultats et discussion

Schéma 8 : Mécanisme proposé pour la formation de l'ion m/z 247 et de la base radicalaire.

2.2.8. Les dimères des mononucléotides

Spectre de masse du dimère [TMP/TMP]

Le spectre de masse ESI du dimère TMP/TMP déprotoné en mode négatif est présenté dans la *Figure 18*. L'ion $[\text{TMP-H}]^-$ (m/z 321) est observé l'ion avec la plus grande abondance, ce dernier peut être produit à partir de la dissociation du complexe $[\text{TMP/TMP-H}]^-$ ou à partir des 2'-désoxythymine-5'-monophosphate libres en solution. Un adduit sodium est également détecté à m/z 343 $[\text{TMP} + \text{Na} - 2\text{H}]^-$ en faible intensité. Les ions m/z 641, m/z 663 et m/z 685 correspondent respectivement aux dimères déprotonés avec et sans sodium ($[\text{TMP/TMP} - \text{H}]^-$, $[\text{TMP/TMP} + \text{Na} - 2\text{H}]^-$ et $[\text{TMP/TMP} + 2\text{Na} - 3\text{H}]^-$). Il faut noter que l'intensité relative de l'adduit de sodium est beaucoup plus importante dans le cas du dimère que du monomère. Ce comportement peut être expliqué par le fait que le dimère sans sodium est associé par des liaisons hydrogène qui sont plus faibles que les ponts salins impliqués dans le cas du dimère cationisé.

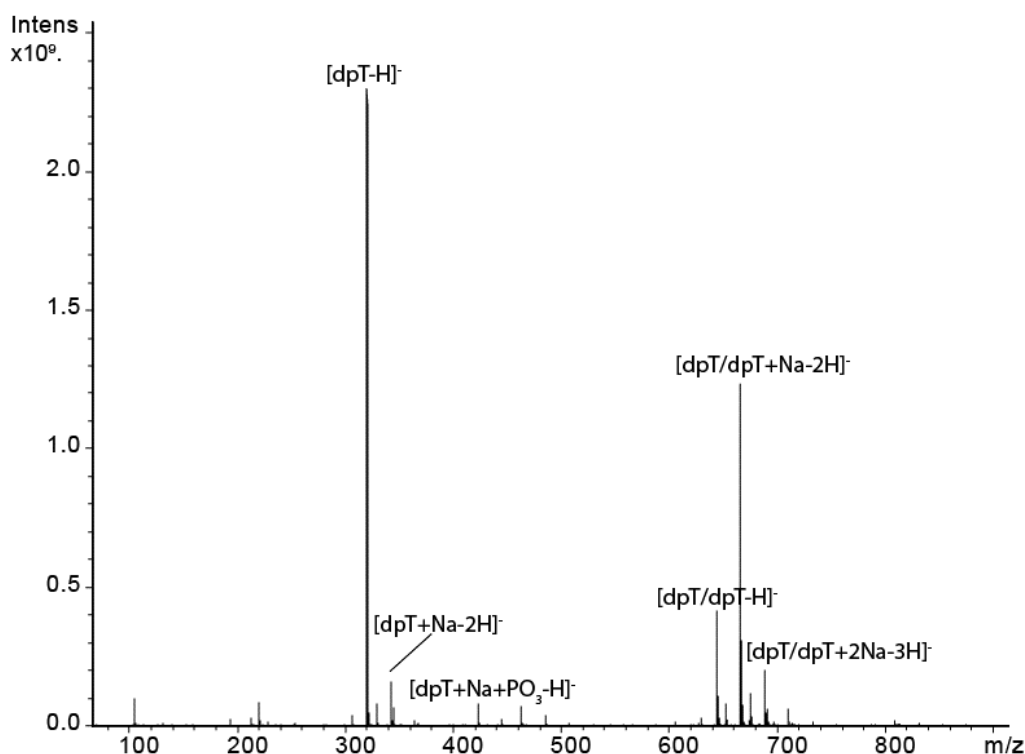


Figure 18 : Spectre de masse ESI du dimère [TMP/TMP] en mode négatif.

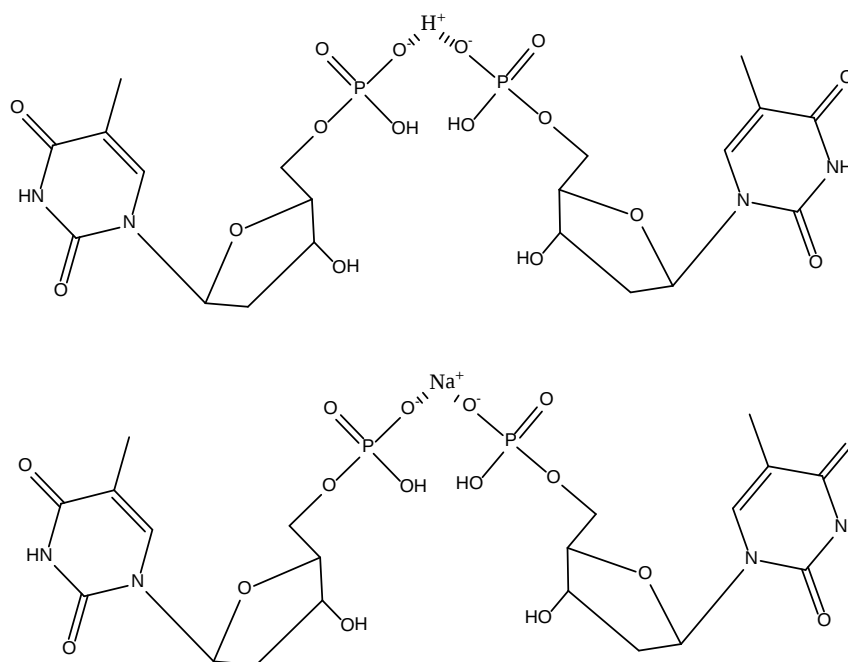


Figure 19. Conformation du dimère (DMP/DMP) en phase gazeuse, en haut les monomère sont liés par liaison hydrogène, en bas les monomères sont lié par le cation sodium.

Comparaison des spectres EID et SORI-CID des dimères avec et sans sodium

Les résultats obtenus précédemment suggèrent que des liaisons non-covalentes intramoléculaires peuvent être préservées sous activation EID. Dans un deuxième temps, des dimères non-covalents de mononucléotides ont été étudiés de façon à mettre en évidence de tels processus impliquant des liaisons non-covalentes intermoléculaires. Il est à noter que les conformations des dimères de mononucléotides déprotonés ont été proposées par Williams *et al.* (85) (Figure 20). Il a été montré que si pour certains dimères des associations entre nucléobases de type Watson & Crick subsistent, des interactions entre les groupes phosphates sont également présentes. Ces résultats ont permis d'expliquer que la stabilité de ces complexes en phase gazeuse (par des mesures de BIRD (*Blackbody-Infrared-Radiative-Dissociation*)) ne suit pas toujours la stabilité en solution.

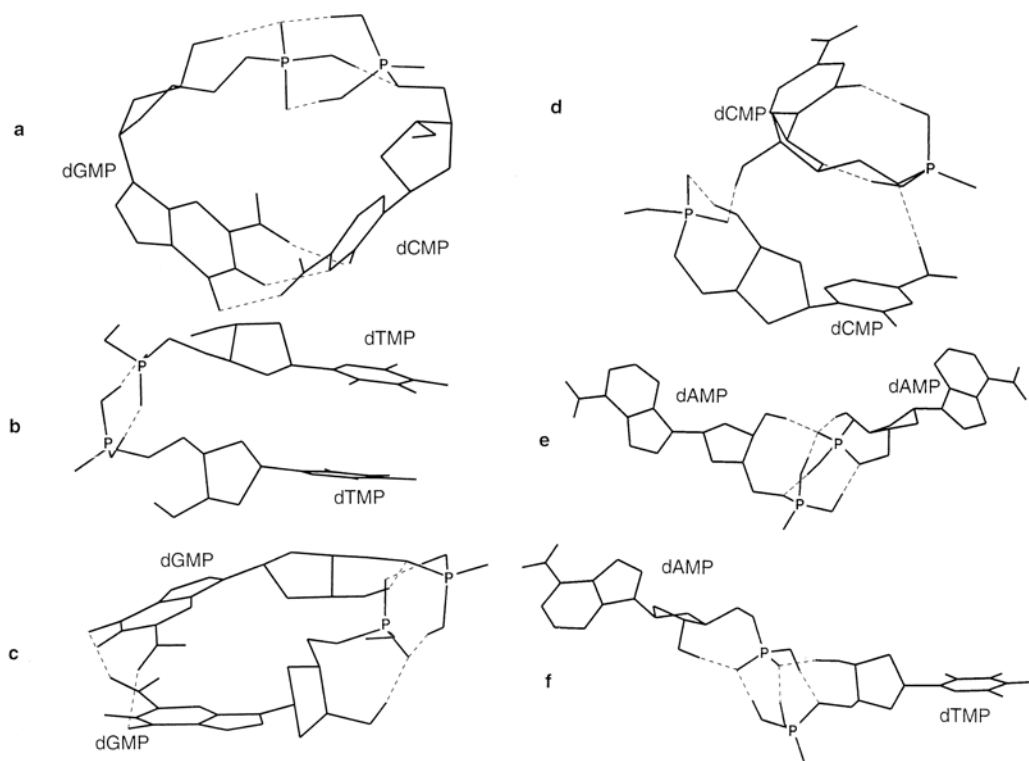


Figure 20. Structure des dimères déprotonés de mononucléotides d'après Williams *et al.* (85).

Au cours de ce travail, deux types de dimères ont été étudiés impliquant ou non un cation Na^+ (e.g. $[\text{TMP}/\text{TMP} - \text{H}]^-$, m/z 643 et $[\text{TMP}/\text{TMP} + \text{Na} - 2\text{H}]^-$, m/z 665). En général, l'intensité du dimère cationisé par un sodium est plus intense que le dimère déprotoné. Cela suggère que le sodium joue un rôle de stabilisation dans la formation du dimère. Ce résultat est en accord avec le comportement des duplexes d'ADN en solution dont la stabilité en solution (par les mesures de température de fusion) augmente avec la concentration en sel (plus grande force ionique).

Sous activation CID et EID, les dimères conduisent principalement aux deux monomères déprotonés dont l'abondance relative est liée à leur acidité en phase gazeuse respective. De façon significative, ces ions sont accompagnés d'ions satellites décalé de 80 u (HPO_3) et de 102 u (NaPO_3) avec l'adduit au sodium en mode CID, impliquant la formation d'une liaison covalente en accord avec des résultats de Williams *et al.* (85). La grande différence entre le dimère $[\text{TMP}/\text{TMP} - \text{H}]^-$ en CID et en EID provient de l'apparition de l'ion m/z 419 qui correspond à l'addition de H_3PO_4 (98 u) (Figures 21a et 21b). L'ion $([\text{TMP} - \text{H}]^- + \text{H}_3\text{PO}_4)$ implique probablement la préservation d'une interaction non covalente. Un résultat analogue est obtenu avec le dimère cationisé par le sodium $[\text{TMP}/\text{TMP} + \text{Na} - 2\text{H}]^-$ (Figures

21c et 21 d). Toutefois, dans ce cas, la différence est de 120 u au lieu de 98 à cause de la présence du sodium. Il faut rappeler que pour chaque sodium ajouté, le dimère perd un H^+ pour équilibrer la charge totale à 1^- et le décalage de masse est de 22 u.

Il est à noter que la position du groupement (HO_3P) reste encore à déterminer avec rigueur. Il est relié soit avec le phosphate à la position 5' soit avec l'hydroxyde à la position 3' du mononucléotide. Afin de déterminer sa position, il faudrait refaire les expériences avec des mononucléosides (c-à-d. sans le groupement phosphate en position 5') et d'autres échantillons sans l'hydroxyde en 3'. Une chose est certaine, autant en CID qu'en EID, une partie de la fragmentation du dimère mène à l'addition covalente d'un (HO_3P) sur le mononucléotide. Par contre, seul l'EID permet de conserver des interactions non-covalentes. Or, il est clair que la liaison entre le mononucléotide déprotoné et le groupement (H_3PO_4) est non covalente.

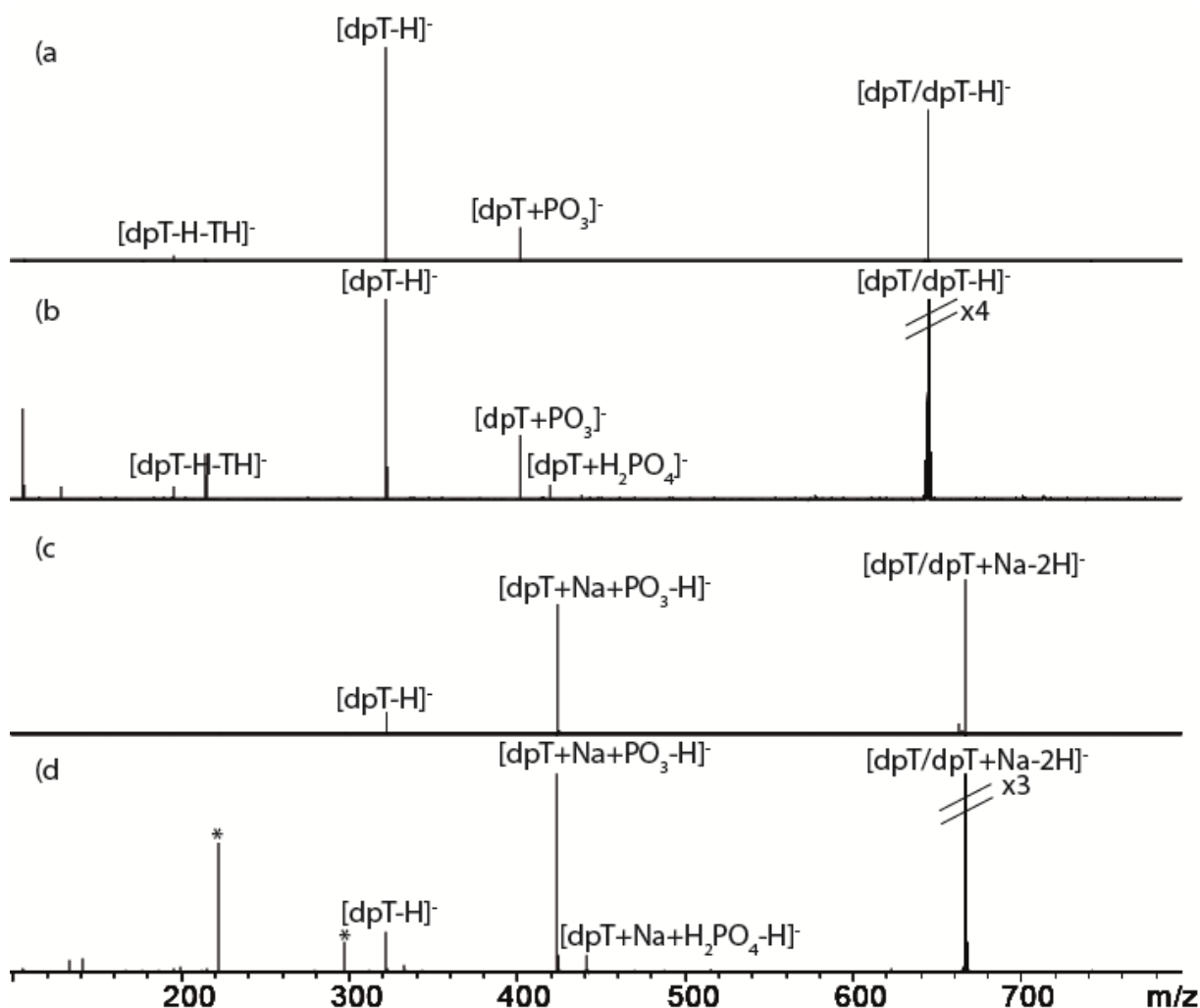


Figure 21. Spectres a) SORI-CID, b) EID du dimère $[TMP/TMP - H]^-$ c) SORI-CID, d) EID du dimère cationisé par un sodium $[TMP/TMP + Na - 2H]^-$.

Des expériences ont été menées pour les autres dimères de 2'-désoxynucléotide 5'-monophosphate, le résumé sur la présence éventuelle d'interactions covalente et/ou non-covalents dans le cas des dimères sont présentés dans le *Table 2*.

Table 2 : Présence d'interaction covalentes et/ou non-covalentes avec les groupes phosphates pour les dimères.

Dimères des 2'-désoxynucléotide 5'- monophosphate	En CID		En EID	
	<i>interaction covalente avec HO_3P^-</i>	<i>interaction non- covalente avec H_3PO_4</i>	<i>interaction non- covalente avec HPO_3</i>	<i>interaction non- covalente avec H_3PO_4</i>
[AMP/AMP-H] ⁻	oui	non	oui	non*
[AMP/AMP+Na-2H] ⁻	oui	non	oui	oui
[GMP/GMP-H] ⁻	oui	non	oui	non*
[GMP/GMP+Na-2H] ⁻	oui	non	oui	oui
[CMP/CMP-H] ⁻	oui	non	oui	oui
[CMP/CMP+ Na-2H] ⁻	oui	non	oui	non
[TMP/TMP-H] ⁻	oui	non	oui	oui
[TMP/TMP+ Na-2H] ⁻	oui	non	oui	oui

* Désigne dans ce cas, l'intensité était trop faible pour permettre de confirmer ou non la présence des interactions.

L'addition de groupements H_3PO_4 ou NaH_2PO_4 est uniquement présente dans les spectres EID. Étonnamment, les expériences MS/MS sur [GMP/GMP-H]⁻ ne montrent pas la présence d'interactions non-covalentes (c-à-d. l'ajout du H_3PO_4 ou NaH_2PO_4) comme cela

aurait pu être prédit par analogie avec le cas du monomère déprotoné GMP où une interaction intra-moléculaire existe, conduisant sous EID, à la formation d'un complexe comprenant la guanosine radicalaire et le groupe phosphate chargé ($[G-H]^+ + H_2PO_4^-$). Les conclusions avec les mononucléotides seuls ne s'appliquent pas ici dans le cas des dimères à cause de la conformation de ces derniers. En effet, dans le travail de William *et al.* (85), il a été démontré que dans la conformation préférentielle d'un dimère de $[GMP/GMP-H]^-$, les nucléobases ne sont pas à proximité des phosphates. De plus, ce sont les liaisons hydrogène entre les groupements phosphates qui assurent la stabilité du complexe. Par conséquent, cela suggère que l'interaction covalente (HO_3P) ou non-covalente (H_3PO_4) avec le mononucléotide se fait entre les groupements phosphates comme l'illustre le Schéma 9. Les comparaisons ont été menées sur les hétérodimères $[GMP + CMP - H]^-$ m/z 685. Dans le spectre SORI-CID (Figure 22) de $[GMP + CMP-H]^-$, le monomère $[GMP - H]^-$ m/z 362 est observé mais le $[CMP-H]^-$ est absent, ce comportement étant expliqué par l'acidité de la guanine qui est plus grande que la cytosine. Par contre, le signal correspondant à la cytosine diphosphate déprotoné ($[CDP - H]^-$, m/z 402) est beaucoup plus grand par rapport celui de la guanosine diphosphate ($[GDP - H]^-$, m/z 442). Ces ions sont formés par l'ajout de HPO_3 dans l'un des monomères. Mais dans le spectre EID de cet hétérodimère, l'abondance de l'ion $[GDP-H]^-$ est légèrement plus grande que celle de l'ion $[CDP-H]^-$. De plus les adduits avec H_3PO_4 sont observés pour les deux monomères ($[GMP + H_3PO_4 - H]^-$, m/z 573 et $[CMP + H_3PO_4 - H]^-$, m/z 533) ces ions fragments étant formés par les liaisons non-covalentes entre les groupes phosphate.

Chapitre III : Résultats et discussion

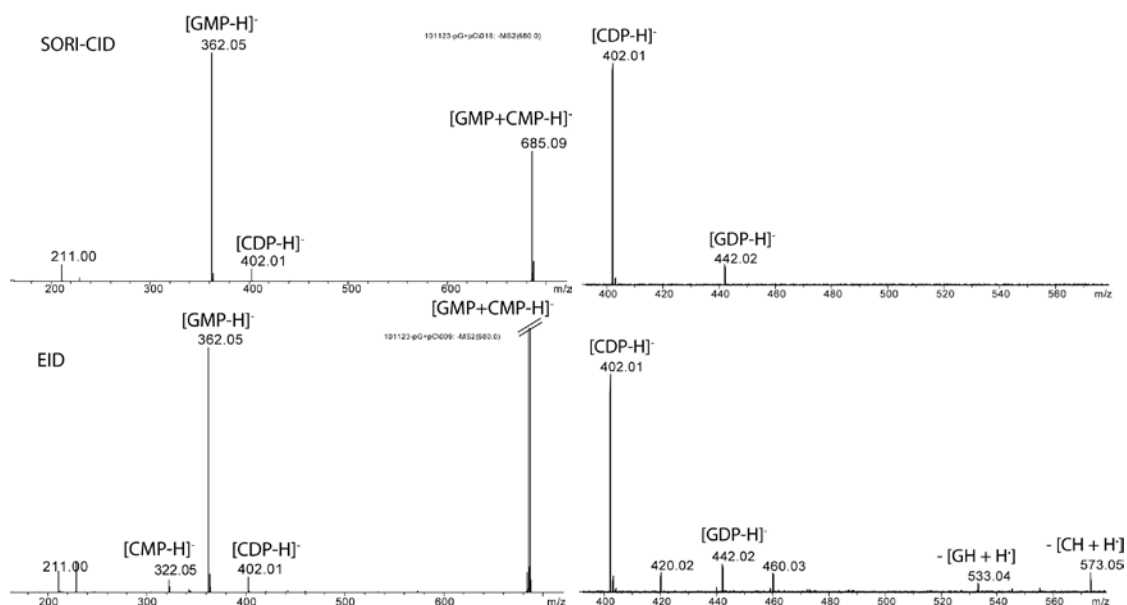


Figure 22. Spectres de SORI-CID et EID du dimère $[GMP+CMP-H]^-$ m/z 685 (à gauche) et agrandissement de la zone m/z 400 à m/z 580.

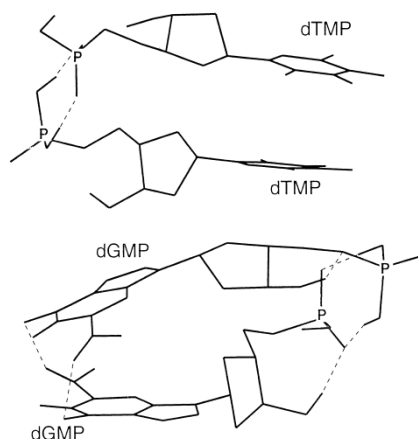
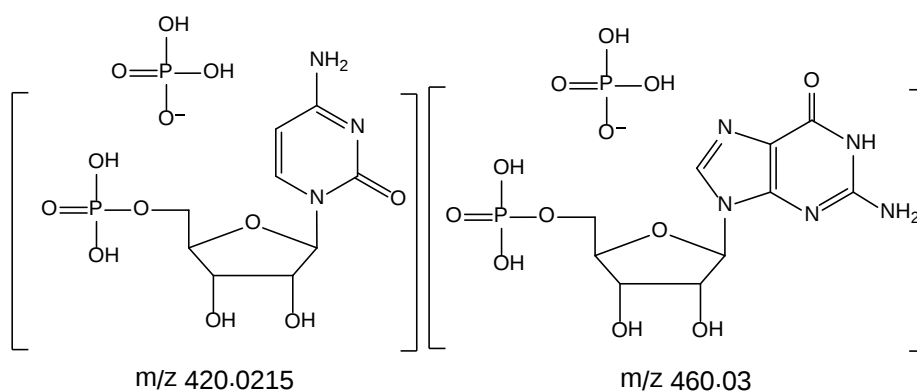


Schéma 9. Structure de dimère en phase gazeuse proposé par William et ses collègues (85).

2.4. Conclusion

Les spectres EID présentent plus d'ions fragments que les spectres SORI-CID, les ions fragments observés dans les spectres SORI-CID l'étant également dans les spectres EID. En SORI-CID, les fragmentations par activation vibrationnelle sont principalement conduites par la charge, alors qu'en EID, des dissociations induites par le radical ont pu être mises en évidence. La principale différence entre le SORI-CID et l'EID est la formation des ions fragment à nombre impair d'électrons qui sont produits uniquement en mode EID. Par ailleurs, la rupture au niveau du ribose et du désoxyribose a été détectée dans les spectres EID. Ces ions produits sont particulièrement importants pour localiser l'emplacement des substituants sur le ribose notamment, la position du groupe phosphate qui peut en principe être localisé en 3' et en 5'. Une expérience MS^3 (EID/IRMPD) a mis en évidence un processus par étapes impliquant la formation d'un complexe ion-dipôle. La formation de ce complexe est liée à la conformation en phase gazeuse initiale de l'ion précurseur, vraisemblablement due à la formation d'un pont salin intra-moléculaire (calculs théoriques en cours). Cela démontre que les liaisons non-covalentes peuvent être préservées en EID. Enfin, une expérience MS^3 (EID/IRMPD) réalisé sur l'ion intermédiaire $[GMP-2H]^+$ démontre que tous les fragments spécifiques de l'EID ont été produits consécutivement à la perte de H^+ à partir de l'ion précurseur $[GMP-H]^+$. Le mode EID semble être un outil intéressant pour étudier la structure moléculaire et les interactions non-covalentes.

3. Analyse de l'ADN en mode positif : comparaison des modes d'activation SORI-CID, ECD et EDD.

3.1. Introduction

Depuis l'introduction de l'électronébulisation par Fenn (86), la spectrométrie de masse est devenue un outil très utile pour l'analyse des biomolécules. L'ionisation par *electrospray* peut être réalisée en mode positif ou en mode négatif, permettant ainsi d'étendre son domaine d'applications. En solution, l'ADN est favorablement déprotoné grâce à la présence des groupes phosphates avec $pK_a < 1$. Ainsi, parce que l'état «naturel» des oligonucléotides est déprotoné, ils ont été étudiés principalement en phase gazeuse en mode d'ionisation négative (72,87,88). Cependant des travaux de Loo *et al.* (89) ont démontré que les oligonucléotides peuvent être amenés en phase gazeuse sous forme d'ions positifs multiprotonés. Dans ce cas, l'état de charge des oligonucléotides est dépendant des nucléobases présentes dans la séquence. Roger *et al.* (90) ont étudié des dinucléotides en mode positif et ont proposé des mécanismes pour expliquer les ions fragments observés sur les spectres CID. McCloskey *et al.* ont étudié des oligomères de plus grande taille (4-mer) en mode positif qu'ils ont comparé avec les résultats obtenus en mode négatif (91). Ils ont observé des comportements similaires au mode négatif. Ainsi les ions fragments principaux correspondent également à la série w_j^{m+} et $[a_i-B]^{n+}$. Les ruptures donnant les ions fragments des séries w_j^{m+} et $[a_i-B]^{n+}$ ne sont pas observées quand la base en position i est une thymine.

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'ADN sous forme de simples brins chargés positivement. La dissociation des cations d'oligonucléotides a été étudiée en utilisant des bombardements d'électrons avec une énergie cinétique relativement élevée et en activation SORI-CID. L'utilisation d'électrons rapides sur des ions multiprotonés a été développée par Zubarev *et al.* (69) sur des peptides multiprotonés. Ils ont obtenu des ions positifs ayant perdu un ou plusieurs électrons (*charge stripping*) conduisant à l'augmentation de leur état de charge. Cette méthode a été appelée « *Electron Ionization Dissociation* » abrégée en EID mais cette appellation est un peu ambiguë car EID est plus souvent utilisé pour décrire les expériences de dissociation induite par électrons (comme dans ce manuscrit).

Ensuite les fragmentations produites par cette méthode ont été comparées avec les résultats obtenus par ECD. Les auteurs constaté que les ions fragments produits par *Electron Ionization Dissociation* sont partiellement différents de ceux obtenus par ECD, donc cette méthode peut être utilisée en complément de l'ECD.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux oligonucléotides multiprotonés. Notre objectif était de comprendre le processus de protonation et de dissociation des ions d'oligonucléotides en phase gazeuse en particulier pour les séquences riches en thymine.

3.2. Résultats

3.2.1. Spectre de masse d'ADN en mode positif

La *Figure 23* montre le spectre de masse ESI de l'ADN d(GT₅) enregistré en mode d'ionisation positive. Comme pour le mode négatif, les paramètres sont optimisés pour assurer la transmission des ions autour de m/z 900. Dans le spectre de masse, on observe l'ion doublement chargé comme pic de base ($[M + 2H]^{2+}$, m/z 914). Deux ions fragments sont présents, un de la série y_j (y_5^{2+} , m/z 730), un de la série w_j (w_4^{2+} , m/z 618), cette dernière série étant habituellement observée dans le mode positif (91). L'échange de proton avec le sodium est détecté ($[M + H + Na]^{2+}$, m/z 905), cet échange est aussi observé en mode négatif. L'échange de proton avec le potassium ($[M + H + K]^{2+}$, m/z 913) est aussi observé pendant que ce dernier n'est pas observé dans nos spectres d'ADN 6-mer en mode négatif. L'abondance de l'ion précurseur est du même ordre de grandeur qu'en mode négatif, bien que dans l'ADN il y ait plusieurs groupes phosphate. Rodgers *et al.* ont proposé qu'en mode positif ce soit la base (site le plus basique) qui porte la charge (90).

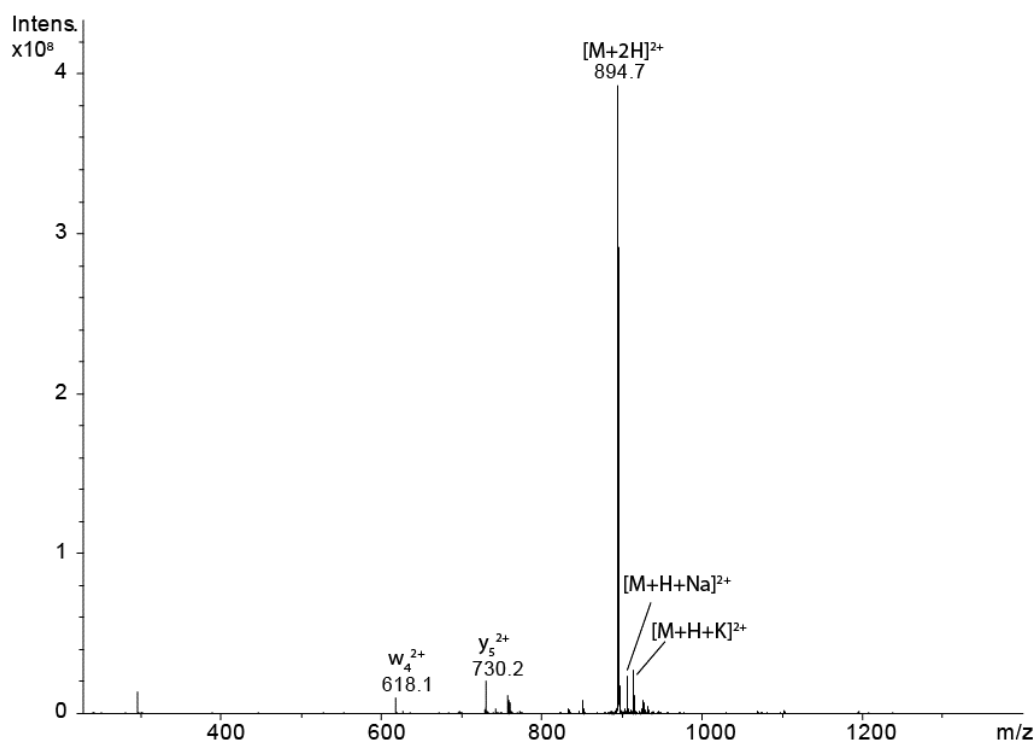


Figure 23 : Spectre ESI de l'ADN 6mer en mode positif.

3.2.2. Activation par EDD de l'ADN (GT₅) multiprotoné

La figure 24 présente les spectres SORI-CID et EDD « hot-ECD » de l'ADN 6mer (GT₅) doublement protoné $[M+2H]^{2+}$ (m/z 894). Dans le spectre SORI-CID, la base protonée ($[G + H]^+$, m/z 152) est détectée comme le pic de base, la série d'ions complète w_j^+ est détectée (avec ou sans la perte consécutive de H₂O), l'abondance de l'ion fragment w_5^+ (m/z 1539) est beaucoup plus grande par rapport aux autres ions fragments de la même série. On observe également la série d'ions $[x_j - T + H]^+$; cette série d'ions a été observée par Wang *et al.* (92) lors de leur étude de l'ADN dT₈.

Sous ECD, avec émission d'électrons de faible énergie cinétique, seul la capture d'électron sans dissociation a été obtenue, induisant la formation d'un ion de charge réduite $[M+2H]^+$. Des ions fragments ont été formés lorsque l'énergie cinétique des électrons a été augmentée à plus de 13 eV. Ces conditions dites de « hot-ECD » ont conduit à la formation d'un ion $[M+2H]^{3+}$ impliquant le détachement d'un électron. Nous avons appelé ce mode EDD en mode positif (pos-EDD).

Chapitre III : Résultats et discussion

En dehors des ions fragments observés dans le spectre SORI-CID, le spectre pos-EDD présente des ions supplémentaires comme les ions fragments internes ($[T_i:T_i]$) impliquant la perte de thymine. Le rapport d'abondance entre $w_j^+/[w_j-H_2O]^+$ est plus élevé que celui calculé pour le spectre SORI-CID, ainsi que l'abondance relative des ions fragments de la série $[x_j-T+H]^+$. Un pic inattendu est détecté à m/z 596 correspondant à l'ion précurseur radicalaire triplement chargé avec une erreur de masse de 0,3 ppm. L'existence de cet ion démontre qu'il est possible de détacher un électron à partir d'un ion chargé positivement (*electron stripping*). Pour expliquer ce phénomène, nous pouvons envisager une forme zwitterionique où des charges positives et négatives sont présentes sur la même espèce. Dans ce cas, l'électron est détaché à partir du site chargé négativement.

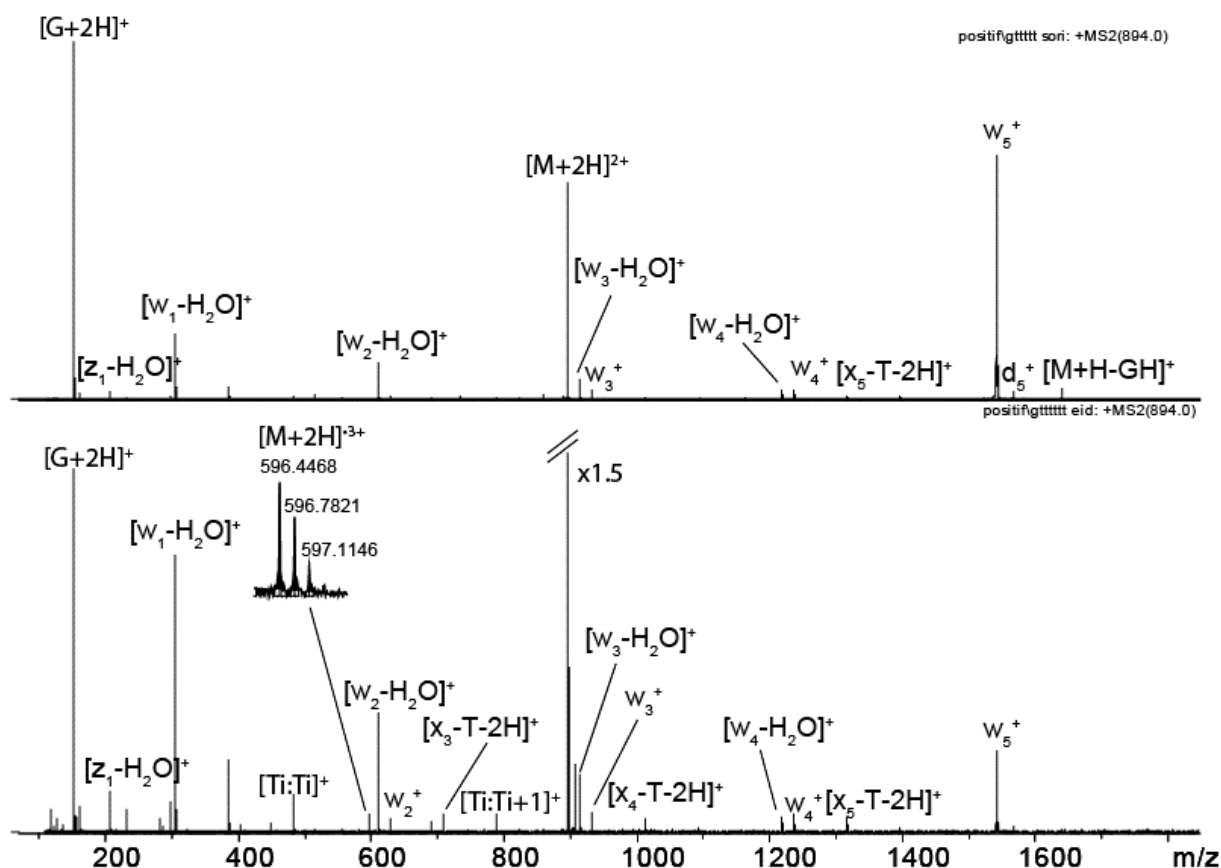


Figure 24. En haut SORI-CID et en bas posEDD de l'ADN (GT_5) doublement chargé.

3.2.3. Spectre pos-EDD de l'ADN 12-mer ($T_2(GC)_4T_2$) triplement chargé $[M+3H]^{3+}$

La Figure 25 présente le spectre pos-EDD de l'ion $[M + 3H]^{3+}$ (m/z 1209) pour l'oligonucléotide $T_2(GC)_4T_2$. Le spectre affiche à la fois des ions issus de la capture d'électrons $[M + 3H]^{\bullet 2+}$ (m/z 1815) et de détachement d'électrons $[M + 3H]^{\bullet 4+}$ (m/z 907). Le détachement d'électrons est plus efficace que celui obtenu pour $d(GT_5)$, le rapport d'abondance relative des ions $[M + 3H]^{\bullet 4+}/[M + 3H]^{3+}$ dans ce spectre est de 0.3 tandis que dans le spectre pos-EDD de $d(GT_5)$ le rapport $[M + 2H]^{\bullet 3+}/[M + 2H]^{2+}$ est de 0.014. Grâce à une mesure de masse précise, l'ion fragment $[M + 3H - G]^{2+}$ (m/z 1738,777) est identifié comme étant produit directement à partir du précurseur qui a perdu l'ion complémentaire $[G+H]^+$ et non pas à partir de l'ion de charge réduite $[M + 3H]^{\bullet 2+}$. Dans ce spectre, la plupart des ions fragments semblent être produits par EID (*electron induced dissociation*). Aucun ion fragment clairement produit par la capture ou le détachement d'un électron tel comme un ion fragment radical, est détecté. Par contre, un ion fragment interne $[T_2:T_2]^+$ (m/z 483) semble issu d'un processus radicalaire, car la formation de cet ion implique la perte de thymine, ce qui est difficilement obtenu par les modes d'activations classiques comme le CID (10). On peut remarquer que la thymine protonée n'est pas observée, alors que la guanine protonée et la cytosine protonée sont détectées. Cela est en accord avec les valeurs d'affinité protonique, et en particulier la faible valeur d'AP de la thymine (13). Dans ce spectre, aucune série complète d'ions n'est observée, le peu d'ions fragments pouvant être expliqué par le fait que de nombreuses interactions non-covalentes intra-moléculaire sont présentes dans l'ADN.

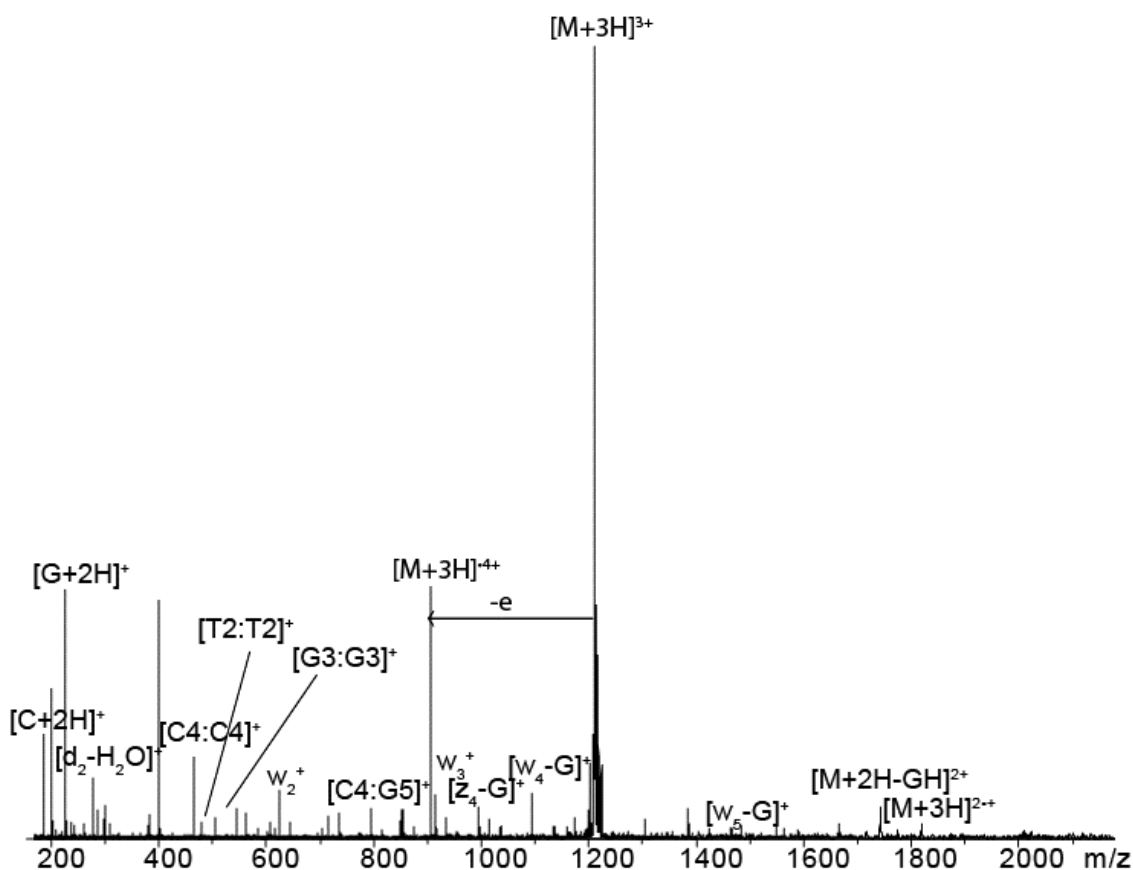


Figure 25. EDD de l'ADN 12mer ($T_2(GC)_4T_2$ $[M+3H]^{3+}$) avec un état de charge plus grand que celui de l'ADN 6mer.

3.2.4. Evolution de l'énergie cinétique des électrons

La figure 26 présente une série de spectres pos-EDD de $[M+3H]^{3+}$ pour l'oligonucléotide protoné $d(T_2(GC)_4T_2)$ enregistrés à différentes valeurs d'énergie cinétique des électrons. A basse énergie (4.5 eV), seulement les ions issus de la capture d'électron sont observés. Pour des énergies cinétiques supérieures ou égale à 9 eV, l'ion de charge réduite est toujours présent mais certains ions fragments sont également détectés comme l'ion $[M + 3H-G]^{2+}$ (m/z 1738) qui est produit à partir de l'ion précurseur. Par contre, la capture d'électron est moins efficace (en tout cas son abondance relative diminue), le rapport de l'abondance entre l'ion précurseur de charge réduite $[M + 3H]^{2+}$ (m/z 1815) et l'ion précurseur $[M + 3H]^{3+}$ (m/z 1209) est de 0.35, alors que ce rapport pour les spectres enregistrés avec une énergie supérieure ou égale à 9 eV est inférieur à 0.02. Le détachement d'électrons a lieu à partir d'une énergie cinétique des électrons de 30 eV. Il faut remarquer qu'en mode négatif, le détachement d'électrons à partir d'ions multiprotonés se produit pour une énergie cinétique

des électrons d'environ 19 eV [3]. A partir de 30 eV, on observe une augmentation significative de l'abondance relative des ions fragments. L'ion de charge réduite, produit par capture d'un électron est toujours présent mais en très faible abondance. Il faut noter que ces spectres ont été enregistrés avec un temps d'émission d'électrons de l'ordre de quelque ms alors qu'en EDD en mode négatif des temps de plusieurs secondes ont été utilisés.

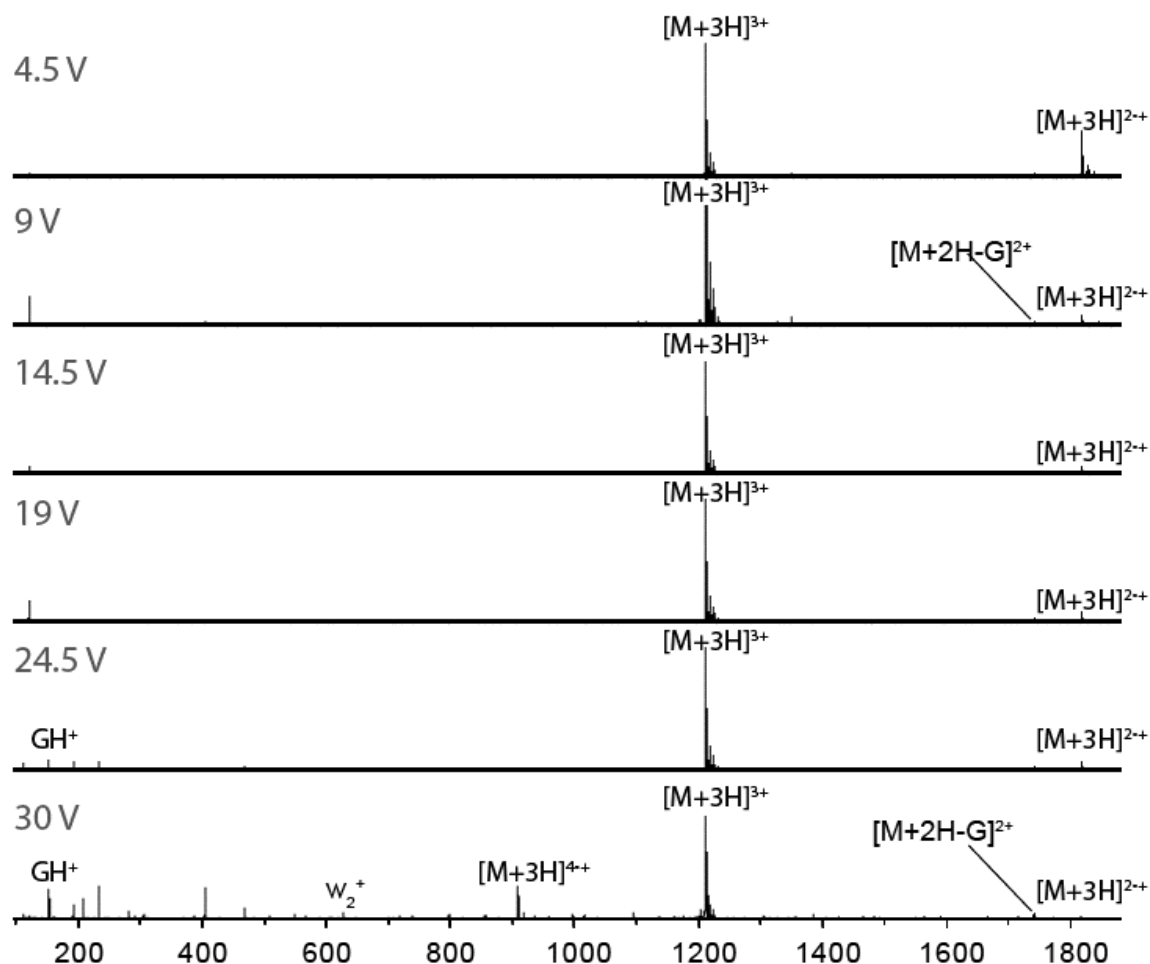


Figure 26. Evolution du signal des fragments en fonction de l'énergie cinétique des électrons.

3.3. Conclusion

En mode positif, l'efficacité d'ionisation de l'ADN est comparable au mode négatif. Le peu d'ions fragments sur le spectre de masse ESI montre que l'ion multichargé est stable, bien que les nucléobases soient protonées ce qui aurait facilité leur dissociation. Sous activation CID, les fragments produits à partir de l'ADN multiprotoné sont analogues à ceux produits à partir de l'ADN multidéprotoné. Les séries d'ions fragments comme w_j^+ sont détectées, par contre, la perte de H_2O à partir de cette série, est très importante en mode

positif alors qu'en mode négatif, la perte d'eau est très peu présente. Comme en mode négatif, les ions fragments de la série $[a_i-B]^+$ ne sont pas observés quand la base présente est la thymine. Le spectre pos-EDD donne des ions fragments souvent identiques à ceux détectés sur le spectre SORI-CID avec une légère différence d'intensité relative. Dans le spectre pos-EDD de l'ADN multiprotoné, le détachement d'électrons est détecté en faible intensité pour l'état de charge +2. Pour un état de charge plus important avec une séquence d'ADN plus longue (12-mer), le détachement d'électrons est beaucoup plus important. Le détachement d'électrons à partir des ions positifs exige un bombardement par des électrons possédant une énergie cinétique relativement élevée. Nous pensons que l'existence de zwitterions, présents à l'origine lors de l'activation, est à l'origine de la perte d'un électron à partir des ions globalement positif. Il faut souligner que nous n'avons observé ce phénomène que pour les séquences oligonucléotiques possédant au moins une guanine.

Références 3

1. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., and Whitehouse, C. M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science (Washington, D. C., 1883-)* 246, 64-71.
2. Koester, H., Tang, K., Fu, D.-J., Braun, A., van, d. B. D., Smith, C. L., Cotter, R. J., and Cantor, C. R. (1996) A strategy for rapid and efficient DNA sequencing by mass spectrometry, *Nat. Biotechnol.* 14, 1123-1128.
3. Griffey, R. H., Greig, M. J., Gaus, H. J., Liu, K., Monteith, D., Winniman, M., and Cummins, L. L. (1997) Characterization of oligonucleotide metabolism in vivo via liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry with a quadrupole ion trap mass spectrometer, *J. Mass Spectrom.* 32, 305-313.
4. Guo, X., Bruist, M. F., Davis, D. L., and Bentzley, C. M. (2005) Secondary structural characterization of oligonucleotide strands using electrospray ionization mass spectrometry, *Nucleic Acids Res.* 33, 3659-3666.
5. Chowdhury, G., and Guengerich, F. P. (2008) Direct detection and mapping of sites of base modification in DNA fragments by tandem mass spectrometry, *Angew. Chem., Int. Ed.* 47, 381-384.
6. Flora, J. W., Hannis, J. C., and Muddiman, D. C. (2001) High-Mass Accuracy of Product Ions Produced by SORI-CID Using a Dual Electrospray Ionization Source Coupled with FTICR Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 73, 1247-1251.
7. Wan, K. X., and Gross, M. L. (2001) Fragmentation mechanisms of oligodeoxynucleotides: effects of replacing phosphates with methylphosphonates and thymines with other bases in T-rich sequences, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12, 580-589.
8. Monn, S. T. M., and Schuerch, S. (2007) New Aspects of the Fragmentation Mechanisms of Unmodified and Methylphosphonate-Modified Oligonucleotides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18, 984-990.
9. Monn, S. T. M., and Schürch, S. (2007) New Aspects of the Fragmentation Mechanisms of Unmodified and Methylphosphonate-Modified Oligonucleotides, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 18, 984-990.
10. Wan, K. X., Gross, J., Hillenkamp, F., and Gross, M. L. (2001) Fragmentation mechanisms of oligodeoxynucleotides studied by H/D exchange and electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12, 193-205.
11. Wang, Z., Wan, K. X., Ramanathan, R., Taylor, J. S., and Gross, M. L. (1998) Structure and fragmentation mechanisms of isomeric T-rich oligodeoxynucleotides: a comparison of four tandem mass spectrometric methods, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 9, 683-691.
12. Vrkic, A. K., O'Hair, R. A. J., Foote, S., and Reid, G. E. (2000) Fragmentation reactions of all 64 protonated trimer oligodeoxynucleotides and 16 mixed base tetramer oligodeoxynucleotides via tandem mass spectrometry in an ion trap, *Int. J. Mass Spectrom.* 194, 145-164.
13. Russo, N., Toscano, M., Grand, A., and Jolibois, F. (1998) Protonation of thymine, cytosine, adenine, and guanine DNA nucleic acid bases: Theoretical investigation into the framework of density functional theory, *J. Comput. Chem.* 19, 989-1000.
14. Zubarev, R. A., Horn, D. M., Fridriksson, E. K., Kelleher, N. L., Kruger, N. A., Lewis, M. A., Carpenter, B. K., and McLafferty, F. W. (2000) Electron Capture Dissociation for Structural Characterization of Multiply Charged Protein Cations, *Anal. Chem.* 72, 563-573.

15. Zubarev, R. A. (2003) Electron-capture dissociation tandem mass spectrometry, *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 12-16.
16. Zubarev, R. A. (2003) Reactions of polypeptide ions with electrons in the gas phase, *Mass Spectrom. Rev.* 22, 57-77.
17. Syka, J. E. P., Coon, J. J., Schroeder, M. J., Shabanowitz, J., and Hunt, D. F. (2004) Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 9528-9533.
18. Mirgorodskaya, E., Roepstorff, P., and Zubarev, R. A. (1999) Localization of O-glycosylation sites in peptides by electron capture dissociation in a Fourier Transform mass spectrometer, *Anal. Chem.* 71, 4431-4436.
19. Budnik, B. A., Haselmann, K. F., and Zubarev, R. A. (2001) Electron detachment dissociation of peptide di-anions: an electron-hole recombination phenomenon, *Chem. Phys. Lett.* 342, 299-302.
20. Wolff, J. J., Amster, I. J., Chi, L., and Linhardt, R. J. (2007) Electron Detachment Dissociation of Glycosaminoglycan Tetrasaccharides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18, 234-244.
21. Xu, Y., Afonso, C., Wen, R., and Tabet, J.-C. (2008) Investigation of double-stranded DNA/drug interaction by ESI/FT ICR: orientation of dissociations relates to stabilizing salt bridges, *J. Mass Spectrom.* 43, 1531-1544.
22. Bentley, T. W., and Johnstone, R. A. W. (1970) Mechanism and structure in mass spectrometry: a comparison and other chemical processes, *Advan. Phys. Org. Chem.* 8, 151-269.
23. Cody, R. B., and Freiser, B. S. (1979) Electron impact excitation of ions from organics: an alternative to collision induced dissociation, *Anal. Chem.* 51, 547-551.
24. Liu, B., Hvelplund, P., Nielsen, S. B., and Tomita, S. (2003) Electron loss and dissociation in high energy collisions between multiply charged oligonucleotide anions and noble gases, *Int. J. Mass Spectrom.* 230, 19-24.
25. Hvelplund, P., Nielsen, S. B., Sorensen, M., Andersen, J. U., and Jorgensen, T. J. D. (2001) Electron loss from multiply protonated lysozyme ions in high energy collisions with molecular oxygen, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12, 889-893.
26. Yang, J., Mo, J., Adamson, J. T., and Haakansson, K. (2005) Characterization of oligodeoxynucleotides by electron detachment dissociation Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Anal. Chem.* 77, 1876-1882.
27. Gabelica, V., Rosu, F., De, P. E., Antoine, R., Tabarin, T., Broyer, M., and Dugourd, P. (2007) Electron Photodetachment Dissociation of DNA Anions with Covalently or Noncovalently Bound Chromophores, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18, 1990-2000.
28. Antoine, R., Joly, L., Tabarin, T., Broyer, M., Dugourd, P., and Lemoine, J. (2007) Photo-induced formation of radical anion peptides. Electron photodetachment dissociation experiments, *Rapid Commun Mass Spectrom* 21, 265-268.
29. Yoo, H. J., Liu, H., and Hakansson, K. (2007) Infrared Multiphoton Dissociation and Electron-Induced Dissociation as Alternative MS/MS Strategies for Metabolite Identification, *Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.)* 79, 7858-7866.
30. Comisarow, M. B., Grassi, V., and Parisod, G. (1978) Fourier transform ion cyclotron double resonance, *Chem. Phys. Lett.* 57, 413-416.
31. Jurchen, J. C., Garcia, D. E., and Williams, E. R. (2003) Gas-phase dissociation pathways of multiply charged peptide clusters, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14, 1373-1386.
32. Bourgoïn-Voillard, S., Zins, E.-L., Fournier, F., Jacquot, Y., Afonso, C., Pepe, C., Leclercq, G., and Tabet, J.-C. (2009) Stereochemical Effects During [M - H]-Dissociations of Epimeric 11-OH-17 β -Estradiols and Distant Electronic Effects of

- Substituents at C(11) Position on Gas Phase Acidity, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20, 2318-2333.
33. Theissling, C. B., Nibbering, N. M. M., and Meyerson, S. (1976) The long-lived molecular ion of propionitrile: An ion cyclotron resonance study, *Org. Mass Spectrom.* 11, 838-843.
34. Lin, C., Cournoyer, J. J., and O'Connor, P. B. (2007) Use of a Double Resonance Electron Capture Dissociation Experiment to Probe Fragment Intermediate Lifetimes, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18, 165.
35. Dunbar, R. C. (1968) Ion-molecule chemistry of diborane by ion cyclotron resonance, *J. Amer. Chem. Soc.* 90, 5676-5682.
36. Bowers, M. T., Elleman, D. D., and Beauchamp, J. L. (1968) Ion cyclotron resonance of olefins. I. Study of the ion-molecule reactions in electron-impacted ethylene, *J. Phys. Chem.* 72, 3599-3612.
37. Beauchamp, J. L., and Caserio, M. C. (1972) Ion-molecule reactions of 2-butanol by ion cyclotron resonance spectroscopy, *J. Amer. Chem. Soc.* 94, 2638-2646.
38. Freiser, B. S., McMahon, T. B., and Beauchamp, J. L. (1973) Ion ejection phenomena in ion cyclotron double resonance experiments, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 12, 249-255.
39. Houriet, R., and Tabet, J. C. (1982) Ion-molecule reactions in the gas phase. II. Bimolecular nucleophilic substitution from adduct ions of 2-cyclohexenol and ammonia studied by ion cyclotron resonance spectroscopy, *Nouv. J. Chim.* 6, 565-569.
40. Alves, S., Woods, A., and Tabet, J. C. (2007) Charge state effect on the zwitterion influence on stability of non-covalent interaction of single-stranded DNA with peptides, *J. Mass Spectrom.* 42, 1613-1622.
41. Kleinnijenhuis, A. J., Heck, A. J. R., Duursma, M. C., and Heeren, R. M. A. (2005) Does Double Electron Capture Lead to the Formation of Biradicals? An ECD-SORI-CID Study on Lactacin 481, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16, 1595-1601.
42. Fournier, F., Remaud, B., Blasco, T., and Tabet, J. C. (1993) Ion-dipole complex formation from deprotonated phenol fatty acid esters evidenced by using gas-phase labeling combined with tandem mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 4, 343-351.
43. Fournier, F., Perlat, M. C., and Tabet, J. C. (1995) Control of internal proton transfers on ion-dipole complexes from [M - H]⁻ ions of diphenol esters, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9, 13-17.
44. Delvolve, A., Tabet, J.-C., Bregant, S., Afonso, C., Burlina, F., and Fournier, F. (2006) Charge dependent behavior of PNA/DNA/PNA triplexes in the gas phase, *J. Mass Spectrom.* 41, 1498-1508.
45. Boutin, M., Bich, C., Afonso, C., Fournier, F., and Tabet, J.-C. (2007) Negative-charge driven fragmentations for evidencing zwitterionic forms from doubly charged coppered peptides, *J. Mass Spectrom.* 42, 25-35.
46. Alves, S., Woods, A., Delvolve, A., and Tabet, J. C. (2008) Influence of salt bridge interactions on the gas-phase stability of DNA/peptide complexes, *Int. J. Mass Spectrom.* 278, 122-128.
47. Hunter, E. P. L., and Lias, S. G. (1998) Evaluated Gas Phase Basicities and Proton Affinities of Molecules: An Update, *J. Phys. Chem. Ref. Data* 27, 413-656.
48. Kinet, C., Gabelica, V., Balbeur, D., and De, P. E. (2009) Electron detachment dissociation (EDD) pathways in oligonucleotides, *Int. J. Mass Spectrom.* 283, 206-213.

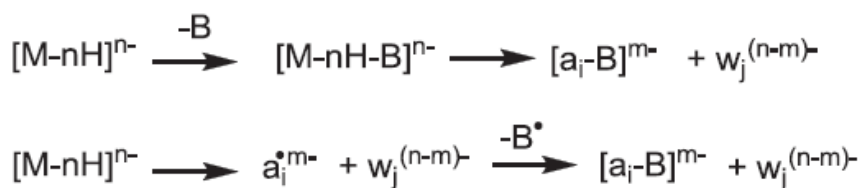
49. Lioe, H., and O'Hair, R. A. J. (2007) Comparison of collision-induced dissociation and electron-induced dissociation of singly protonated aromatic amino acids, cystine and related simple peptides using a hybrid linear ion trap-FT-ICR mass spectrometer, *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 1429-1437.
50. Wolff, J. J., Laremore, T. N., Aslam, H., Linhardt, R. J., and Amster, I. J. (2008) Electron-Induced Dissociation of Glycosaminoglycan Tetrasaccharides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19, 1449-1458.
51. Gabelica, V., Rosu, F., Tabarin, T., Kinet, C., Antoine, R., Broyer, M., De, P. E., and Dugourd, P. (2007) Base-Dependent Electron Photodetachment from Negatively Charged DNA Strands upon 260-nm Laser Irradiation, *J. Am. Chem. Soc.* 129, 4706-4713.
52. Chen, E. C., and Chen, E. S. (2010) Role of spin in biological processes: O₂, NO, nucleobases, nucleosides, nucleotides and Watson-Crick base pairs, pp PHYS-455, American Chemical Society.
53. Roca-Sanjuan, D., Merchan, M., Serrano-Andres, L., and Rubio, M. (2008) Ab initio determination of the electron affinities of DNA and RNA nucleobases, *J. Chem. Phys.* 129, 095104/095101-095104/095111.
54. Yang, X., Wang, X.-B., Vorpagel, E. R., and Wang, L.-S. (2004) Direct experimental observation of the low ionization potentials of guanine in free oligonucleotides by using photoelectron spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17588-17592.
55. Kim, H. S., and LeBreton, P. R. (1996) UV Photoelectron and ab Initio Quantum Mechanical Evaluation of Nucleotide Ionization Potentials in Water-Counterion Environments: π Polarization Effects on DNA Alkylation by Carcinogenic Methylating Agents, *J. Am. Chem. Soc.* 118, 3694-3707.
56. Ni, J., Pomerantz, S. C., Rozenski, J., Zhang, Y., and McCloskey, J. A. (1996) Interpretation of Oligonucleotide Mass Spectra for Determination of Sequence Using Electrospray Ionization and Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 68, 1989-1999.
57. Yang, J., and Hakansson, K. (2009) Characterization of oligodeoxynucleotide fragmentation pathways in infrared multiphoton dissociation and electron detachment dissociation by Fourier transform ion cyclotron double resonance, *Eur. J. Mass Spectrom.* 15, 293-304.
58. Zubarev, R. A., Witt, M., and Baykut, G. (2005) Two-Fold Efficiency Increase by Selective Excitation of Ions for Consecutive Activation by Ion-Electron Reactions and Vibrational Excitation in Tandem Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 77, 2992-2996.
59. Mayer, P. M., and Poon, C. (2009) The mechanisms of collisional activation of ions in mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 28, 608-639.
60. Habibi-Goudarzi, S., and McLuckey, S. A. (1995) Ion trap collisional activation of the deprotonated deoxymononucleoside and deoxydinucleoside monophosphates, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 6, 102-113.
61. Stensballe, A., Jensen, O. N., Olsen, J. V., Haselmann, K. F., and Zubarev, R. A. (2000) Electron capture dissociation of singly and multiply phosphorylated peptides, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 1793-1800.
62. Breuker, K., Oh, H., Horn, D. M., Cerda, B. A., and McLafferty, F. W. (2002) Detailed unfolding and folding of gaseous ubiquitin ions characterized by electron capture dissociation, *J. Am. Chem. Soc.* 124, 6407-6420.
63. Han, L., and Costello, C. E. (2011) Electron transfer dissociation of Milk oligosaccharides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22, 997-1013.
64. Adamson, J. T., and Hakansson, K. (2007) Electron Detachment Dissociation of Neutral and Sialylated Oligosaccharides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18, 2162-2172.

65. Yang, J., and Hakansson, K. (2006) Fragmentation of Oligoribonucleotides from Gas-Phase Ion-Electron Reactions, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 17, 1369-1375.
66. Budnik, B. A., Haselmann, K. F., Elkin, Y. N., Gorbach, V. I., and Zubarev, R. A. (2003) Applications of Electron-Ion Dissociation Reactions for Analysis of Polycationic Chito-Oligosaccharides in Fourier Transform Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 75, 5994-6001.
67. Budnik, B. A., and Zubarev, R. A. (2000) MH₂⁺ ion production from protonated polypeptides by electron impact: observation and determination of ionization energies and a cross-section, *Chem. Phys. Lett.* 316, 19-23.
68. Berkowitz, J. (2000) The quantum yield of ionization, *Phys. Essays* 13, 248-255.
69. Fung, Y. M. E., Adams, C. M., and Zubarev, R. A. (2009) Electron Ionization Dissociation of Singly and Multiply Charged Peptides, *J. Am. Chem. Soc.* 131, 9977-9985.
70. Ho, Y., and Kebarle, P. (1997) Studies of the dissociation mechanisms of deprotonated mononucleotides by energy resolved collision-induced dissociation, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 165/166, 433-455.
71. Shaw, S. J., Desiderio, D. M., Tsuboyama, K., and McCloskey, J. A. (1970) Mass spectrometry of nucleic acid components. Analogs of adenosine, *J. Amer. Chem. Soc.* 92, 2510-2522.
72. Cerny, R. L., Gross, M. L., and Grotjahn, L. (1986) Fast atom bombardment combined with tandem mass spectrometry for the study of dinucleotides, *Anal. Biochem.* 156, 424-435.
73. Aravind, G., Antoine, R., Klaerke, B., Lemoine, J., Racaud, A., Rahbek, D. B., Rajput, J., Dugourd, P., and Andersen, L. H. (2010) Sub-microsecond photodissociation pathways of gas phase adenosine 5'-monophosphate nucleotide ions, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12, 3486-3490.
74. Nielsen, S. B., Andersen, J. U., Forster, J. S., Hvelplund, P., Liu, B., Pedersen, U. V., and Tomita, S. (2003) Photodestruction of Adenosine 5'-Monophosphate (AMP) Nucleotide Ions in vacuo: Statistical versus Nonstatistical Processes, *Phys. Rev. Lett.* 91, 048302/048301-048302/048304.
75. Marcum, J. C., Halevi, A., and Weber, J. M. (2009) Photodamage to isolated mononucleotides-photodissociation spectra and fragment channels, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11, 1740-1751.
76. Bagag, A., Giuliani, A., and Laprevote, O. (2007) Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of nucleic bases, ribonucleosides and ribonucleotides, *Int. J. Mass Spectrom.* 264, 1-9.
77. Rodgers, M. T., Campbell, S., Marzluff, E. M., and Beauchamp, J. L. (1994) Low-energy collision-induced dissociation of deprotonated dinucleotides: determination of the energetically favored dissociation pathways and the relative acidities of the nucleic acid bases, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 137, 121-149.
78. Domon, B., and Costello, C. E. (1988) A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates, *Glycoconjugate J.* 5, 397-409.
79. Harvey, D. J., Bateman, R. H., and Green, M. R. (1997) High-energy collision-induced fragmentation of complex oligosaccharides ionized by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 32, 167-187.
80. Naumov, S., and von, S. C. (2008) Guanine-derived radicals: dielectric constant-dependent stability and UV/Vis spectral properties: a DFT study, *Radiat. Res.* 169, 364-372.

81. Gidden, J., and Bowers, M. T. (2003) Gas-Phase Conformations of Deprotonated and Protonated Mononucleotides Determined by Ion Mobility and Theoretical Modeling, *J. Phys. Chem. B* 107, 12829-12837.
82. Zubarev, R. A. (2004) Electron-capture dissociation tandem mass spectrometry, *Curr Opin Biotechnol* 15, 12-16.
83. Xie, Y., Zhang, J., Yin, S., and Loo, J. A. (2006) Top-Down ESI-ECD-FT-ICR Mass Spectrometry Localizes Noncovalent Protein-Ligand Binding Sites, *J. Am. Chem. Soc.* 128, 14432-14433.
84. Kang, H., Dedonder-Lardeux, C., Jouvét, C., Martrenchard, S., Gregoire, G., Desfrancois, C., Schermann, J. P., Barat, M., and Fayeton, J. A. (2004) Photoinduced dissociation of protonated tryptophan TrpH⁺: A direct dissociation channel in the excited states controls the hydrogen atom loss, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6, 2628-2632.
85. Strittmatter, E. F., Schnier, P. D., Klassen, J. S., and Williams, E. R. (1999) Dissociation energies of deoxyribose nucleotide dimer anions measured using blackbody infrared radiative dissociation, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10, 1095-1104.
86. Yamashita, M., and Fenn, J. B. (1984) Application of electrospray mass spectrometry in medicine and biochemistry, *Iyo Masu Kenkyukai Koenshu* 9, 203-206.
87. Nordhoff, E., Kirpekar, F., and Roepstorff, P. (1997) Mass spectrometry of nucleic acids, *Mass Spectrom. Rev.* 15, 69-138.
88. Isern-Flecha, I., Jiang, X. Y., Cooks, R. G., Pfliegerer, W., Chae, W. G., and Chang, C. J. (1987) Characterization of an alkylated dinucleotide by desorption chemical ionization and tandem mass spectrometry, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 14, 17-22.
89. Sannes-Lowery, K. A., Mack, D. P., Hu, P., Mei, H.-Y., and Loo, J. A. (1997) Positive ion electrospray ionization mass spectrometry of oligonucleotides, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 8, 90-95.
90. Rodgers, M. T., Campbell, S., Marzluff, E. M., and Beauchamp, J. L. (1995) Site-specific protonation directs low-energy dissociation pathways of dinucleotides in the gas phase, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 148, 1-23.
91. Ni, J., Mathews, M. A. A., and McCloskey, J. A. (1997) Collision-induced dissociation of polyprotonated oligonucleotides produced by electrospray ionization, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11, 535-540.
92. Wang, P., Bartlett, M. G., and Martin, L. B. (1997) Electrospray collision-induced dissociation mass spectra of positively charged oligonucleotides, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11, 846-856.

Conclusion générale

L'objectif de ce travail était d'explorer les fragmentations d'oligonucléotides chargés négativement et positivement par bombardement d'électrons. Les ions sont formés dans une source *electrospray* et ensuite transférés dans la cellule ICR, pour être activés et détectés en haute résolution. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'étude d'oligonucléotides multidéprotonés, excités par des électrons ayant des énergies cinétiques relativement élevées (~ 20 eV). La comparaison de ces méthodes avec les méthodes classiques comme le CID donne des résultats complémentaires. Le point commun entre ces méthodes est la présence de séries d'ions fragments $[a_i-B]^-$ et w_j^- . Les abondances relatives sont par contre différentes. En particulier, l'EDD conduit à une fragmentation plus aléatoire le long de la séquence nucléotidique. Lors du bombardement par des électrons, des ions radicaux sont observés ainsi que des pertes de bases thymine qui ne sont pas détectés par CID. Des techniques particulières comme la double résonance et des expériences MS^3 « hybride » EDD/CID ou EDD/IRMPD ont ensuite été utilisées afin d'explorer l'origine des ions fragments observés sur le spectre EDD, en particulier, les ions radicaux et les pertes de thymine. Les résultats de ces méthodes montrent que la perte de thymine est produite par la dissociation consécutive des ions radicaux de la série $a_i^{\bullet-}$. Cette perte de base est donc produite après le clivage de la séquence oligonucléotidique alors qu'en CID, la perte de base initie la rupture de la séquence.



Les résultats ont aussi permis de confirmer que par bombardement d'électrons, il y a deux chemins de fragmentation possibles.

(i) les ions précurseurs perdent un (ou plusieurs) électrons et l'anion radical de charge réduite obtenu se fragmente de façon consécutive. Dans ce cas, on parle d'EDD (*electron detachment dissociation*).

(ii) les ions précurseurs se fragmentent directement sans avoir perdu d'électrons. On parle d'EID (*electron induced dissociation*).

Nous avons également étudié les oligonucléotides avec un état de charge plus grand. Dans ce cas, l'efficacité de détachement d'électrons est plus élevée mais les fragmentations sont peu efficaces et il est nécessaire d'activer l'anion de charge réduite par activation CID ou IRMPD.

Ce travail a permis pour la première fois, par l'association de l'EDD avec éjection d'ion intermédiaire (double résonance) et de MS³ EDD/CID, de découpler les processus purement EDD (impliquant le détachement d'un électron) des processus EID (dissociation directe).

Dans la deuxième partie de ce travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au mode EID qui implique une activation de l'ion précurseur par bombardement d'électrons sans détachement d'électrons. Pour étudier cette méthode, nous avons choisi les 2'-désoxynucléotides-5'-monophosphates qui donnent des ions d'état de charge -1, en mode ESI. Par bombardement d'électrons, les 2'-désoxynucléotides-5'-monophosphates déprotonés produisent des ions fragments attendus comme les pertes de base ou la production des nucléobases déprotonés. Mais on observe également des ions fragments inattendus comme les ruptures « cross-ring » du ribose qui se produisent par les techniques particulières comme le CID de haute énergie. De façon inattendue, un complexe ion-dipôle issu de la perte du ribose, a été détecté dans le spectre EID du 2'-désoxyguanosine-5'-monophosphate. La formation de ce complexe implique une liaison non-covalente entre le groupe phosphate et la guanine. Des expériences MS³ ont permis de conforter l'hypothèse que cet ion fragment implique des liaisons non-covalentes qui existaient probablement avant l'excitation de façon intra-moléculaire.

D'autres ions fragments absents du spectre CID sont détectés sur le spectre EID et la plupart sont radicalaires. Il a été proposé que les ions fragments spécifiquement produits en EID soient issus de l'ion précurseur ayant perdu un hydrogène radical. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons isolé l'ion intermédiaire [GMP-2H]^{-•} et celui-ci a été excité par IRMPD. Le spectre MS³ EID/IRMPD montre tous les ions spécifiques du mode EID. Cette expérience de MS³ associée à une expérience d'échange H/D montrent que l'hydrogène perdu n'est pas un proton échangeable. Ainsi, nous avons pu proposer un mécanisme pour expliquer

les fragmentations par voie radicalaire. La technique EID a été utilisée dans un second temps pour l'étude de dimères non covalents. Dans ce cas, la liaison non-covalente entre deux 2'-désoxynucléotides-5-monophosphates est assurée soit par liaison hydrogène soit par un pont salin dans le cas des dimères cationisés par le sodium. Par activation EID, l'ion fragment principal de ces dimères déprotonés est le monomère déprotoné, ce dernier est aussi accompagné par les ions satellites impliquant la liaison non-covalente avec le groupe H_3PO_4 (ou NaH_2PO_4). Cela a permis de démontrer qu'en EID des liaisons non-covalentes peuvent être préservées alors que des liaisons covalentes sont rompues.

La dernière partie de ma thèse concerne l'activation des oligonucléotides multiprotonés par bombardement d'électrons d'énergie cinétique relativement élevée (hot-ECD ou pos-EDD). Ces derniers spectres montrent des ions fragments et surtout un détachement d'électrons, ce qui démontre qu'il est possible de détacher un ou plusieurs électrons à partir des ions positifs. Dans ce cas, on peut parler de phénomène d'*electron stripping*. L'énergie nécessaire pour détacher un électron à partir d'ions positifs est plus élevée qu'à partir des ions négatifs. Nous avons considéré que ce phénomène impliquait probablement l'existence d'un zwitterion.

Annexe

1. Abréviation

ADC	: Convertisseurs analogique/numérique
Ade	: Adénine
ADN	: Acide déoxynucléotide
Ado	: Adénosine
AMP	: 2'-déoxysadénosine monophosphate
APCI	: Ionisation chimique à pression atmosphérique
APPI	: photoionisation à pression atmosphérique
ARN	: Acide ribonucléique
BIRD	: Black body infrared radiative dissociation
CI	: Ionisation chimique
CID	: Collision induced dissociation
CMP	: 2'-déoxycytosine monophosphate
Cyd	: Cytidine
Cyt	: Cytosine
dAdo	: 2'-déoxyadénosine
dAMP	: Déoxyadénosine monophosphate
dCA	: Di-nucléotide adénine-cytidine
dCyd	: 2'-déoxycytidine
dGp	: 2'-déoxyguanosine monophosphate
dGuo	: 2'-déoxyguanosine
DR	: Double-résonance
dTA	: Di-nucléotide thymine-adénine
dTp	: 2'-déoxythymidine monophosphate
dUrd	: 2'-déoxyuridine
EA	: electron affinity
EDD	: Electron detachment dissociation

EID	: Electron induced dissociation
ESI	: Electrospray
ETD	: Electron transfert dissociation
EXD	: electron - dissociation
FID	: Free Induction Decay
FT/ICR	: Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass spectrometry
FWHM	: Largeur à mi-hauteur
GMP	: 2'-déoxysyguanosine monophosphate
Gua	: Guanine
Guo	: Guanosine
H/D	: Echange de proton
ICR	: Ion cyclotron résonnance
IR	: Infrarouge
IRMPD	: Infrared multiphoton dissociation
LD	: Laser désorption
<i>m/z</i>	: Masse sur charge
MALDI	: Désorption-ionisation laser assistée par matrice
MS	: Spectrométrie de masse
SORI-CID	: Sustained Off-Resonance Irradiation
SWIFT	: Stored-Waveform Inverse Fourier Transform
Th	: Thymine
Thd	: 2'-déoxythimidine
Thy	: Thymine
TMP	: 2'-déoxysythimidine monophosphate
Ura	: Uracile
Urd	: 2'-déoxyuradine

2. La source électrospray

La source électrospray a été créée en 1984 par Fenn (1) pour appliquer à des composés biologiques d'intérêts médicaux, comme les pesticides, les acides nucléiques et la pénicilline. L'intérêt de cette source est l'absence d'ion fragment des analytes dans le spectre de masse, et utilisation simple rapide qui demande moins d'échantillon. En fait la fragmentation est plus ou moins contrôlée dans la zone entre la sortie du capillaire, skimmer I et skimmer II. Cette source est donc une source d'ionisation douce permettant facilement d'observer les ions précurseurs, ce qui n'est pas le cas d'impact électronique (2) qui était largement utilisé à l'époque. De plus, certaines liaisons fragiles comme liaisons non covalentes présentes dans la solution sont préservées dans la phase gazeuse grâce à l'utilisation d'électrospray.

Depuis les chercheurs n'ont cessé d'améliorer (3) ce mode d'ionisation/désorption, selon les molécules à analyser, la précision en masse requise. Des avancées ont aussi été faites avec le couplage de la source à divers analyseurs (temps de vol TOF, quadripôle, piège ionique, spectromètre à transformée de Fourier (FT/ICR, Orbitrap), mobilité ionique IMS). Les travaux relatifs à cette source d'ions innovante se voient récompensés en 2002, lorsque Fenn reçoit le Prix Nobel de Chimie.

2.1. Parcours de l'échantillon de la source à l'analyseur

L'analyte, dilué dans un solvant adéquat, est injecté dans le capillaire métallique d'introduction de la source ESI (Figure 1) au moyen d'une seringue, par exemple. Le débit utilisé est de l'ordre de quelque $\mu\text{L}/\text{min}$ à quelques centaines de $\mu\text{L}/\text{min}$ et la température imposée au gaz de nébulisation et évaporation se trouve en général entre 30 et 300°C. Ce gaz, en générale l'azote, est introduit soit à contre courant, permettant d'augmenter le débit de l'échantillon (jusqu'à plusieurs centaines de $\mu\text{L}/\text{min}$), soit à concourant.

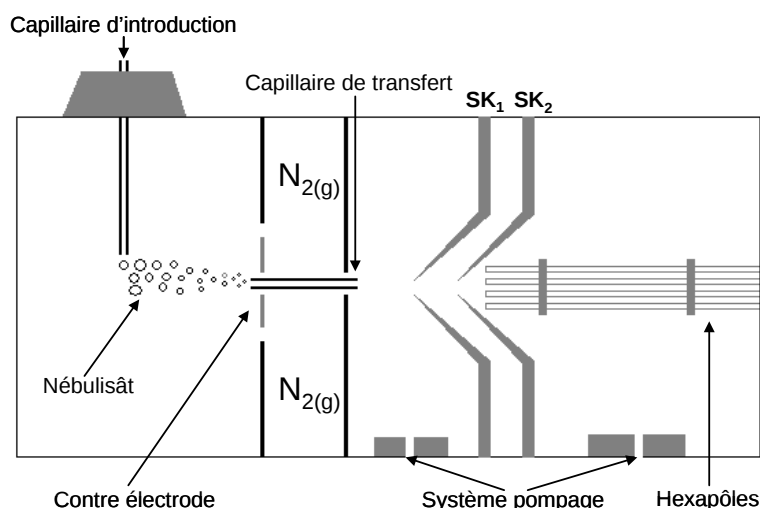


Figure 1 : Schéma d'une source électrospray, de la zone de désolvatation, et de la zone de transfert d'ions chargés

Sous la pression d'un gaz de nébulisation (N_2) et éventuellement du gaz arrivant à contre courant, la solution d'échantillon est vaporisée dans une zone à pression atmosphérique dans laquelle règne un fort champ électrique. Celui-ci résulte d'une différence de potentiels (3 à 6kV) appliquée entre la sortie du capillaire d'introduction et la contre électrode (figure). C'est dans cette zone que sont produits soit les ions solvatés après désorption, soit des agrégats chargés dont l'état de charge, positif ou négatif, dépend du signe des potentiels appliqués.

Puis, ce nébulisât chargé atteint une zone de transfert matérialisée par un capillaire de silice dont les extrémités sont métallisées. Ce dernier fait office d'interface entre la zone à pression atmosphérique de la source et la zone suivante, qui se trouve à pression réduite. Des lors, les ions subissent un gradient de pression : autour du torr en sortie du capillaire de transfert, au dixième de torr pour la région de désolvatation et jusqu'à environ 10^{-6} torr pour la zone de transfert des ions désolvatés.

Entre le capillaire de transfert et le premier cône (skimmer), une différence de potentiels (ddp), de quelques dizaines de volts seulement, permet d'achever la désolvatation des ions solvatés et des agrégats chargés. En effet, cette ddp accroît la vitesse des ions solvatés qui subissent un grand nombre de collisions (mais selon un libre parcours moyen faible). Cela signifie que les collisions sont peu énergétiques. Cette cascade de désolvatation faiblement énergétique ne permet pas dans tous les cas de produire des ions totalement libres de solvant. Celui-ci peut être éliminé dans une zone de pression plus réduite où les ions sont

accélérés à l'aide d'un second skimmer. Le libre parcours moyen des espèces est alors accru et les collisions sont plus dures, éliminant ainsi les dernières molécules de solvant. Par contre une augmentation trop forte de la ddp de cette région transfère suffisamment d'énergie interne aux espèces ionisées pour produire la fragmentation de liaisons covalentes.

Enfin, les ions libres de solvant sont refocalisés au moyen de barres multipolaires afin d'être éjectés de la région de désolvatation de la source vers l'analyseur. Cette géométrie est couramment utilisée pour optimiser la transmission des ions.

2.2. Principes de l'ionisation/désorption par électronébulisation

2.2.1. Processus d'ionisation/désorption

L'électronébulisation à pression atmosphérique repose sur une succession de phénomènes physicochimiques. Leur description reste simple.

Tout d'abord, le champ électrique positif (ou négatif) en sortie de capillaire d'introduction provoque une accumulation de charges négatives (ou positives) à la surface du liquide (Figure 2). Dans le cas des charges positives, le champ électrique permet de repousser les charges négatives (4), qui sont absorbées par les parois métalliques du capillaire d'introduction, qui peut être à la terre. Ainsi se produit une réaction d'oxydation à l'interface liquide/capillaire tandis qu'une réduction a lieu au niveau de la contre-électrode.

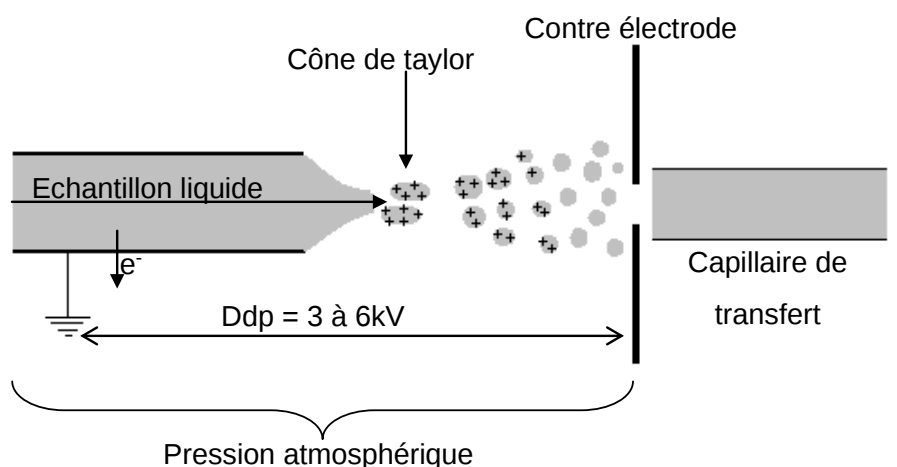


Figure 2 : Principe de l'ionisation/désorption par électronébulisation dans le cas d'une expérience en mode d'ions positifs.

Sous l'effet des mouvements de ces charges, la surface de la solution se déforme jusqu'à prendre la forme d'un cône (nommé cône de Taylor). Dès que les pulsions coulombiennes entre charges positives dépassent la tension de surface du liquide, un jet de gouttes chargées est émis à partir de la pointe du cône. Leur diamètre est de l'ordre du micromètre. Il dépend de la valeur du potentiel électrique, du débit de la solution, de la nature du solvant et de la température du gaz N₂.

L'optimisation de chacun de ces paramètres est primordiale pour permettre l'existence de ces gouttes tout en évitant la modification des propriétés des ions et complexes préformés en solution. Elles subissent alors une évaporation partielle du solvant, ce qui concentre les charges. Les forces de répulsion coulombiennes sont toujours en compétition avec les forces de cohésion qui maintiennent la gouttelette. A nouveau, une limite est atteinte (limite de Rayleigh), définit par l'équation suivante.

$$q_{\text{Rayleigh}} = 8\pi r_{\text{max}}^{3/2} \sqrt{\gamma \epsilon_o}$$

q_{Rayleigh} : Charges moyenne de la goutte. γ : Tension de surface du solvant.

r_{max} : Rayon de la goulette. ϵ_o : Permittivité du vide.

A ce stade, au moins trois modèles de production des ions en phase gazeuse selon les étapes suivantes sont proposés.

En 1968, Dole et al. (5) présentent un modèle connu sous le nom de théorie de la charge résiduelle (Figure 3). Leur conception du processus de libération des ions en phase gazeuse se base sur une continuité de la fission des gouttelettes en alternance avec l'évaporation du solvant. D'après eux, l'évaporation totale du solvant, à partir de gouttelettes d'un rayon critique de 100 Å, mène à la naissance d'une molécule intacte dépourvu de solvant et chargée {macro-ion $[M+nH]^{n+}$ dans le cas d'une ionisation positive, où M représente l'analyte}.

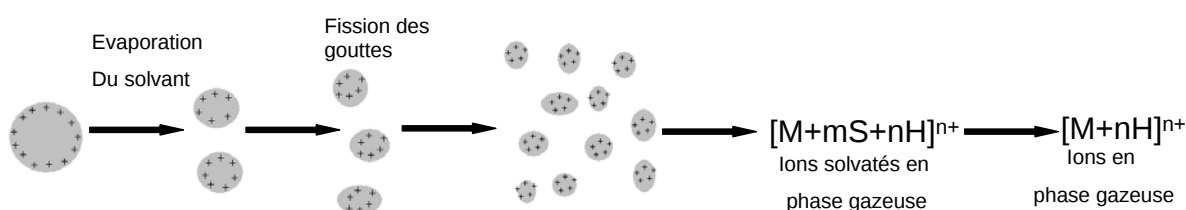


Figure 3 : Schéma relatif à la théorie de la charge résiduelle de Dole et al (S représente une molécule solvant)

Plus tard en 1979, Iribarne et Thomson (6) développent le modèle de l'évaporation ionique à partir de leurs études. Ce modèle repose sur l'émission, à partir d'une gouttelette chargée, d'un agrégat formé d'un ion et de molécules de solvant $[M+mM+nN]^{n+}$ (où S désigne une molécule de solvant). L'émission d'un tel système est viable si on considère trois états (Figure 4): la gouttelette chargée (état initial), et la gouttelette chargée de laquelle commence à se détacher l'agrégat $[M+mS+nH]^{n+}$ (état de transition), et la gouttelette réduite séparée de l'agrégat. L'enchaînement de ces états est gouvernée par le nombre de charges portées par la gouttelette et le rayon de celle-ci. Iribarne et Thomson ont démontré que les paramètres critiques et le correspondants ont pour valeurs 70 charges (nombre critique de charges) et $80\text{\AA}$ (rayon critique). Le passage de l'état initial à l'état final repose sur la compétition entre les forces électrostatique attractive présentes, à l'état final, entre la gouttelette chargée et l'agrégat dont les molécules de solvant sont polarisées. Dans le modèle de l'évaporation ionique {modèle thermique; équation (2)} les forces répulsives sont plus importantes que les forces attractives, ce qui permet l'émission de l'agrégat.

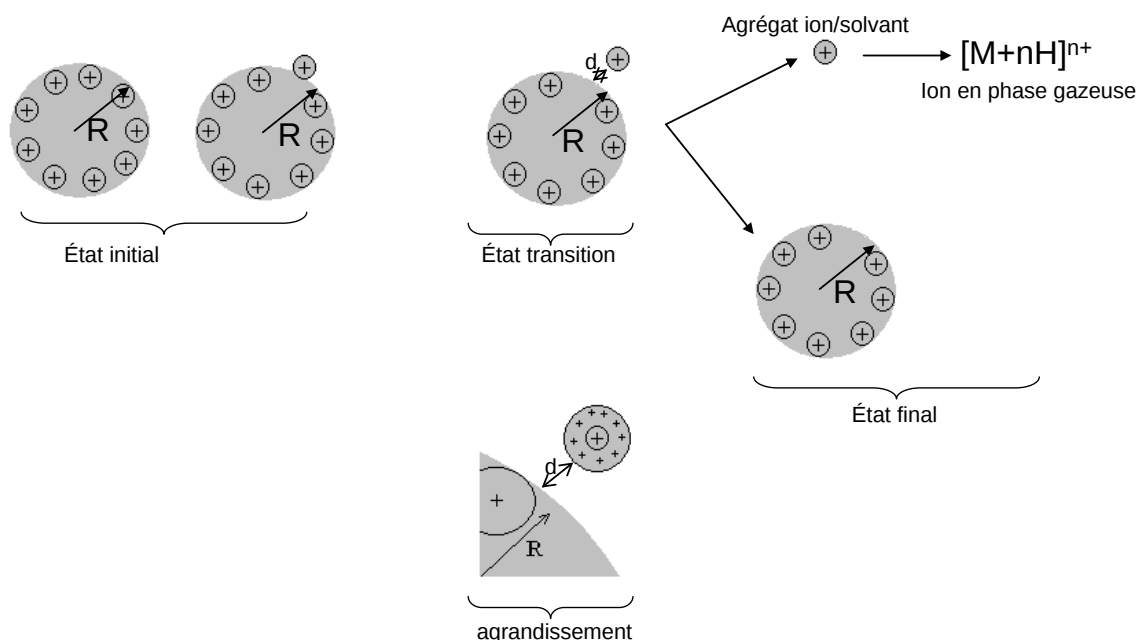


Figure 4: Schéma relatif au modèle de l'évaporation ionique d'Iribarne et Thomson.

$$k_1 = \frac{kT}{h} \exp\left(\frac{-\Delta G^*}{RT}\right)$$

K: constante de boltzmann. h: constante de planck.

T: température de la goutte. ΔG^* : énergie libre d'activation.

Puis en 1993, les travaux de sui et al. (7) sur le cytochrome c et la myoglobine étudiés en conditions très acides apportent un nouveau modèle. Celui-ci développe selon lequel les ions seraient émis non pas à la suite de fissions du liquide en gouttelettes mais subiraient désorption direct à partir du cône de Taylor (Figure 5).

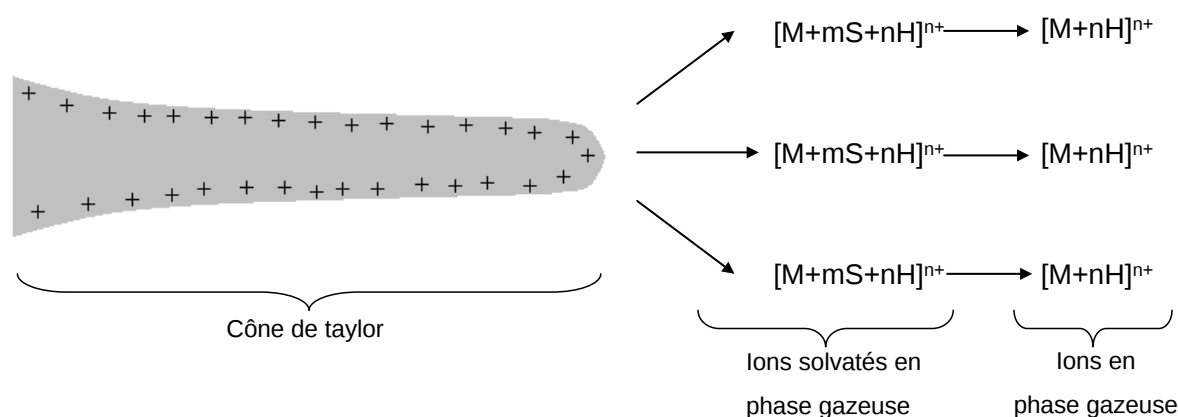


Figure 5: Schéma relatif au modèle de la désorption à partir du cône de Taylor, de Sui et al.

A ce jour, les trois modèles n'ont pas été départagés, et restent complémentaires. Néanmoins, la théorie de la charge résiduelle et le modèle de l'évaporation ionique sont les mécanismes les plus cités et utilisés, comme le montre la revue de Kebarle et Peschke (8) faisant état des modèles descriptifs du passage des ions de la solution à la phase gazeuse en électrospray. En fait, d'après cette revue, il se pourrait que la combinaison des deux modèles majeurs représente la réalité du phénomène. Dans ce cas, le modèle de l'évaporation ionique interviendrait dans toutes dernières étapes du modèle relatif à la théorie de la charge résiduelle.

2.2.2. Particularité accessibilité à une large distribution d'états de charge

L'électrospray est une technique permettant d'observer les ions d'une même molécule à divers états de charge. Cette distribution résulte notamment du solvant utilisé (ions préformés en solution), de la ou des conformation(s) adoptées par la molécule, et du processus d'ionisation/désorption des molécules analysées (conditions de désolvatation plus ou moins douces).

Selon le pH de la solution étudiée, les molécules seront plus ou moins chargées. Ce phénomène est d'autant plus visible lorsque l'on étudie des molécules repliées sur elles-mêmes, maintenues par des interactions non-covalentes, voire complexées à d'autres molécules. Quand la valeur du pH diminue, les interactions non-covalentes sont défavorisées, donc les molécules se déploient et sont capables de porter un plus grand nombre de charges (9, 10) plus de sites acides et basiques étant rendu accessibles. De plus, des conditions de bas pH augmentent le nombre de protons à la surface des gouttelettes lors du processus d'ionisation/désorption.

De même, la nature du solvant influence l'état de conformation des molécules et donc l'accessibilité des sites susceptibles de porter une charge. Plus la part de solvant organique est grande dans le volume de solution étudié, plus les molécules biologiques seront dénaturées. Plusieurs études effectuées sur des protéines démontrent cet état de fait (11-13).

C'est au niveau du premier skimmer de la source électrospray que la molécule d'intérêt va acquérir son état de charge final. Au sein d'un agrégat molécules ionisées/solvant, elle aura plus ou moins de facilité à capter les charges. En arrivant au skimmer, les liaisons hydrogènes présentent entre l'ion d'intérêt et le solvant sont rompues. Lors de cette désolvatation, les charges vont se répartir entre ces deux entités (i.e., ion et solvant) selon leur affinité protonique (Schéma 1). Dans des conditions de désolvatation douce (faible voltage au skimmer), les hauts états de charges seront favorisés. Au contraire, dans des conditions de désolvatation dures (voltage au skimmer élevé), les faibles états de charge seront observés. Ainsi, moduler la différence de potentiel entre la sortie du capillaire de transfert et le premier skimmer permet de contrôler l'énergie interne des ions. Concernant la désolvatation des ions, un minimum d'énergie est requis. Or l'application d'un voltage élevé au skimmer peut induire des ruptures de liaisons covalentes. Un compromis s'impose donc entre désolvatation des ions et conservation de leur forme intacte. Il est parfois possible d'observer des agrégats ions/solvant (14) dans des conditions de faible voltage. Ceci met en évidence la capacité de la technique d'ionisation/désorption par électrospray de préserver des complexes fragiles.

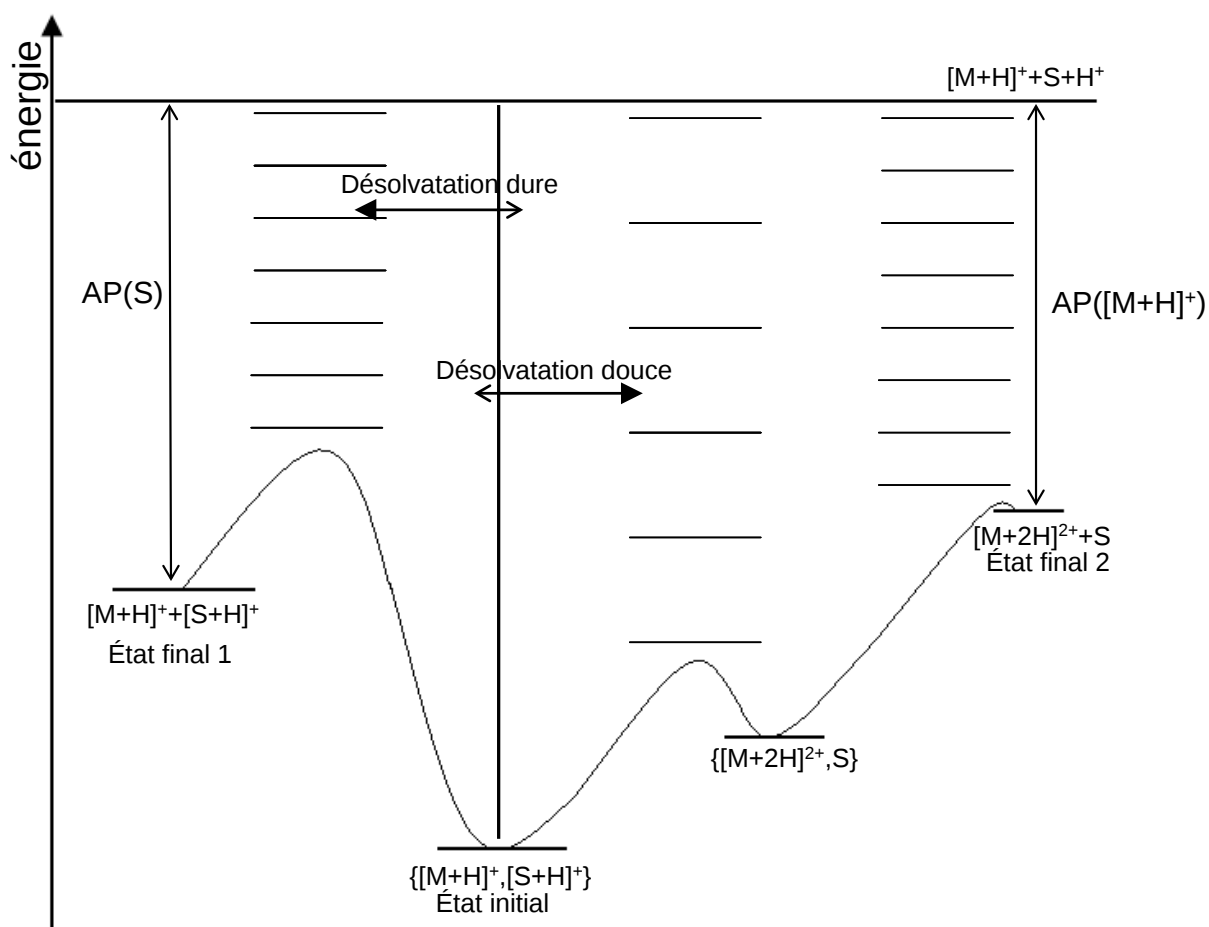


Schéma 1: Représentation schématisée des deux types de désolvatation (douce et dure) d'un agrégat chargé molécule/solvant. M représente l'espèce d'intérêt et S le solvant. Le cas présenté propose arbitrairement : $AP(S) > AP([M+H]^+)$ (AP affinité protonique)

La température de la source détermine aussi en partie le nombre de charge porté par l'analyte. Une augmentation de température permet d'une part une meilleure désolvatation des agrégats chargés et des ions par évaporation thermique, donc permet de travailler à de faibles valeurs de voltage au skimmer. D'autre part, dans de telles conditions les liaisons non-covalentes inter et intra molécule(s) se rompent, ce qui libère des basiques, donc porteurs de charge (15, 16)

Jusqu'à présent nous nous sommes limités à décrire la protonation des molécules étudiées. En mode d'ionisation positif, elles peuvent aussi être cationisées selon que le solvant est organique ou aqueux, aye des cations sont ajoutés à la solution, et selon l'affinité des molécules pour tel ou tel cation.

La production d'ions multichargés est l'un des atouts de l'electrospray car elle rend possible l'observation d'analytes de très haut poids moléculaire. Un calcul simple, la résolution du système d'équations (3), permet d'identifier les états de charge d'une même molécule.

$$i = \frac{M_{i+1}}{|M_{i+1} - M_i|} \quad M = ix M_{i-i}$$

i : état de charge.

M_i : masse de la molécule chargée i.

M_{i+1} : masse de la molécule chargée (i+1).

Cependant, ce calcul devient obsolète si le spectre de masse est enregistré avec une résolution permettant l'observation des pics isotopiques du massif de l'état de charge considéré. En effet, pour une molécule mono chargée, les pics isotopiques du massif correspondant sont espacés de 1 Th. Pour un état de charge n, les pics sont espacés de 1/n Th. D'autre part, des logiciels basés sur des algorithmes de déconvolution^{Error! Bookmark not defined.} permettent de faire ce calcul de façon rapide, automatique, et de présenter le résultat obtenu sur le spectre analysé.

2.III. Limites de l'electrospray et solutions

En mode d'ionisation négative, l'efficacité d'extraction des ions à partir de l'échantillon liquide est bien inférieure à celle réalisable en mode positif. Ceci s'explique par la faiblesse de la valeur de la différence de potentiels appliquée entre la sortie du capillaire d'introduction et la contre électrode. Elle doit être bien inférieure à celle appliquée en mode d'ionisation positif sinon des décharges électriques se produisent. Celles-ci sont dues à la présence même d'un plus grand nombre d'électrons émis au niveau de la sortie du capillaire d'introduction.

De même manière plus générale, c'est-à-dire quel que soit le mode d'introduction choisit, la limite majeure de l'electrospray réside dans la stabilité du spray. Plusieurs paramètres interviennent dans sa stabilité à pression atmosphérique. Tout d'abord la valeur du débit de l'échantillon introduit doit être limitée à quelques $\mu\text{L}/\text{min}$. Ceci représente une contrainte lorsque la source ESI est couplée à une chromatographie liquide classique, dont le débit en sortie de colonne est généralement de quelques ml/min . Cependant il existe des

solutions permettant de concilier le flux en sortie de chromatographie avec le débit restreint nécessaire à son introduction dans la source. Il s'agit par exemple de l'utilisation de colonnes de diamètre interne réduit (micro-colonne) (17, 18).

De plus, les qualités physico-chimiques du (ou des) solvant(s) utilisé(s) détermine en grande partie la qualité du spray (Tableau 1). Il est bien connu que les solvants organiques, le méthanol par exemple, permet d'obtenir un spray de meilleure qualité qu'avec l'eau. En effet, le méthanol est plus volatile que l'eau. Cette propriété est liée à la faible tension de surface de ce solvant organique, mais aussi à sa viscosité. La tension de surface caractérise la force de cohésion du solvant. Quant à la viscosité, lorsque sa valeur est faible, elle permet d'assurer un écoulement régulier et homogène du liquide. Par ailleurs, la capacité d'un solvant à séparer les charges électriques positives et négatives est directement reliée à la qualité de formation d'un aérosol dans un champ électrique. En conséquence, un solvant de constante diélectrique important sera un bon candidat.

Solvant	Tension de surface γ (en mN.m ⁻¹ ; à 25°C)	Viscosité η (en Cp; à 25°C)	Constante diélectrique ϵ (en C ² .J.m ⁻¹ ; à 25°C)
Eau	72	0.9	78
Acétonitrile	28	0.4	36
Méthanol	22	0.5	33

Tableau 1 : Les paramètres de différents solvants

En ce qui concerne l'échantillon même, la nature de la matrice dans laquelle il est dispersé peut être un inconvénient. Le champ d'application de l'electrospray est limité aux matrices peu complexes. Ainsi, les matrices biologiques courantes, par exemple le sang, ne sont pas directement compatibles avec cette méthode d'ionisation, l'electrospray nécessitant une grande pureté d'échantillon, d'autant plus si la quantité d'échantillon disponible est faible. Afin de palier à ce problème, l'étude de composés présents dans de telles matrices fait appel aux méthodes de séparation (chromatographie en phase liquide, électrophorèse capillaire (19)).

Dans le cas d'échantillons étudiés en milieux aqueux, l'utilisation d'un gaz de nébulisation (azote) arrivant de façon coaxiale à l'aiguille d'injection facilite la nébulisation de l'échantillon (Figure 6). Une telle géométrie permet d'augmenter le débit d'injection de l'échantillon facilitant, par exemple, le couplage de la source d'ions avec une

chromatographie liquide. Cette assistance pneumatique a été introduite pour la première fois dans la source ionspray (20). Actuellement, la majorité des sources commercialisées permettent l'utilisation de l'electrospray pur et de l'electrospray assisté pneumatiquement.

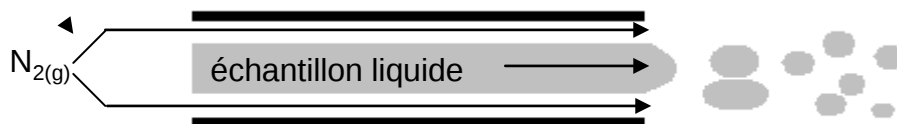


Figure 6 : Schéma de l'aiguille d'introduction d'une source ionspray

Une amélioration de géométrie dans la source electrospray a contribué à augmenter la sensibilité de l'appareil. Il s'agit de l'introduction d'un système d'injection hors axe (21). L'aiguille de nébulisation n'est plus dans le prolongement du capillaire de transfert. Voyksner et al. ont démontré l'avantage d'une telle configuration dans l'évacuation de contaminant inhérents à la source. Selon le débit appliqué à l'échantillon, ils observent une augmentation du rapport signal sur bruit (6 à 20 fois supérieur à celui observable dans le cas d'une géométrie de source dans l'axe). Divers angles entre le capillaire d'introduction et le capillaire de transfert sont disponibles (la source Z-spray (22) et la source à géométrie orthogonale (45 degrés) en sont des exemples).

D'autre part, la qualité des profils caractérisant les spectres de masse enregistrés en ESI est limitée par des paramètres propres aux analyseurs couplés à la source. Ils interviennent sur la sensibilité, la résolution, la gamme de masse accessible, la précision en masse.

3. Figure supplémentaire

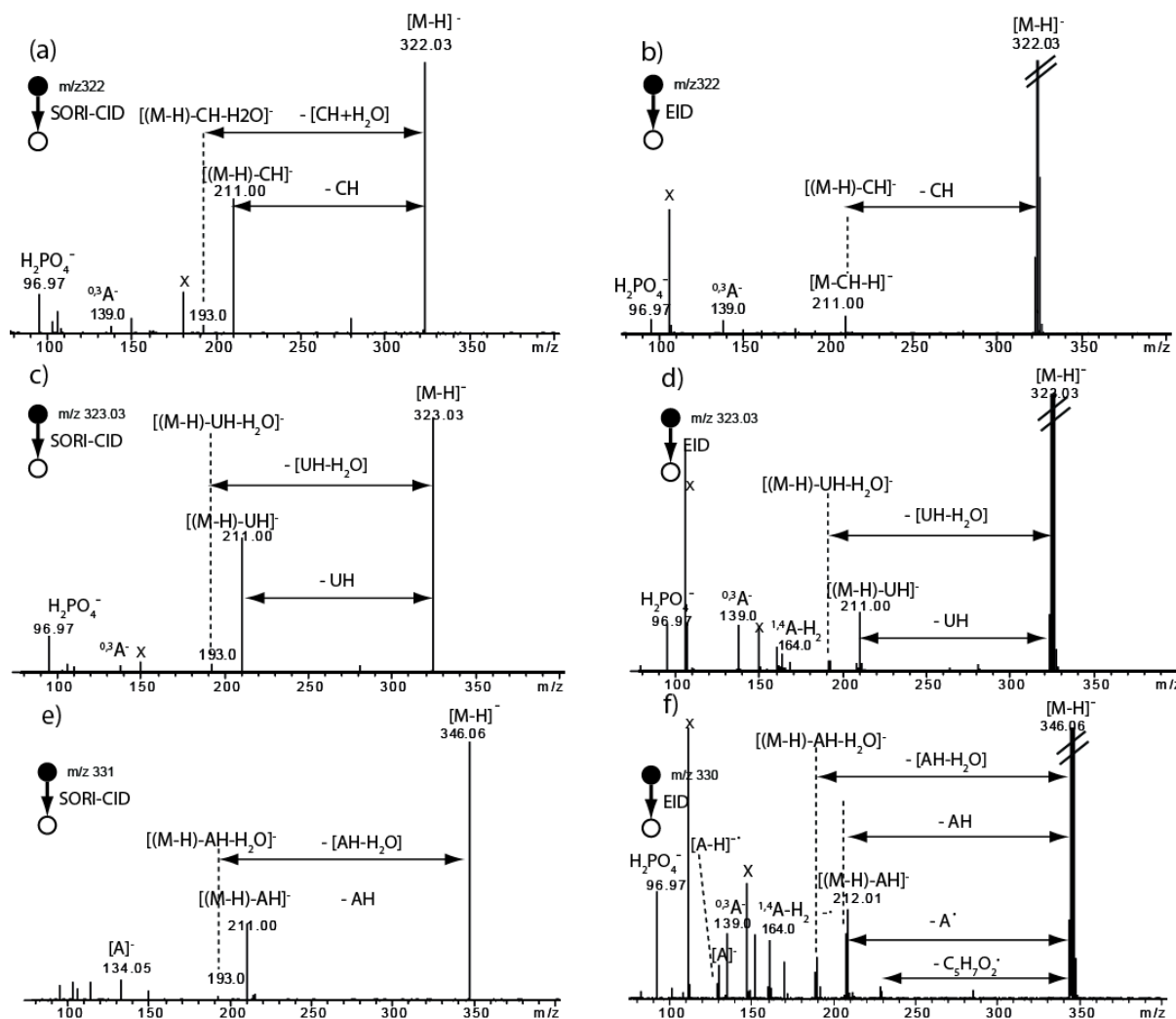
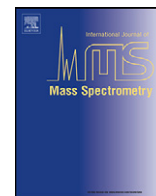


Figure A.1. Spectres SORI-CID (a) et EID (b) de 2'-citidine-5'-monophosphate déprotoné (m/z 322). Spectres SORI-CID (c) et EID (d) de 2'-uridine-5'-monophosphate déprotoné (m/z 323). Spectres SORI-CID (e) et EID (f) de 2'-adenosine-5'-monophosphate déprotoné (m/z 346).

1. Yamashita, M., and Fenn, J. B. (1984) Application of electrospray mass spectrometry in medicine and biochemistry, *Iyo Masu Kenkyukai Koenshu* 9, 203-206.
2. Stroobant, E. d. H. V. (2001) Mass Spectrometry: Principles and Applications *John Wiley and Sons*.

3. Manisali, I., Chen, D. D. Y., and Schneider, B. B. (2006) Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: past, present, and future, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 25, 243-256.
4. Blades, A. T., Ikonomidou, M. G., and Kebarle, P. (1991) Mechanism of electrospray mass spectrometry. Electrospray as an electrolysis cell, *Anal. Chem.* 63, 2109-2114.
5. Dole, M., Mack, L. L., Hines, R. L., Mobley, R. C., Ferguson, L. D., and Alice, M. B. (1968) Molecular beams of macroions, *J. Chem. Phys.* 49, 2240-2249.
6. Iribarne, J. V., and Thomson, B. A. (1976) On the evaporation of small ions from charged droplets, *J. Chem. Phys.* 64, 2287-2294.
7. Siu, K. W. M., Guevremont, R., Le, B. J. C. Y., O'Brien, R. T., and Berman, S. S. (1993) Is droplet evaporation crucial in the mechanism of electrospray mass spectrometry?, *Org. Mass Spectrom.* 28, 579-584.
8. Kebarle, P., and Peschke, M. (2000) On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions, *Anal. Chim. Acta* 406, 11-35.
9. Chowdhury, S. K., Katta, V., and Chait, B. T. (1990) Probing conformational changes in proteins by mass spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.* 112, 9012-9013.
10. Konermann, L., and Douglas, D. J. (1998) Equilibrium unfolding of proteins monitored by electrospray ionization mass spectrometry: distinguishing two-state from multi-state transitions, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12, 435-442.
11. Robinson, C. V., Chung, E. W., Kragelund, B. B., Knudsen, J., Aplin, R. T., Poulsen, F. M., and Dobson, C. M. (1996) Probing the Nature of Noncovalent Interactions by Mass Spectrometry. A Study of Protein-CoA Ligand Binding and Assembly, *J. Am. Chem. Soc.* 118, 8646-8653.
12. Babu, K. R., Moradian, A., and Douglas, D. J. (2001) The methanol-induced conformational transitions of β -lactoglobulin, cytochrome c, and ubiquitin at low pH: a study by electrospray ionization mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12, 317-328.
13. Samalikova, M., and Grandori, R. (2005) Testing the role of solvent surface tension in protein ionization by electrospray, *J. Mass Spectrom.* 40, 503-510.
14. Guillaumont, S., Tortajada, J., Salpin, J.-Y., and Lamsabhi, A. M. (2005) Experimental and computational study of the gas-phase interactions between lead(II) ions and two pyrimidic nucleobases: Uracil and thymine, *Int. J. Mass Spectrom.* 243, 279-293.

15. Le, B. J. C. Y., Beuchemin, D., Siu, K. W. M., Guevremont, R., and Berman, S. S. (1991) Thermal denaturation of some proteins and its effect on their electrospray mass spectra, *Org. Mass Spectrom.* 26, 831-839.
16. Mann, M., Meng, C. K., and Fenn, J. B. (1989) Interpreting mass spectra of multiply charged ions, *Anal. Chem.* 61, 1702-1708.
17. Abian, J., Oosterkamp, A. J., and Gelpi, E. (1999) Comparison of conventional, narrow-bore and capillary liquid chromatography/mass spectrometry for electrospray ionization mass spectrometry: practical considerations, *J. Mass Spectrom.* 34, 244-254.
18. Prokai, L., Aaserud, D. J., and Simonsick, W. J., Jr. (1999) Microcolumn size-exclusion chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr., A* 835, 121-126.
19. Schmitt-Kopplin, P., and Englmann, M. (2005) Capillary electrophoresis - mass spectrometry: Survey on developments and applications 2003-2004, *Electrophoresis* 26, 1209-1220.
20. Bruins, A. P., Covey, T. R., and Henion, J. D. (1987) Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.* 59, 2642-2646.
21. Voyksner, R. D., and Lee, H. (1999) Improvements in LC/Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry Performance Using an Off-Axis Nebulizer, *Anal. Chem.* 71, 1441-1447.
22. McComb, M. E., and Perreault, H. (2000) Design of a sheathless capillary eletrophoresis-mass spectrometry probe for operation with a Z-spray ionization source, *Electrophoresis* 21, 1354-1362.



Concomitant EDD and EID of DNA evidenced by MS^n and double resonance experiments

Viet Hung Nguyen, Carlos Afonso, Jean-Claude Tabet*

Equipe de Spectrométrie de masse, Institut Parisien de Chimie Moléculaire, CNRS-UMR 7201, Université Pierre et Marie Curie-Paris6, 4 place Jussieu, Bat F, 7ème étage, Boite 45, 75252 Paris Cedex 05, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 April 2010

Received in revised form 3 August 2010

Accepted 13 October 2010

Available online 20 October 2010

Keywords:

FT-ICR

EDD

Double resonance

DNA

Electrospray

ABSTRACT

Under collisional activation condition, it is well known that dissociations of multideprotonated oligonucleotides involve an initial loss of nucleic base (formation of $[M-nH-B_i]^{n-}$) yielding consecutively the complementary (a_i-B) and w_j product ions. The loss of thymine is thermodynamically unfavored owing to its low proton affinity. 6 mer DNA anions were activated in SORI-CID and by EDD. The EDD spectra are significantly different from SORI-CID. All EDD spectra showed singly charged w_5^- with good abundance, while this ion was not detected in SORI-CID spectra. In EDD spectra loss of thymine is easily detected, surprisingly doubly charged fragment ions were also detected, these ions can be produced directly from precursor ion $[M-2H]^{2-}$. MS^3 and double resonance experiments have been realized to find the origin of these doubly charged and $[a_i-T]^-$ ions in EDD spectra of $d(T_2AT_3)$ and (T_2CT_3) . It has been demonstrated that these doubly charged ions are produced by electron induced dissociation. The combination of double resonance and EDD/SORI-CID MS^3 experiments allows decoupling the EID from the EDD processes.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Electrospray is a soft ionization method allowing to analyze high molecular mass species such as oligonucleotides [1–3]. Electrospray can preserve non-covalent interaction allowing, for instance to investigate the secondary structure of oligonucleotides [4]. Different ion activation techniques have been used and the most common is collision-induced dissociation (CID) [5,6]. However, under CID, thymine-rich DNA can yield incomplete sequence information [7,8]. In fact, it has been shown that dissociations of multideprotonated DNA involve as first step a loss of nucleic base (i.e., formation of $[M-nH-B_i]^{n-}$) yielding consecutively the (a_i-B_i) and w_j complementary product ions [8–10]. The loss of thymine is thermodynamically unfavored owing to its relatively low proton affinity which explains the higher stability of thymine rich oligonucleotides [11,12].

Electron capture process (ECD) [13–15] has been developed originally by Zubarev et al. This method is carried out typically on multiprotonated molecules using low kinetic energy electrons (0–2 eV). The electron capture is exothermic (5–7 eV), due to the decrease of charge state, yielding radical driven covalent bond cleavages [16]. This dissociation mode is widely used for post-translationally modified peptides because the ECD process occurs along the peptide backbone [16,17]. Complementary to ECD, EDD

(electron detachment dissociation) is dedicated to multideprotonated molecules. The negative ion mode is chosen due to the presence of several phosphate groups considered as strong acidic sites in the gas phase. Generally, EDD takes place with higher kinetic energy electrons (>10 eV) [18–20]. The electron motion is related to a frequency whose wavelength depends on the kinetic energy causing the detachment of one or several electrons (electron stripping) [21,22]. Xu et al. investigated double-stranded oligonucleotides associated with drug by EDD [20]. They observed very good electron detachment efficiency without significant fragmentations. Hakanson and co-workers investigated short single-stranded oligonucleotides (i.e., 6 mer) by EDD and they observed some fragment ions which differ from those observed with ergodic activation methods such as CID or IRMPD [23]. Recently, using double resonance to eject a^*/z^* odd-electron ion during the EDD experiments, it was found that the abundance of the $[a/z-T]^-$ ion decreased [24]. This result suggested that the formation of the $[a/z-T]^-$ ions is produced through the consecutive dissociation of the odd-electron a^*/z^* ions.

Different activation methods can be used for electron stripping from multiply charged negative ions. For instance, this process can take place by electron photodetachment dissociation (EPD) under UV irradiation conditions [25,26]. Using this method Gabelica et al. [25] showed that electron detachment is nucleobase dependent (presence of guanine). However, very few fragment ions have been observed in EPD. It should be noted that under high-energy collision condition [27,28] (several keV), electron detachment process (or electron stripping) can be observed.

* Corresponding author. Tel.: +33 1 44 27 32 64; fax: +33 1 44 27 38 43.
E-mail address: jean-claude.tabet@upmc.fr (J.-C. Tabet).

The aim of this study was to compare the fragmentation patterns of multideprotonated DNA under SORI-CID and EDD conditions. Especially, sequential MS³ and double resonance experiments were performed on the charge reduced odd-electron anion, in order to acquire additional details on the EDD mechanisms. By this way the contribution of EDD and EID in the spectra could be demonstrated. The behavior of deprotonated DNA and the influence of nucleobases toward EDD processes were scrutinized. Finally some mechanisms were proposed to explain the fragmentations involving radical promoted processes.

2. Experimental

2.1. Sample preparation

All DNA were obtained from EUROFINs MWG Biotech (Ebersberg, Germany) and used without further purification. All other chemicals have been purchased from Sigma–Aldrich Chemicals (St Quentin Fallavier, France). Samples have been prepared using deionized water (18.2 MΩ) and HPLC grade methanol 80/20 with 2 mM ammonium acetate. The final concentration of DNA solutions was 20 μM.

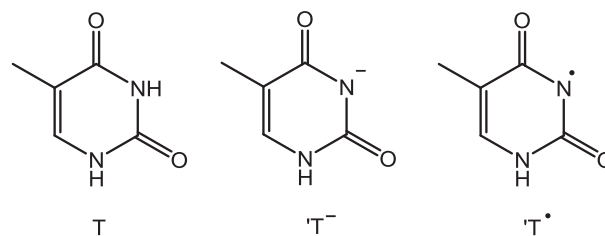
2.2. Mass spectrometry

All experiments were conducted on an actively shielded 7 T hybrid quadrupole Fourier transform ion cyclotron resonance (Qh-FT/ICR) mass spectrometer (ApexQe, Bruker Daltonics, Billerica, USA). The DNA solutions were infused in an Apollo II electrospray ion source at a flow rate of 120 μL h^{−1} with the assistance of N₂ nebulizing gas. Ionization was performed in negative mode with an ESI voltage of 3500 V. The capillary exit was set to 300 V; skimmer I was set 40 V; and skimmer II was set to 8 V. All ESI mass spectra were acquired with XMASS (version 6.1, Bruker Daltonics) in broadband mode from *m/z* 200 to *m/z* 2000. The image signal was amplified and digitized using 512 K data point resulting in the recording of a 0.47 s time domain signal which was transformed into the corresponding frequency domain by Fourier transform (one zero fill and Sinbell apodization).

For EDD experiments, higher kinetic energy electrons have been produced from an indirectly heated hollow dispenser cathode (inner and outer diameters of 3.5 mm and 7.6 mm, respectively, located 88 mm from the ICR cell) and were introduced into the ICR cell for 3 s. A heating current of 1.5 A was applied to a heater element located behind the cathode, and the bias voltage was 19.5 V. A lens electrode (6 mm inner diameter) located immediately in front of the cathode was kept at −20 V. Sustained Off-Resonance Irradiation Collision-Induced Dissociation (SORI-CID) was accomplished using Argon as collision gas. The ions were excited using an excitation amplitude of 3.4 V_{p,p} with a frequency offset of 600 Hz applied for 250 ms. A pumping delay of 2 s was used before the excitation/detection step.

All mass spectra have been internally calibrated. Reported *m/z* ions were compared to the theoretical *m/z* and ions with an error more than 10 ppm were not considered.

The signals of the ESI mass spectra (and product ions spectra) have been labeled using McLuckey's [29] nomenclature which has been modified as following. In order to describe the release of nucleic base in molecule, radical or anion forms, the nomenclature was changed using B capital (Scheme 1) instead of BH for nucleobase. Apostrophe was used to show that one H was missing (i.e., 'B). An anion or radical species, were noted as 'B[−]' or 'B[•]'. It was demonstrated that, negative ion activation by electron bombardment was a mixture of EDD and EID (electron induced dissociation) processes. Most fragment ions originate from charge reduced ion



Scheme 1. Nomenclature used for nucleobase losses (case of thymine).

consecutive dissociation (EDD) whereas some fragment ions were produced directly from the precursor ion without electron detachment (EID). Therefore, conventional EDD was designated here as EDD–EID.

3. Results

3.1. SORI-CID spectra of 6 mer DNA

Several 6 mer DNA (i.e., d(GT₅), d(G₃T₃), d(T₂AT₃), d(T₂CT₃), dT₆ and d(GCATGC)) containing variable thymine number were investigated under SORI-CID conditions. Low excitation amplitude was chosen (3.4 V) to avoid extensive consecutive decompositions. Doubly deprotonated DNA were the most abundant ions in the ESI mass spectra (data not reported). These doubly charged ions were selected and activated under SORI-CID conditions. The product ion spectrum of [d(GT₅)–2H]^{2−} (*m/z* 892) (Fig. 1a) displayed the w₅^{2−} ion (*m/z* 768) without formation of the corresponding singly charged w₅[−] ion (*m/z* 1537). Complete w_j[−] ion series is detected but most ions are produced with a very low abundance except w₅^{2−}. Note that the direct G release ([M–2H–G]^{2−}, *m/z* 817) is observed whereas no loss of thymine is detected. The w₅^{2−} ion is observed which carries the entire initial charge of the precursor ion so [a₁–G][−] ion (*m/z* 115) cannot be detected. The SORI-CID spectrum of the [d(G₃T₃)–2H]^{2−} ion (*m/z* 917) (Fig. 1b) showed only complementary product w_j/[a_i–B] ions (with *j* = 3, 4 and *i* + *j* = 6) corresponding to the cleavages in the guanine-rich region. Again, the [a₁–G][−] ion (*m/z* 115) is not observed since w₅^{2−} is still present. Nevertheless, the w₅^{2−} ion abundance decreases while those of w₄^{2−} and w₄[−] are reinforced. The direct G loss is favored and thus, the internal fragment [G₂:G₂][−] (*m/z* 506) ion appeared. The SORI-CID spectra of [M–2H]^{2−} ions (*m/z* 884) of d(T₂AT₃) (Fig. 1c) and d(T₂CT₃) (*m/z* 872) (Fig. 1d) display respectively direct losses of A and C. However, the complementary [a₃–B][−]/w₃[−] ions (*m/z* 705 and *m/z* 929, respectively) emerge with similar abundances. Note that the relative abundance of the [a₃–A][−] ion (*m/z* 705) is significantly higher than that of the [a₃–C][−] ion (*m/z* 705). In the same way the [M–2H–A]^{2−} ion (*m/z* 817) is significantly more abundant than the [M–2H–C]^{2−} ion (*m/z* 817). Finally, among the low-abundant product ions, the complete w_j[−] series is detected either as singly charged (w₁[−], w₂[−] and w₃[−]) or as doubly charged (w₄^{2−} and w₅^{2−}) ions. It should be noted that the singly charged w₄[−] and w₅[−] ions were not detected. The SORI-CID spectrum of the [dT₆–2H]^{2−} ion (*m/z* 880) (Fig. 1e) also displays the complete w_j ion series. In addition, ion series involving thymine base release ([a_i–T][−], *i* = 2–5) were detected in very low abundance. This illustrates the difficult thymine base loss, although it can occur through a low rate constant reaction. Finally, the SORI-CID spectrum of [M–2H]^{2−} (*m/z* 894) of d(GCATGC) (Fig. 1f) that presents only one thymine base is more informative. This spectrum displayed, in particular, more internal fragment ions (i.e., [C₂:C₂][−], [T₄:T₄][−], [A₃:T₄][−] and [C₂:T₄][−] at *m/z*, 446 *m/z* 481, *m/z* 794 and *m/z* 1083, respectively) than those occurring from the other investigated DNA. In addition, the w₁[−] (*m/z* 306) ion abundance was strongly enhanced and the direct competi-

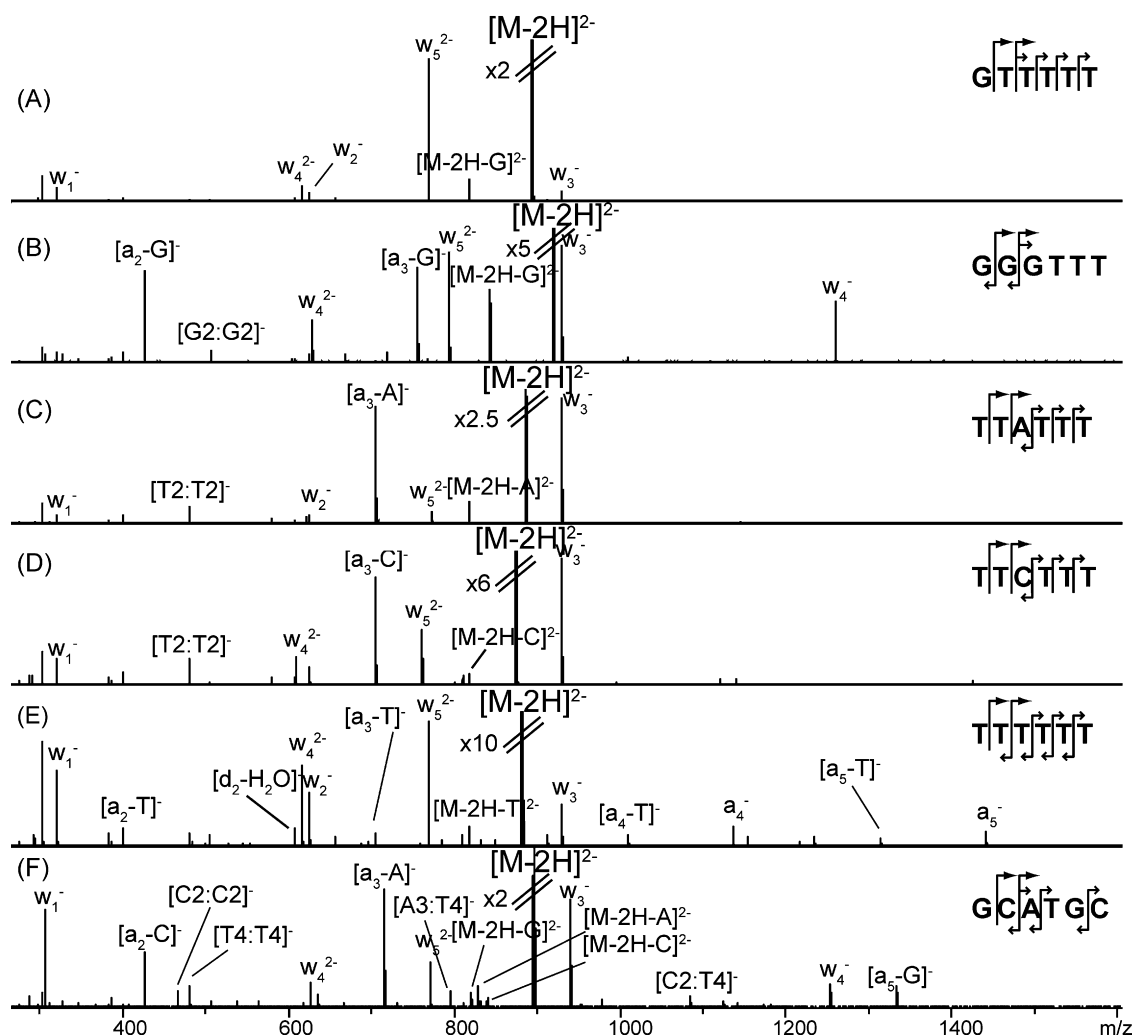


Fig. 1. SORI-CID spectra of 6 mer DNA $[M-2H]^{2-}$ ions. (a) $d(GT_5)$ (m/z 892), (b) $d(G_3T_3)$ (m/z 917), (c) $d(T_2AT_3)$ (m/z 884), (d) $d(T_2CT_3)$ (m/z 872), (e) dT_6 (m/z 880) and (f) $d(GCATGC)$ (m/z 894). The open arrow denotes singly charged ions and closed arrow the doubly charged ions.

tive losses of guanine, adenine and cytosine yielded the $[M-2H-B]^-$ (m/z 1639 m/z 1655 m/z 1679 respectively) series. The almost complete $[a_i-B_i]^-$ ion series is detected (except for $i = 1$ and 4).

All collisionally activated 6 mer oligonucleotides produced singly charged w_j^- ions (with $j < 5$) depending on the nucleotide sequence and more particularly of the nucleobase proton affinity. Complementary ions were observed for $j = 3$ as $[a_3-B]^-$ (with $B \neq T$). The singly charged w_5^- was never observed but the w_4^- ion is produced competitively with the w_4^{2-} ion. In the case of a more random nucleotide sequence (i.e., $d(GCATGC)$) presenting only one thymine, the entire $[a_i-B]^-/w_{6-i}^-$ series was detected (except for $i = 1, 4$ due to the presence of w_5^{2-} and thymine, respectively).

3.2. EDD-EID spectra of 6 mer DNA $d(T_2AT_3)$ and $d(T_2CT_3)$

Fig. 2a shows the EDD-EID spectrum of doubly deprotonated $d(T_2AT_3)$ (m/z 872) (the product ion assignments are given in Table 1). This spectrum displayed a complete series of singly charged w_j^- ions allowing a simple sequence determination. It is noteworthy that the relative abundance ratio between w_3^- (m/z 929) and w_5^{2-} (m/z 760) in the EDD-EID spectrum are similar to that displayed in the SORI-CID spectrum (Fig. 1c). Furthermore, the w_4^- (m/z 1218) and w_5^- (m/z 1522) singly charged ions which were

absent in the SORI-CID spectrum, appeared in the EDD-EID spectrum and the abundances of w_j^- ion series increased with the size of the product ions except for w_3^- which is enhanced due to the location of adenine. The charge reduced $[M-2H]^{*-}$ (m/z 1745) ion produced through electron stripping was also detected. The low abundance odd-electron ions were very likely obtained by the consecutive decompositions of the $[M-2H]^{*-}$ ion. The attribution of these signals are ambiguous, since they can correspond to the z_j^{*-} or a_i^{*-} ion series. In addition two additional product ions related to the unexpected loss of thymine (i.e., $[a_4-T]^-$ (m/z 994) and $[a_5-T]^-$ (m/z 1298) (or $[z_5-T]^-$) have been detected. The latter ions as well as w_4^- and w_5^- ions can probably be produced from dissociation of odd-electron anion, because they were not displayed in the SORI-CID spectrum (Fig. 1c). These product ions could be specific to the EDD mode. Electron bombardment of the doubly deprotonated $d(T_2CT_3)$ (Fig. 2b) yielded fragment ions similar to those observed for $d(T_2AT_3)$. In addition, $[z_n-T]^-/[a_n-T]^-$ product ions involving thymine base loss are again detected. The abundance ratio between the w_3^- and w_5^{2-} ions is similar to that observed in the SORI-CID spectrum of $[M-2H]^{2-}$ ion for $d(T_2CT_3)$ (Fig. 1d). In addition, the relative abundance of the $[a_3-C]^-$ ion (m/z 705) and of its complementary w_3^- ion (m/z 929) is lower than that of the $[a_3-A]^-$ and w_3^- (m/z 929) ions displayed in the EDD-EID spectrum of $d(T_2AT_3)$ (Fig. 2a and b).

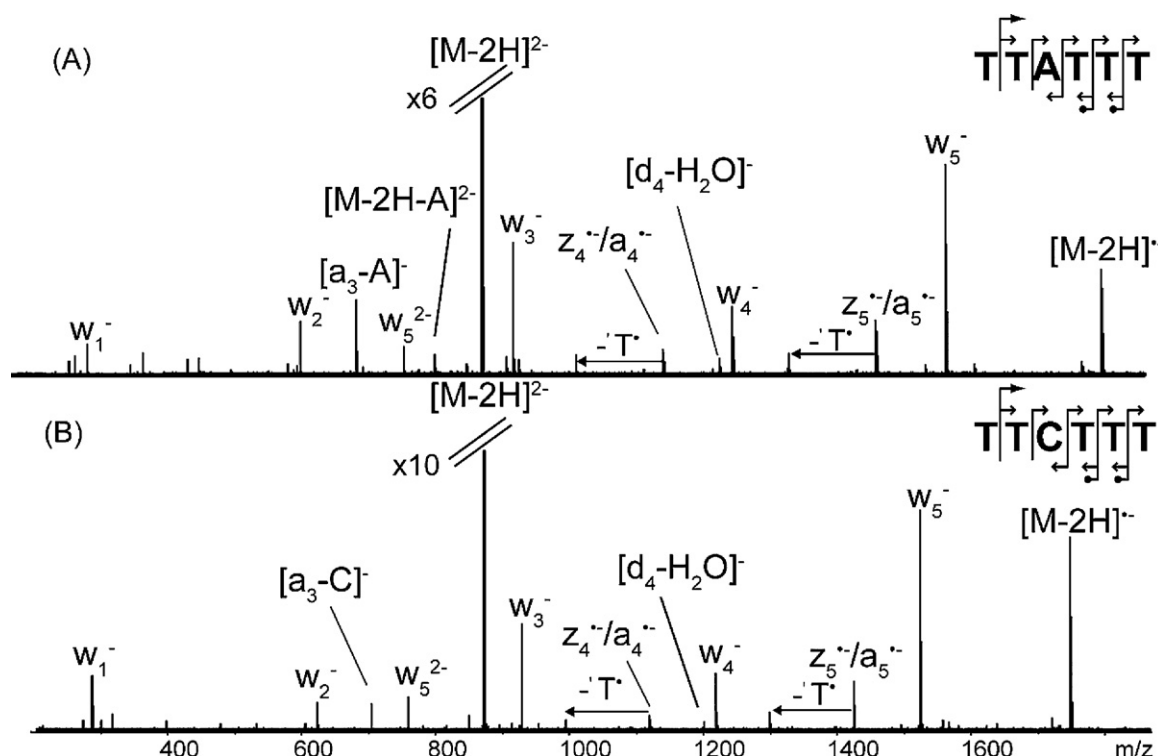


Fig. 2. EDD spectra of $[M-2H]^{2-}$ (a) m/z 884 for $d(T_2AT_3)$ and (b) m/z 872 for $d(T_2CT_3)$ DNA. The arrow with a dot denotes a $\bullet$ radical ion.

In principle, the w_3^- fragment ions as well as the w_4^- and w_5^- ions must be produced from the consecutive decompositions of the $[M-2H]^{2-}$ odd-electron anion. However, another decomposition pathway must be considered to explain the formation of the doubly charged w_5^{2-} ion. It should be pointed out that all ions formed in the source have been ejected through a double isolation step of the precursor ion, on the quadrupole and in the ICR cell. So, the doubly charged ($[M-2H-B]^{2-}$ and w_5^{2-}) product ions are formed during the electron bombardment step. Therefore, they are probably produced directly from the selected precursor ion by EID [30] or from other processes.

3.3. Sequential MS^3 and double resonance experiments

In order to acquire more information on the various processes involved in EDD–EID mode and to elucidate the origin of doubly charged product ions, double resonance experiments were realized. In this case, the odd-electron $[M-2H]^{\bullet-}$ anion is con-

tinuously ejected using resonant excitation during the EDD–EID experiments. With a sufficiently high excitation amplitude, the $[M-2H]^{\bullet-}$ ions can be ejected from ICR cell before its consecutive dissociations. Consequently, only fragment ions generated from the direct decomposition of the doubly charged $[M-2H]^{2-}$ precursor can be detected. However, if the charge reduced $[M-2H]^{\bullet-}$ anion dissociates with very high rate constants, its fragment ions can be produced before complete ejection. Hence these fragment ions can be observed.

Double resonance experiment was used for lifetime study of intermediate fragment ions, [31–34] and has been applied to investigate peptide dissociation by ECD [35]. Moreover, this approach that can give an idea on the origin of fragment ions, is very useful to study the dissociation mechanism and for other applications [33,36–40]. Recently Hakansson and co-workers used this approach for studying the dissociation mechanisms of deprotonated oligonucleotides [24].

Fig. 3a and c displays the double resonance spectra of $[M-2H]^{\bullet-}$ generated by electron stripping of $[M-2H]^{2-}$ for $d(T_2AT_3)$ and $d(T_2CT_3)$. The resulting profiles present fragment ions similar to those observed in SORI–CID spectra (Fig. 1c and d), except the additional w_4^- ions that was not formed under CID from both the doubly deprotonated $d(T_2AT_3)$ and $d(T_2CT_3)$.

The presence of the w_4^- ion, may be due to a fast decomposition of $[M-2H]^{\bullet-}$ that is therefore produced prior to its ejection. The doubly charged $[M-2H-B]^{2-}$ and w_5^{2-} product ions displayed in the EDD–EID spectra (Fig. 2a and b) were maintained whereas the $a_4^{\bullet-}/z_4^{\bullet-}$ and $a_5^{\bullet-}/z_5^{\bullet-}$ product ions as well as the $[a_4-T]^-$ and $[a_5-T]^-/[z_5-T]^-$ ions disappeared in the double resonance spectra. This means that their respective formation rate constant is sufficiently low to be not produced before ejection of the charge reduced ion. In fact, the formation of these product ions take place after ejection of the $[M-2H]^{\bullet-}$ intermediate ion.

Sequential MS^3 experiments can give additional information on these fragment ions. The odd-electron $[M-2H]^{\bullet-}$ anions produced by electron stripping from the selected $[M-2H]^{2-}$ ions,

Table 1
Product ions observed following EDD–EID of $[T_2AT_3]^{2-}$.

Attribution	Theoretical (m/z)	Observed (m/z)	Error (ppm)
w_1^-	321.04878	321.04776	–3.2
w_2^-	625.09482	625.09290	–3.1
w_5^{2-}	772.61888	772.61622	–3.4
$[a_3-AH_3]^-$	705.12158	705.11938	–3.1
$[M-2H-AH]^{2-}$	817.13148	817.12847	–3.7
$[M-2H]^{2-}$	884.65873	884.65592	–3.2
w_3^-	929.14086	929.13927	–1.7
$[a_4-T_4]^-$	1018.17918	1018.17725	–1.9
$z_4^{\bullet-}/a_4^{\bullet-}$	1143.21428	1143.21287	–1.2
$[d_4-H_2O]^-$	1224.18612	1224.18591	–0.2
w_4^-	1242.19848	1242.19766	–0.7
$[a_5-T_5]^-$	1322.22522	1322.22653	1.0
$z_5^{\bullet-}/a_5^{\bullet-}$	1447.25977	1447.26154	1.2
w_5^-	1546.23723	1546.24072	2.3
$[M-2H]^{\bullet-}$	1769.31692	1769.31392	–1.7

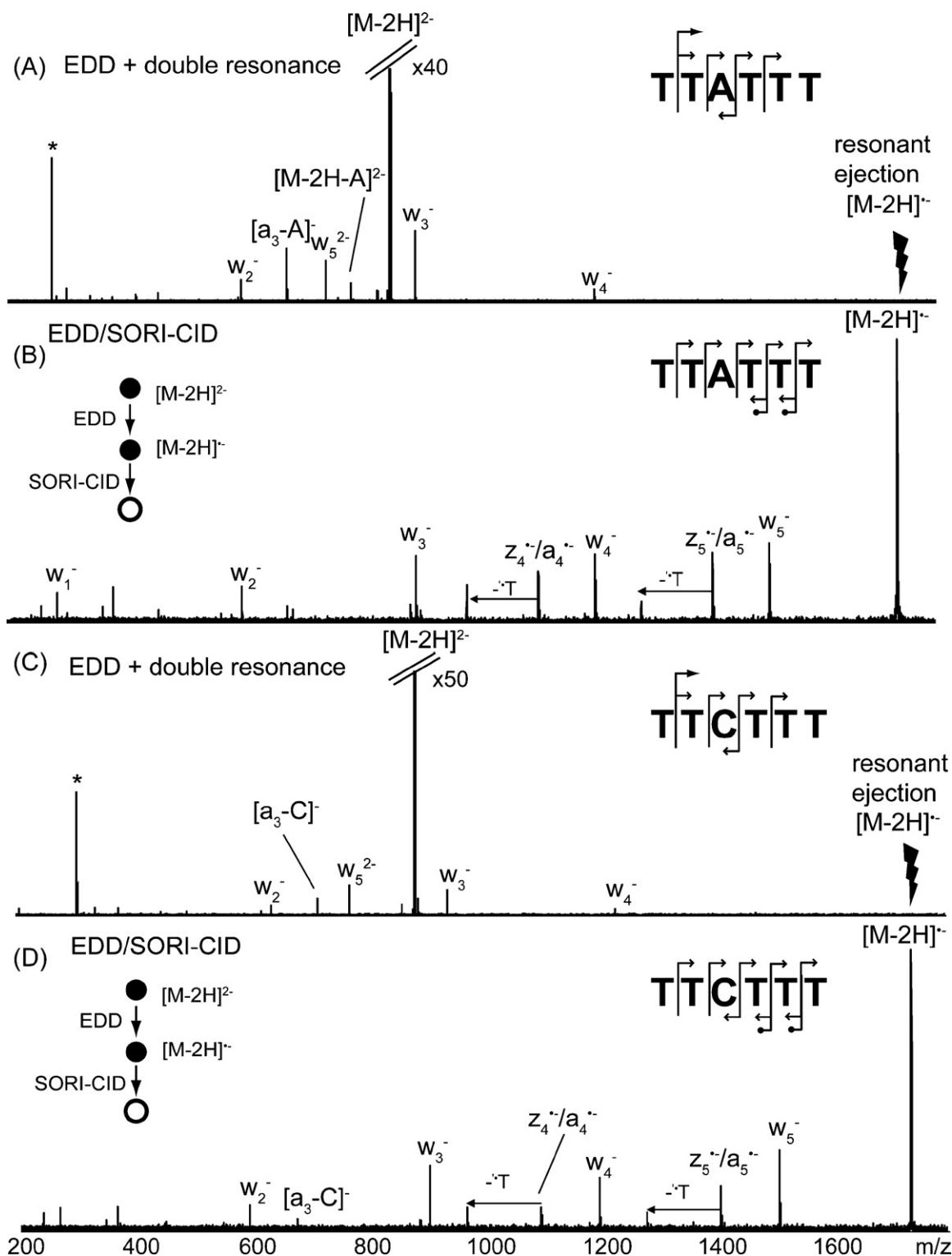


Fig. 3. Double resonance spectra (19 V as ejection energy) of odd-electron $[M-2H]^{\bullet-}$ prepared by EDD processes from (a) $d(T_2AT_3)$ m/z 894 and (b) $d(T_2CT_3)$ at m/z 872 and sequential MS^3 experiment by consecutive EDD (electron stripping yielding $[M-2H]^{\bullet-}$) and SORI-CID.

were activated by SORI-CID (Fig. 3b and d). The majority of the singly charged product ions detected in EDD–EID/SORI-CID spectra of $[M-2H]^{\bullet-}$ was present in the EDD–EID spectra of both the $[d(T_2AT_3)-2H]^{2-}$ and the $[d(T_2CT_3)-2H]^{2-}$ precursor ions (Fig. 2a and b). However, the $[a_3-A]^-$ (m/z 705) ion for the $d(T_2AT_3)$ sequence is absent, although the corresponding $[a_3-C]^-$ (m/z 705) product ion of $d(T_2CT_3)$ is detected in low abundance. It should

be noted that the relative abundance of the w_j^- ions are significantly reduced, with respect to the odd-electron $a_n^{\bullet-}/z_n^{\bullet-}$ ions. Interestingly, the w_j^- fragment ion abundance increases with the product ion size. Finally, as expected doubly charged product ions disappeared from the sequential EDD–EID/SORI-CID spectra. These sequential MS^3 experiments suggested that the $[a_n-T]^-/[z_n-T]^-$ ions are most likely produced through a radical driven dissociation

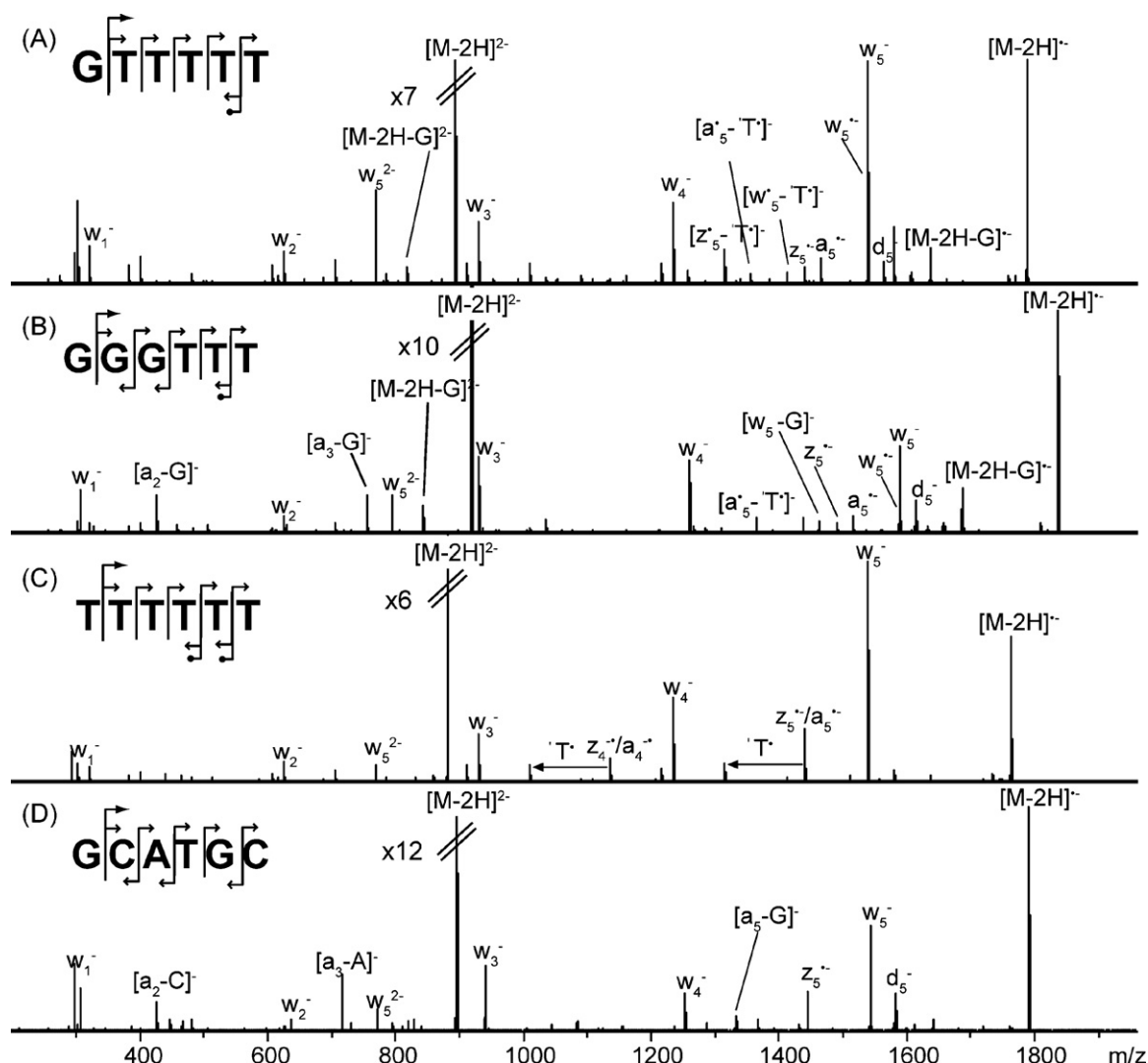


Fig. 4. EDD spectra of DNA (a) d(GT₅) (m/z 892), (b) d(G₃T₃) (m/z 917), (c) d(T₆) (m/z 880) and (d) d(GCATGC) (m/z 894).

and not directly from the $[M-2H]^{2-}$ precursor ion (charge driven pathway). Actually, the radical $a_n^{\bullet}/z_n^{\bullet}$ ions lose a radical thymine to give $[a_n^{\bullet}/z_n^{\bullet}-T]^-$ (equivalent to $[a_n/z_n-T]^-$).

3.4. EDD–EID spectra of other 6 mer DNA

Thymine rich DNA in association with peptides was successfully studied by our group [41], in this work, we want to extend our knowledge about these DNA sequence. Since the EDD–EID spectra of d(T₂AT₃) and d(T₂CT₃) produced similar fragment ions, we performed EDD–EID experiments with the d(GT₅) and d(G₃T₃). These DNA sequences were chosen because of the presence of one and three guanines which were expected to enhance the efficiency of EDD. The d(T₆) and d(GCATGC) were also chosen in order to compare our experiment with previous results which were investigated by Hakansson and co-workers [23].

In contrast to the previous examples (Fig. 2a and b) the odd-electron $a_5^{\bullet}$ and $z_5^{\bullet}$ ions as well as the even-electron w_j and d_i ion series were independently detected in the EDD spectrum of $[d(GT_5)-2H]^{2-}$ (Fig. 4a). Complete w_n ion series was detected while only one ion of the d_m series have been detected (d_5^- m/z 1562). In addition, the odd-electron $a_5^{\bullet}$ (m/z 1463) and $z_5^{\bullet}$ (m/z 1438) ions are accompanied by their satellite ions due to thymine radical loss (i.e., $[a_5-T]^-$ (m/z 1338) and $[z_5-T]^-$ (m/z 1313)). The w_5^{2-} (m/z

1357) ion was observed, interestingly $[w_5-T]^-$ (m/z 1411) was also detected. The loss of neutral guanine takes place from both the $[M-2H]^{2-}$ (m/z 892) and charge reduced $[M-2H]^{\bullet-}$ precursor ion (m/z 1785) but no loss of guanine radical was detected.

EDD–EID spectrum of $[d(G_3T_3)-2H]^{2-}$ (Fig. 4b) displayed fragment ions similar to those detected in EDD–EID spectrum of $[d(GT_5)-2H]^{2-}$. The difference between these EDD–EID spectra is the specific presence of $[a_i-B_i]^-$ (i.e., $[a_2-G]^-$ m/z 426 and $[a_3-G]^-$ m/z 755) observed from $[d(G_3T_3)-2H]^{2-}$. Loss of radical guanine was detected from the odd-electron $z_5^{\bullet}$ ion while the release of thymine radical from $z_5^{\bullet}$ in the EDD–EID spectrum of $[d(GT_5)-2H]^{2-}$ ion was observed. From the d(T₆) sequence, some ambiguities appeared because ions tagged w^- can also be d^- ions. The EDD–EID spectrum of the latter sequence (Fig. 4c) displayed the complete w_j/d_i ion series. In addition the $a_4^{\bullet}/z_4^{\bullet}$ (m/z 1134) and $a_5^{\bullet}/z_5^{\bullet}$ (m/z 1438) odd-electron fragment ions were detected with satellite product ions due to thymine released. Finally in the EDD–EID spectrum of d(GCATGC) (Fig. 4d), incomplete $[a_i-B_i]^-$ ion series was observed as in its SORI–CID spectrum (Fig. 1f). Only the $z_5^{\bullet}$ (m/z 1442) odd-electron species without its $[z_5-G]^-$ satellite product ion was detected. In general, all EDD–EID spectra of $[M-2H]^{2-}$ showed similar fragment ions (e.g., complete singly charged w_n ion series and the presence of doubly charged w_5^{2-} ions). Thymine radical can be released from both $a_i^{\bullet}$ and $z_j^{\bullet}$ odd-electron ions.

4. Discussion

The doubly charged w_5^{2-} ions were detected in the SORI-CID spectra for all investigated DNA without formation of singly charged w_5^- ion and its complementary ion. This behavior can be related to the initial positions of the charges that are most likely in the phosphate groups. The $[a_1-B]$ fragment ion does not present any phosphate group and is therefore expected to be lost as a neutral after dissociation of the ion–dipole complex [42,43]. The SORI-CID spectrum of $[d(T_6-2H)]^{2-}$ ion (m/z 880) displayed $[a_i-T]^-$ ($i=2-5$) ion series involving a thymine base loss. This loss is difficult to rationalize through a conventional charge driven pathway. Gross et al. considered the formation of a zwitterionic intermediate produced through an intramolecular proton transfer from the 5'-phosphate simultaneously with the release of the base [7]. It was shown, by replacing phosphates with methylphosphonates in the i -position ($i=1-4$) that the abundance of $[a_{i+1}-B]^-$ decreased which is consistent with this hypothesis [9]. In contrast to the SORI-CID spectra, the EDD–EID spectrum displays the singly charged w_5^- ion, this ion is probably produced through a radical driven pathway. In the SORI-CID and double resonance spectra of $[d(T_2AT_3)-2H]^{2-}$ and $[d(T_2CT_3)-2H]^{2-}$ ion, the relative abundance of $[a_3-A]^-$ ion is higher than that of $[a_3-C]^-$ ion. This behavior can be explained by the formation of zwitterions [44–46] which could be produced during the desolvation step. The protonation of dA is favored as its proton affinity is slightly higher than that of dC ($dG > dA > dC > dT$ [47]). Fig. 1f displayed the SORI-CID spectrum of $[d(GCATGC)-2H]^{2-}$ in which the abundance of w_1^- ion (m/z 306) is strongly higher than its complementary ion (i.e., $[a_5-G]^-$, m/z 1332). In fact, the w_1^- ion may be produced through the consecutive decomposition of many other ions whereas the $[a_5-G]^-$ ion produces consecutively internal fragment ions ($[C2:C2]^-$ m/z 466, $[C2:T4]^-$ m/z 1083 and $[T4:T4]^-$ m/z 481). This hypothesis is reinforced by IRMPD experiments in which the time of activation of $[GCATGC-2H]^{2-}$ was varied (0.04 s, 0.06 s, 0.08 s and 0.1 s for each experiment, results not shown). The $[a_5-G]^-$ ion was not detected but the abundance of the w_1^- ion increased significantly with the laser irradiation time, whereas the other product ion abundances decreased. This shows that w_1^- has several origins, and it is reinforced through consecutive decompositions.

Our double resonance (ejection of $[T_2AT_3-2H]^{*-}$ m/z 1769 during EDD–EID of $[T_2AT_3-2H]^{2-}$, m/z 884) (Fig. 3a) and MS³ experiments (EDD–EID of $[d(T_2AT_3)-2H]^{2-}$ followed by SORI-CID of $[d(T_2AT_3)-2H]^{*-}$) (Fig. 3c) showed that the $[a_3-A]^-$ ion is produced from the $[M-2H]^{2-}$ through a charge driven pathway involving most likely the formation of the $[M-2H-A]^{2-}$ intermediate ion. The doubly charged product ions were not detected in the MS³ (EDD–EID/SORI-CID) spectra of odd-electron produced ions from $[d(T_2AT_3)-2H]^{2-}$ to $[d(T_2CT_3)-2H]^{2-}$ but, they were present in the double resonance spectra of these oligonucleotides (Fig. 3a and c). This result confirmed that the doubly charged product ions detected in EDD–EID spectra (Fig. 2a and b) are produced directly from the $[M-2H]^{2-}$ precursor ion by EID prior to electron detachment [48]. Actually, EID occurs when the activation energy is below energy of electron detachment but with sufficient energy to promote electronic excitation. Using this method Hadi Lioe et al. compared EID with low energy CID of singly protonated amino acids. They proposed that EID results in fragmentations involving both electronic and vibrational excitations [49]. This method was successfully applied to singly charged glycosaminoglycan saccharides [50].

Odd-electron ions (a_4^{*-}/z_4^{*-} and a_5^{*-}/z_5^{*-}) with their satellite ions were still present in the double resonance spectra of $[d(T_2AT_3)-2H]^{2-}$ and $[d(T_2CT_3)-2H]^{2-}$ ions. These ions are not detected in the sequential MS³ EDD–EID/SORI-CID spectra of $[d(T_2AT_3)-2H]^{2-}$ and $[d(T_2CT_3)-2H]^{2-}$ ions, as well as its satellite ion $[a_4^{*-}-T^{*}]^-$ and $[z_5^{*-}-$

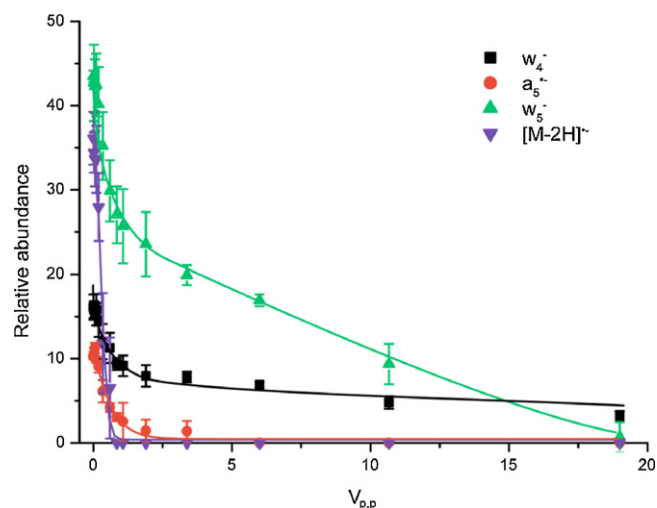
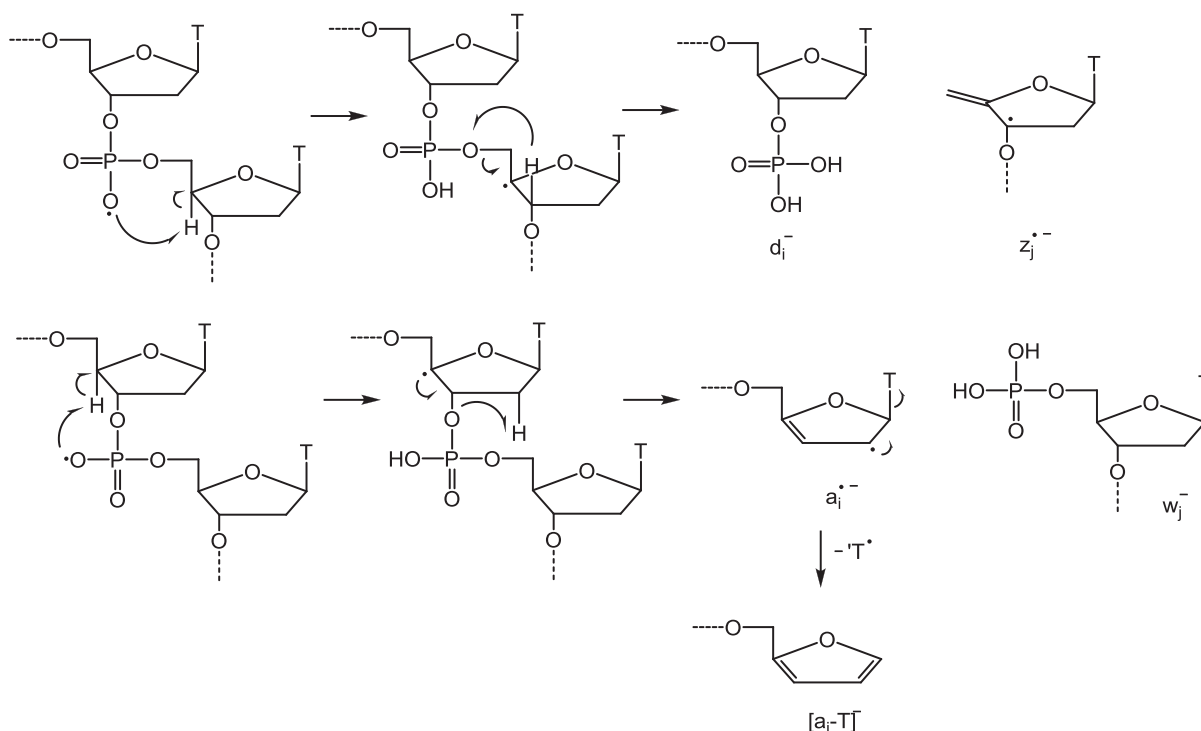


Fig. 5. Curves of relative abundances (abundance fragment ion 1000×/intensity of precursor ion) with variation of energy.

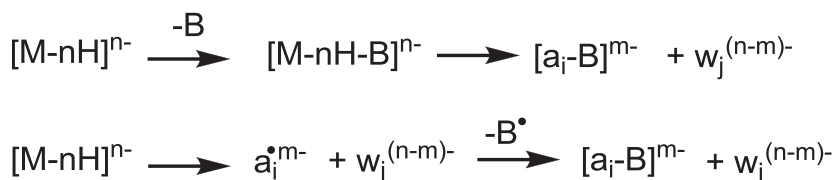
$T^{*}]^-/[z_5^{*-}-T^{*}]^-$ (equivalent to $[a_4-T]^-$ and $[a_5-T]^-/[z_5-T]^-$ ions). This is consistent with the hypothesis that the $[a_4^{*-}-T^{*}]^-$ and $[z_5^{*-}-T^{*}]^-/[z_5^{*-}-T^{*}]^-$ are produced from the consecutive decompositions of the a_4^{*-} and a_5^{*-}/z_5^{*-} ions by loss of a thymine radical (T^{*}).

The singly charged w_5^- ion disappeared in the double resonance spectra of the $[d(T_2AT_3)-2H]^{2-}$ and $[d(T_2CT_3)-2H]^{2-}$ ions but the w_4^- ion was still observed. Nevertheless, in the SORI-CID spectra of $[d(T_2AT_3)-2H]^{2-}$ and $[d(T_2CT_3)-2H]^{2-}$ ions the w_4^- ion was not detected. Our hypothesis is that the w_4^- ion was produced from prompt dissociation (i.e., high dissociation rate constant). The charge reduced ion $[M-2H]^{*-}$ dissociated to provide w_4^- before its ejection. To confirm our hypothesis, a series of double resonance experiments of the $[d(T_2CT_3)-2H]^{2-}$ ion with various ejection amplitudes of $[d(T_2CT_3)-2H]^{*-}$ ion have been realized. To our knowledge such evolution of the ion abundance as a function of double resonance amplitude was never presented for DNA. This experiment allows obtaining information on the kinetics of the different dissociation processes [51]. When the ejection amplitude was increased up to $0.75 V_{p-p}$, the charge reduced $[M-2H]^{*-}$ ion disappeared (Fig. 5) but the fragment ion abundances remained unchanged. In fact, if the time of ejection is larger than the one of the dissociation, some fragment ions can be observed in spite of ejection of the intermediate charge reduced ion. The a_i^{*-} radical ion series and its $[a_i^{*-}-T^{*}]^-$ satellite product ions disappeared from $4 V_{p-p}$ (Fig. 5). Finally, the w_5^- ion disappeared at $19 V_{p-p}$ (Fig. 5), whereas the w_4^- ion was still present. It should be noted that at $19 V_{p-p}$, the w_5^- ion was probably ejected directly by off-resonance excitation as its frequency is relatively close to that of the ejected charge reduced ion. If so, this ion can be produced through the same fragmentation pathways as the w_4^- ion.

In particular in the case of w_4^- , the evolution of the curve suggests that several ion populations exist, that decomposed through either slow or fast dissociation rate constants. In our opinion the slow dissociation rate constant population may correspond to relatively long-lived complexes (ion–dipole e.g., $[w_4^-, a_2^{*}]$) that can be ejected prior to their dissociations (i.e., $[w_4^-, a_2^{*}] \rightarrow w_4^- + a_2^{*}$). The existence of such complexes has been considered in particular in the case of peptides and their formation allows to explain the formation of c^{*}/z' ion pairs in addition to the conventional c/z^{*} ions usually observed [35]. This probably explains why the double resonance curves of a_i^{*-} and w_j ions present a similar trend. It is noteworthy that even with relatively high ejection amplitude, part of the w_4^- ions remained corresponding to very fast dissociation processes. We cannot rule out that a fraction of the w_4^-



Scheme 2. Proposed mechanism for DNA electron detachment dissociation.



Scheme 3.

and w_5^- ions could come from the “normal” dissociation process. In the SORI-CID spectrum of $[M-2H]^{2-}$ ion for $d(T_2AT_3)$, the w_4^{2-} and w_5^{2-} ions were detected. In the same way the charge reduced $[M-2H]^{\bullet-}$ ion could yield the w_4^- and w_5^- ion through a charge driven decomposition pathway, in this case the radical have to be localized on the neutral.

In addition, our experiments showed that thymine is the unique base lost as a radical. No loss of other nucleobase radical was observed. Hakansson and co-workers [23] performed EDD experiment with $[dA_6-2H]^{2-}$ and found the same radical ion series ($a_4^{\bullet-}/z_4^{\bullet-}$ and $a_5^{\bullet-}/z_5^{\bullet-}$) with satellite product ions corresponding to the loss of adenine. This suggests that adenine may also be lost through a radical process, but this hypothesis must be confirmed by double resonance experiments, because adenine can easily be lost by a conventional charge driven mechanism as shown above. The relative intensity of the w_j^- ions displayed in the sequential EDD-EID/SORI-CID (MS^3) spectra of $[d(T_2AT_3)-2H]^{2-}$ and $[d(T_2CT_3)-2H]^{2-}$ increase with the m/z value of the product ions. This behavior reflects the regular distribution of charge along the sequence and shows that the fragmentation in EDD pathway is mainly independent of the nucleotide sequence. Most likely, the negative charges are randomly localized on the phosphate groups. In the recent electron photodetachment work of Gabelica et al., it was shown that the electron detachment efficiency was in the order $dG_6 > dT_6 > dA_6 > dC_6$. The photodetachment effectiveness is therefore strongly base dependent [52]. In particular, guanine which has the lowest ionization energy and lower electron affinity [53,54]

yielded a higher efficiency of electron photodetachment under UV irradiation at 260 nm [55]. Other studies showed that when the DNA strand contains guanine, the highest occupied molecular orbital can be located on the base and not on the phosphate [56,57].

Based on our experimental results, a mechanism is proposed for radical driven dissociation of DNA by EDD process (Scheme 2) where the charge is spectator. It is considered that the negative charge is initially on the phosphate group. Electron detachment yields an unstable radical phosphate. In Scheme 2a, a 1–5 hydrogen transfer yields a more stable tertiary radical. Consecutively, a 1–4 hydrogen transfer, leads to the formation of the complementary $z_i^{\bullet-}$ and d_j ions. Finally, loss of $T^\bullet$ yields the $[z_i-T]^-$ ion. In a very analogous way, Scheme 2b, allows to explain the formation of the $a_j^{\bullet-}$, $[a_i-T]^-$ and w_j ion series.

5. Conclusion

EDD dissociation of DNA shows abundant loss of thymine. It is favored by a radical process whereas it is very difficult to achieve with conventional dissociation processes due to its lower proton affinity. In fact, with vibrational activation modes, the loss of nucleobases is the first rupture leading to the $[a_i-B]^-$ and w_j^- ion series.

Our sequential EDD/SORI-CID MS^3 and double resonance experiments showed that all fragment ions involving the loss of thymine in the EDD spectra come from the $a_i^{\bullet-}$ radical ion. The combination of double resonance and EDD/SORI-CID allows decoupling of these two processes which distinguishes the fragment ions that were pro-

duced from EID and those produced from “pure” EDD. The results of EDD, EDD/SORI-CID MS³ and double resonance confirm the conclusion of Kinet et al. [48] that in EDD the base loss occurs after cleavage of the sequence while with vibrational activation the base loss is the origin of the DNA backbone cleavages as summarized in Scheme 3. We presented an evolution of the ion abundances as a function of double resonance ejection amplitude in order to obtain information on the kinetics of the different dissociation processes. Two mechanisms involving radical driven pathways have been proposed concerning only the thymine base, because no loss of the other nucleobase radical was observed. Finally it was demonstrated that the “pure” EDD processes are very random along the sequence whereas some more specific cleavages are produced through EID. In comparison with vibrational activation processes the EDD technique is a complementary tool for DNA structure determination. In addition, the EDD/SORI-CID method allows obtaining a specific mode of EDD fragmentation of oligonucleotides.

References

- [1] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science* 246 (1989) 64–71.
- [2] H. Köster, K. Tang, D.-J. Fu, A. Braun, D. van den Boom, C.L. Smith, R.J. Cotter, C.R. Cantor, A strategy for rapid and efficient DNA sequencing by mass spectrometry, *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 1123–1128.
- [3] R.H. Griffey, M.J. Greig, H.J. Gaus, K. Liu, D. Monteith, M. Winniman, L.L. Cummins, Characterization of oligonucleotide metabolism in vitro via liquid chromatography/electrospray in tandem mass spectrometry with a quadrupole ion trap mass spectrometer, *J. Mass Spectrom.* 32 (1997) 305–313.
- [4] X. Guo, M.F. Bruist, D.L. Davis, C.M. Bentley, Secondary structural characterization of oligonucleotide strands using electrospray ionization mass spectrometry, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 3659–3666.
- [5] G. Chowdhury, F.P. Guengerich, Direct detection and mapping of sites of base modification in DNA fragments by Tandem Mass Spectrometry, *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (2008) 381–384.
- [6] J.W. Flora, J.C. Hannis, D.C. Muddiman, High-mass accuracy of product ions produced by SORI-CID using a dual electrospray ionization source coupled with FTICR mass spectrometry, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1247–1251.
- [7] K.X. Wana, M.L. Gross, Fragmentation mechanisms of oligodeoxynucleotides: effects of replacing phosphates with methylphosphonates and thymines with other bases in T-rich sequences, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12 (2001) 580–589.
- [8] T.M. Selina Monn, S. Schürch, New aspects of the fragmentation mechanisms of unmodified and methylphosphonate-modified oligonucleotides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (2007) 984–990.
- [9] K.X. Wan, J. Gross, F. Hillenkamp, M.L. Gross, Fragmentation mechanisms of oligodeoxynucleotides studied by H/D exchange and electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12 (2001) 193–205.
- [10] Z. Wang, K.X. Wan, R. Ramanathan, J.S. Taylor, M.L. Gross, Structure and fragmentation mechanisms of isomeric T-rich oligodeoxynucleotides: a comparison of four tandem mass spectrometric methods, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 9 (1998) 683–691.
- [11] A.K. Vrkic, R.A.J. O'Hair, S. Foote, G.E. Reid, Fragmentation reactions of all 64 protonated trimer oligodeoxynucleotides and 16 mixed base tetramer oligodeoxynucleotides via tandem mass spectrometry in an ion trap, *Int. J. Mass Spectrom.* 194 (2000) 145–164.
- [12] N. Russo, M. Toscano, A. Grand, F. Jolibois, Protonation of thymine, cytosine, adenine, *J. Comput. Chem.* 19 (1998) 989–1000.
- [13] R.A. Zubarev, D.M. Horn, E.K. Fridriksson, N.L. Kelleher, N.A. Kruger, M.A. Lewis, B.K. Carpenter, F.W. McLafferty, Electron capture dissociation for structural characterization of multiply charged protein cations, *Anal. Chem.* 72 (2000) 563–573.
- [14] R.A. Zubarev, Reactions of polypeptide ions with electrons in the gas phase, *Mass Spectrom. Rev.* 22 (2003) 57–77.
- [15] R.A. Zubarev, Electron-capture dissociation tandem mass spectrometry, *Curr. Opin. Biotechnol.* 15 (2004) 12–16.
- [16] J.E.P. Syka, J.J. Coon, M.J. Schroeder, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 9528–9533.
- [17] E. Mirgorodskaya, P. Roepstorff, R.A. Zubarev, Localization of O-glycosylation sites in peptides by electron capture dissociation in a Fourier transform mass spectrometer, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4431–4436.
- [18] B.A. Budnik, K.F. Haselmann, R.A. Zubarev, Electron detachment dissociation of peptide di-anions: an electron-hole recombination phenomenon, *Chem. Phys. Lett.* 342 (2001) 299–302.
- [19] J.J. Wolff, I.J. Amster, L. Chi, R.J. Linhardt, Electron detachment dissociation of glycosaminoglycan tetrasaccharides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (2007) 234–244.
- [20] Y. Xu, C. Afonso, R. Wen, J.-C. Tabet, Investigation of double-stranded DNA/drug interaction by ESI/FT ICR: orientation of dissociations relates to stabilizing salt bridges, *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 1531–1544.
- [21] T.W. Bentley, R.A.W. Johnstone, Mechanism and structure in mass spectrometry: a comparison and other chemical processes, *Adv. Phys. Org. Chem.* 8 (1970) 151–269.
- [22] R.B. Cody, B.S. Freiser, Electron impact excitation of ions from organics: an alternative to collision induced dissociation, *Anal. Chem.* 51 (1979) 547–551.
- [23] J. Yang, J. Mo, J.T. Adamson, K. Hakansson, Characterization of oligodeoxynucleotides by electron detachment dissociation Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1876–1882.
- [24] J. Yang, K. Hakansson, Characterization of oligonucleotide fragmentation pathways in infrared multiphoton dissociation and electron detachment dissociation by Fourier transform ion cyclotron double resonance, *J. Mass Spectrom.* 15 (2009) 293–304.
- [25] V. Gabelica, F. Rosu, E. De Pauw, R. Antoine, T. Tabarin, M. Broyer, P. Dugourd, Electron photodetachment dissociation of DNA anions with covalently or noncovalently bound chromophores, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (2007) 1990–2000.
- [26] R. Antoine, L. Joly, T. Tabarin, M. Broyer, P. Dugourd, J. Lemoine, Photoinduced formation of radical anion peptides. Electron Photodetachment dissociation experiments, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 265–268.
- [27] B. Liu, P. Hvelplund, S. Brøndsted Nielsen, S. Tomita, Electron loss and dissociation in high energy collisions between multiply charged oligonucleotide anions and noble gases, *Int. J. Mass Spectrom.* 230 (2003) 19–24.
- [28] P. Hvelplund, S.B. Nielsen, M. Sørensen, J.U. Andersen, T.J.D. Jørgensen, Electron loss from multiply protonated lysozyme ions in high energy collisions with molecular oxygen, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12 (2001) 889–893.
- [29] A. Scott, McLuckey, G.J. Van Berkel, G.L. Glush, Tandem mass spectrometry of small, multiply charged oligonucleotides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 3 (1992) 60–70.
- [30] H.J. Yoo, H. Liu, K. Hakansson, Infrared multiphoton dissociation and electron-induced dissociation as alternative MS/MS strategies for metabolite identification, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7858–7866.
- [31] M.B. Comisarow, V. Grassi, G. Parisod, Fourier transform ion cyclotron double resonance, *Chem. Phys. Lett.* 57 (1978) 413–416.
- [32] J.C. Jurchen, D.E. Garcia, E.R. Williams, Gas-phase dissociation pathways of multiply charged peptide clusters, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14 (2003) 1373–1386.
- [33] S. Bourgoïn-Voillard, E.-L. Zins, F. Fournier, Y. Jacquot, C. Afonso, C. Pèpe, G. Leclercq, J.-C. Tabet, Stereochemical effects during [M–H]⁺ dissociations of epimeric 11-OH-17 β -estradiols and distant electronic effects of substituents at C(11) position on gas phase acidity, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20 (2009) 2318–2333.
- [34] C.B. Theissling, N.M.M. Nibbering, S. Meyerson, The long-lived molecular ion of propionitrile: an ion cyclotron resonance study, *Org. Mass Spectrom.* 11 (1976) 838–843.
- [35] C. Lin, J.J. Cournoyer, P.B. O'Connor, Use of a double resonance electron capture dissociation experiment to probe fragment intermediate lifetimes, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 17 (2006) 1605–1615.
- [36] R.C. Dunbar, Ion-molecule chemistry of diborane by ion cyclotron resonance, *J. Am. Chem. Soc.* 90 (1968) 5676–5682.
- [37] M.T. Bowers, D.D. Elleman, J.L. Beauchamp, Ion cyclotron resonance of olefins. I. Study of the ion-molecule reactions in electron-impacted ethylene, *J. Phys. Chem.* 72 (10) (1968) 3599–3612.
- [38] J.L. Beauchamp, M.C. Caserio, Ion-molecule reactions of 2-butanol by ion cyclotron resonance spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (8) (1972) 2638–2646.
- [39] B.S. Freiser, T.B. McMahon, J.L. Beauchamp, Ion ejection phenomena in ion cyclotron double resonance experiments, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 12 (3) (1973) 249–255.
- [40] R. Houriet, J.-C. Tabet, Ion-molecule reactions in the gas phase. II. Bimolecular nucleophilic substitution from adduct ions of 2-cyclohexenol and ammonia studied by ion cyclotron resonance spectroscopy, *Nouv. J. Chim.* 6 (11) (1982) 565–569.
- [41] S. Alves, A. Woods, J.-C. Tabet, Charge state effect on the zwitterion influence on stability of non-covalent interaction of single-stranded DNA with peptides, *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 1613–1622.
- [42] F. Fournier, B. Remaud, T. Blasco, J.C. Tabet, Ion-dipole complex formation from deprotonated phenol fatty acid esters evidenced by using gas-phase labeling combined with tandem mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 4 (1993) 343–351.
- [43] F. Fournier, M.-C. Perlat, J.-C. Tabet, Control of internal proton transfers on ion-dipole complexes from [M–H]⁺ ions of diphenol esters, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9 (1995) 13–17.
- [44] A. Delvolve, J.-C. Tabet, S. Bregant, C. Afonso, F. Burlina, F. Fournier, Charge dependent behavior of PNA/DNA/PNA triplexes in gas phase, *J. Mass Spectrom.* 41 (2006) 1498–1508.
- [45] M. Boutin, C. Bich, C. Afonso, F. Fournier, J.-C. Tabet, Negative-charge driven fragmentations for evidencing zwitterionic forms from doubly charged coppered peptides, *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 25–35.
- [46] S. Alves, A. Woods, A. Delvolve, J.-C. Tabet, Influence of salt bridge interactions on the gas-phase stability of DNA/peptide complexes, *Int. J. Mass Spectrom.* 43 (11) (2008) 1531–1544.
- [47] E.P. Hunter, S.G. Lias, Evaluated gas phase basicities and proton affinities of molecules: an update, *J. Phys. Chem. Ref. Data* 27 (1998) 413–656.
- [48] C. Kinet, V. Gabelica, D. Balbeur, E. De Pauw, Electron detachment dissociation (EDD) pathways in oligonucleotides, *Int. J. Mass Spectrom.* 283 (2009) 206–213.
- [49] H. Lioe, 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 (2007) 1429–1437.
- [50] J.J. Wolff, T.N. Laremore, H. Aslam, R.J. Linhardt, I.J. Amster, Electron-induced dissociation of glycosaminoglycan tetrasaccharides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19 (2008) 1449–1458.
- [51] S. Bourgoïn-Voillard, E.-L. Zins, F. Fournier, Y. Jacquot, C. Afonso, C. Pèpe, G. Leclercq, J.-C. Tabet, Stereochemical effects during $[M-H]^-$ dissociations of epimeric 11-OH-17-estradiols and distant electronic effects of substituents at C(11) position on gas phase acidity, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20 (2009) 2318–2333.
- [52] V. Gabelica, F. Rosu, T. Tabarin, C. Kinet, R. Antoine, M. Broyer, E. De Pauw, P. Dugourd, Base-dependent electron photodetachment from negatively charged DNA strands upon 260-nm laser irradiation, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 4706–4713.
- [53] E.S. Chen, E.C.M. Chen, The role of spin in biological processes: O_2 , NO, nucleobases, nucleosides, nucleotides and Watson–Crick base pairs, *Mol. Simul.* 35 (2009) 719–724.
- [54] D. Roca-Sanjuán, M. Merchán, L. Serrano-Andrés, M. Rubio, ab initio determination of the electron affinity of DNA and RNA nucleobase, *J. Phys. Chem.* 129 (2008) 095104.
- [55] S.D. Wetmore, R.J. Boyd, L.A. Eriksson, The IPs and EAs of the DNA bases, *Chem. Phys. Lett.* 322 (2000) 129–135.
- [56] X. Yang, X.B. Wang, E.R. Vorpapel, L.S. Wang, Direct experimental observation of the low ionization potentials of guanine in free oligonucleotides using photoelectron spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 17588–17592.
- [57] N.S. Kim, P.R. LeBreton, UV photoelectron and ab initio quantum mechanical evaluation of nucleotide ionization potentials in water-counterion environments: bipolarization effects on DNA alkylation by carcinogenic methylating agents, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 3694–3707.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Mass Spectrometry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijms



Comparison of collision-induced dissociation and electron-induced dissociation of singly charged mononucleotides

Viêt Hung Nguyen^a, Carlos Afonso^{a,b}, Jean-Claude Tabet^{a,*}

^a Equipe de Spectrométrie de masse (CSOB), Institut Parisien de Chimie Moléculaire, UMR 7201, Université Pierre et Marie Curie-Paris6, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France

^b UMR CNRS 6014 COBRA, Université de Rouen, 1 rue Tesnière, 76821 Mont Saint-Aignan, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 November 2011

Received in revised form 23 January 2012

Accepted 26 January 2012

Available online xxx

Keywords:

EID

CID

Mononucleotide

FT-ICR

Non-covalent

ABSTRACT

The dissociation of singly charged mononucleotides by electron induced dissociation (EID) and sustained off resonance irradiation/collision induced dissociation (SORI-CID) was investigated. The experiments have been carried out on deprotonated mononucleotides monomers. In general the same product ions are observed in the EID and SORI-CID spectra but some additional product ions have been obtained with EID. It was shown by MS³ experiments that all these additional product ions have been produced through consecutive dissociations of the [M–2H][–] radical anion. In addition, H/D exchange and sequential MS³ experiments demonstrated that the *m/z* 247 fragment ion produced in EID of deprotonated 2'-deoxyguanosine 5'-monophosphate corresponds to the association of the phosphate group and the nucleobase. They were most likely linked by a non-covalent bond that was initially present in the precursor ion.

© 2012 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

The decomposition of oligonucleotide even electron ions has been successfully carried out using several activation methods such as collision induced dissociation (CID) [1–3] and IRMPD [4]. The obtained activation spectra present similar fragment ions because they are based on ergodic processes involving vibrational excitation [5,6]. Under such activation conditions, mostly charge driven processes take place from even-electron precursor ions. Consequently, the orientation of the fragmentations strongly depends on the proton affinity of each functional group in the charged molecular species [7]. A few years ago, activation methods involving radical driven pathways have been developed such as electron-capture dissociation (ECD) [8–10]. In ECD, multiply charged positive ions can capture one or several electrons. Such process is exothermic (5–7 eV) [11] due to the charge state decrease and generates a radical cation. The distonic charge reduced species consecutively yields covalent bond cleavages (similar or not to CID) with enhanced dissociation rate constants. ECD as well as ETD [12] is widely used for characterization of macromolecules. However, this method is rarely applied for DNA, because they are generally analyzed by mass spectrometry in the negative ion mode. More recently electron-photo-detachment (EPD) [13,14] and electron-detachment-dissociation (EDD) [15–17] have been used

for multiply deprotonated DNA. The electron detachment (electron stripping) processes require electron kinetic energy higher than 20 eV. EDD was successfully applied for multi-deprotonated deoxyoligonucleotides providing complementary fragment ions compared to those formed with vibrational excitation methods [18,19]. For EDD, the electron irradiation duration (*i.e.*, several seconds) is significantly longer than for ECD (typically below 100 ms) [16,20,21]. In particular, it was shown that electron-induced dissociation (EID) occurred concomitantly with purely EDD processes [19,21]. As EDD, EID is performed with relatively high-kinetic-energy electrons but can be used with negatively or positively charged singly charged species [22–26]. Lioe and O'Hair have compared CID and EID of singly protonated aromatic amino acid [27]. They observed that EID yielded quite different and complementary fragmentations compared to those provided by low-energy CID. Zubarev and co-workers [28] investigated activation of peptide ions by electron ionization dissociation. Compared to CID, they observed some different fragment ions due to distonic structures.

In our previous work [21], sequential EDD/sustained off resonance irradiation/collision induced dissociation (SORI-CID) MS³ and double resonance-EDD (DR-EDD) experiments allowed to clarify the origin of the observed fragment ions produced by either EDD or EID [21]. These results showed in particular that EDD processes are very random along the sequence, whereas EID processes yield mostly nucleobase dependent cleavages.

In the present work we are interested in the comparison of the dissociation of deprotonated 2'-deoxynucleotide-5'-monophosphate by EID and CID. The dissociation of

* Corresponding author. Tel.: +33 1 44 27 32 64; fax: +33 1 44 27 38 43.

E-mail addresses: jean-claude.tabet@upmc.fr, tabet@ccr.jussieu.fr (J.-C. Tabet).

2'-deoxynucleotide-5'-monophosphate was already investigated by CID [7,29,30] and more recently, by in vacuum photodissociation [31–33] and APPI [34]. Habibi-Goudarzi and McLuckey investigated the low-energy CID of 2'-deoxynucleotide-3' and -5'-monophosphate [7]. They demonstrated that the base loss is significantly favored by the presence of a phosphate group at the 3' position. On the other hand, both the nucleobase acidity and basicity seem to play an important role. EID results in more decomposition pathways than SORI-CID. In particular, the EID spectra display some odd-electron fragment ions not detected in the corresponding SORI-CID spectra. Our principal aim was to obtain a better mechanistic understanding on the EID processes. Sequential MS³ experiments, double resonance and H/D exchanges were also performed to clarify some mechanisms. By this way, our results suggested that fragment ions remained as ion–dipole complexes, and their formation involve the cleavage of covalent bonds although non-covalent bond is maintained intact.

2. Experimental

2.1. Sample preparation

All mononucleotides were purchased from Sigma–Aldrich Chemicals (St Quentin Fallavier, France) and used without further purification. Sample solutions in water/methanol 80/20 have been prepared using deionized water (18.2 MΩ) and HPLC grade methanol. The final concentration of the mononucleotide solutions was 20 μM.

2.2. Mass spectrometry

All experiments were conducted on an actively shielded 7 T hybrid quadrupole Fourier transform ion cyclotron resonance (hQh-FT/ICR) mass spectrometer (ApexQe, Bruker Daltonics, Billerica, USA). The 2'-deoxynucleotide-5'-monophosphate solutions were infused in an Apollo II electrospray ion source at a flow rate of 135 μL h^{−1} with the assistance of N₂ nebulizing gas. Ionization was performed in the negative mode with an ESI high voltage of 3500 V. Voltage applied in the desolvation zone were; capillary exit −300 V; skimmer −15 V; and skimmer II −8 V. For EID, the ECD lens was set to 20 V and the ECD bias was set to 13 V. Sustained off-resonance irradiation collision-induced dissociations were performed using argon as collision gas introduced using a pulse valve. The ions were excited using excitation amplitude of 3.4 V_{p-p} with a frequency offset of 600 Hz applied for 250 ms. A pumping delay of 2 s was used before the excitation/detection step. All mass spectra and activation spectra were acquired with XMASS (version 6.1, Bruker Daltonics) in broadband mode from *m/z* 50 to *m/z* 500. The image signal was amplified and digitized using 512K data point resulting in the recording of a 0.47 s time domain which was transformed into the corresponding frequency domain by Fourier transform (one zero fill and Sinbell apodization). All

ESI mass spectra were internally calibrated from unambiguous signals. Reported *m/z* ions were compared to the theoretical *m/z* and ions with an error higher than 5 ppm were not considered. IRMPD was performed with a 25 W CO₂ laser (Synrad, Mukilteo, WA, USA) operating at 10.6 μm. Photon irradiation energy was set to 50% of full laser power. The irradiation time was varied from 50 to 80 ms (Fig. 1).

Because of the relatively low efficiency of the EID process, the relative abundance values were determined by excluding the abundance of the precursor ion.

3. Results and discussion

3.1. SORI-CID and EID spectra of 2'-deoxynucleotide-5'-monophosphate

Table 1 (Fig. S1) displayed the relative intensities of product ions produced from deprotonated 2'-deoxynucleotide-5'-monophosphates in SORI-CID and EID modes. The SORI-CID and EID spectra present similar fragment ions. In all cases, the main fragment ions are [(M–H)–BH][−] produced through the loss of nucleobase. The complementary fragment ions (the deprotonated nucleobases (B[−])) are observed in the SORI-CID spectra of [dpC–H][−] (*m/z* 306), [dpU–H][−] (*m/z* 307), [dpA–H][−] (*m/z* 330). The formation mechanism of these fragment ions has been studied in detail by Rodger et al. [35] who proposed that both the [M–H–BH][−] and B[−] complementary ions are considered to be produced by an intramolecular E2-type mechanism from the deprotonated structure. Actually, this process is a *syn*-elimination, promoted by the negative charge, in which the deprotonated 5'-phosphate site attacks the hydrogen atom at 2'_βC (i.e., the β face of the deoxyribose ring) since this reaction is sterically more favorable. It should be noted that, the E2 elimination requires that the 2'C-hydrogen and the leaving group are antiperiplanar [7], which is sterically not possible with the studied system. This could explain the higher energy threshold observed for base released from 2'-deoxynucleotide-5'-monophosphate than that observed from 2'-deoxynucleotide-3'-monophosphate [7]. An alternative mechanism can be proposed by considering that the dissociation of the deprotonated 2'-deoxynucleotide-5'-monophosphate occurs from a population of anions with zwitterion (ZW) structures (i.e., two negative charges and one positive charge) rather than a canonic form. During the desolvation, in the charged aggregate, the proton can be transferred to the nucleobase. Such a protonation should not occur with thymine and uracil, because of their respective low basicity [36]. Consequently, the competitive formation of U[−] and [(dpU–H)–UH][−] should not be observed. But both these complementary ion species are detected at *m/z* 111 at *m/z* 195, respectively (Table 2). Therefore, the mechanism involving ZW as an intermediate form must be ruled out. So, to observe deprotonated uracil (and competitively, its neutral form), an assistance mechanism is required. By considering a stepwise process, it can be assumed that a proton transfer

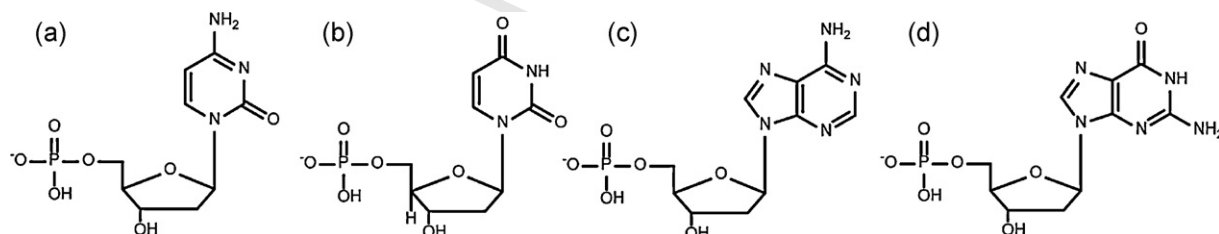


Fig. 1. Structure of (a) 2'-deoxycytidine-5'-monophosphate, (b) 2'-deoxyuridine-5'-monophosphate, (c) 2'-deoxyadenosine-5'-monophosphate and (d) 2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate.

Table 1

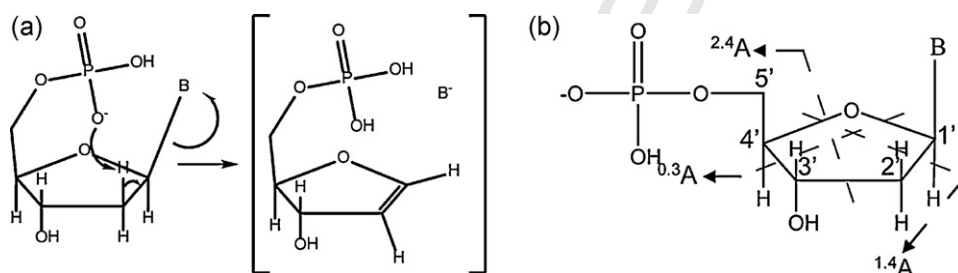
Relative abundance of fragment ions produced in the SORI-CID and EID spectra of deprotonated 2'-deoxynucleotide-5'-monophosphate (radical fragment ions are in bold).

	dpC		dpU		dpA		dpG	
	<i>m/z</i>	CID (EID)	<i>m/z</i>	CID (EID)	<i>m/z</i>	CID (EID)	<i>m/z</i>	CID (EID)
[M–H–43] [–]	263	9 (0)						
[(M–H)–BH] [–]	195	64 (39)	195	79 (43)	195	54 (43)	195	58 (31)
[(M–2H)–BH] ^{•–}	194							0 (3)
[(M–H)–BH–H ₂ O] [–]	177	18 (29)	177	15 (25)	177	21 (41)	177	6 (1)
^{1,4} A [–]			166	0 (8)			166	0 (5)
^{2,4} A [–]			136	0 (7)				
B [–]	110	5 (0)	111	7 (0)	134	24 (16)	149	32 (5)
[B–H] ^{•–}								0 (3)
H ₂ PO ₄ [–]	97	3 (32)	97	0 (17)	97	1 (0)	0 (0)	0 (0)
[M–H–C ₅ H ₇ O ₂] ^{•–}								0 (16)
R ^a		16		13.5		3 (5)		2 (2.5)

^a R = ([[(M–H)–BH][–]] + [[(M–H)–BH–H₂O][–]])/[B[–]].**Table 2**

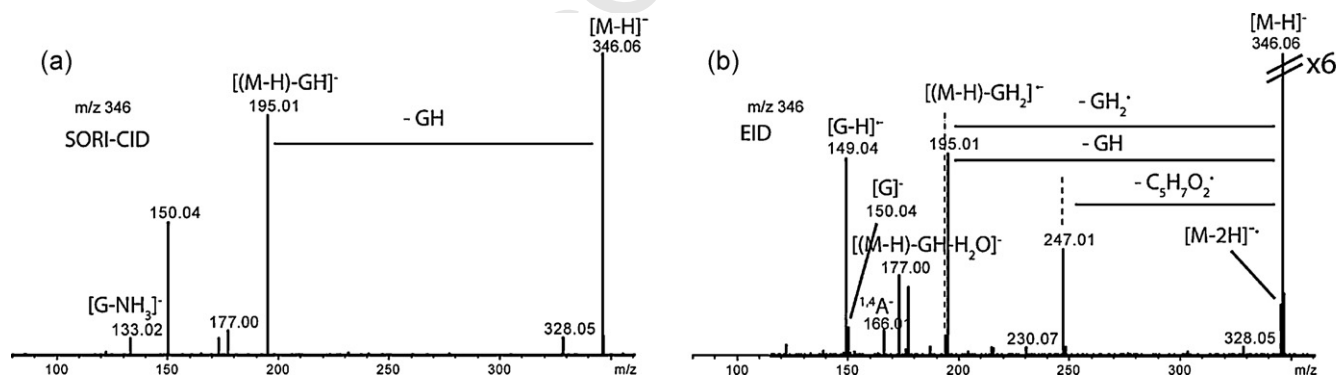
Elemental composition of fragment ions observed in the SORI-CID and EID spectra of 2'-deoxynucleotide-5'-monophosphate.

Exact mass (u)	Elemental composition	Error (ppm)	Mononucleotides	Comment
96.9696	H ₂ O ₄ P [–]	0	All mononucleotides	Phosphate group
110.0360	C ₄ H ₄ N ₃ O [–]	5	dpU	Uridine
111.0200	C ₄ H ₃ N ₂ O ₂ [–]	1.7	dpC	Cytosine
134.0472	C ₅ H ₄ N ₅ [–]	1.5	dpA	Adenosine
135.9931	C ₃ H ₅ O ₄ P ^{•–}	0.7	dpU	Cleavage ribose (^{2,4} A)
138.9802	C ₂ H ₄ O ₅ P [–]	3	dpC, dpG	Cleavage ribose (^{0,3} A)
149.0343	C ₅ H ₃ N ₅ O ^{•–}	1.4	dpG	Radical guanosine
150.0421	C ₅ H ₄ N ₅ O [–]	1.6	dpG	Guanosine
150.9802	C ₃ H ₄ O ₅ P [–]	7	dpU, dpC, dpA	Unknown
166.0037	C ₄ H ₇ O ₅ P ^{•–}	2.5	dpC, dpU, dpG	Ribosecleavage(^{1,4} A)
176.9958	C ₅ H ₆ O ₅ P [–]	0	All mononucleotides	Nucleobase and H ₂ O loss
195.0064	C ₅ H ₈ O ₆ P [–]	0	All mononucleotides	Nucleobaseloss
247.0112	C ₅ H ₈ N ₅ O ₅ P ^{•–}	2	dpG	Phosphate group + guanosine

**Fig. 2.** (a) Mechanism of 2'-deoxynucleotide-5'-monophosphate fragmentation [35] and (b) nomenclature for cross-ring cleavages [37].

from the 2_βC site to the deprotonated phosphate group takes place to assist the deprotonated base release. From this process (Fig. 2), formation of an anion–dipole ([[(dpU–H)–B], B[–]) complex occurs with an unsaturation at the C₂–C₁ position.

During the second step, an intra ion–dipole proton transfer takes place from the phosphate group to the deprotonated uracil. Thus, the gas phase acidity of the nucleobase must play a role in the evolution of the ([[(M–H)–BH][–]] + [[(M–H)–BH–H₂O][–]])/[B[–]]

**Fig. 3.** Activation spectra of deprotonated 2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate (*m/z* 346) recorded in the (a) SORI-CID and (b) EID modes.

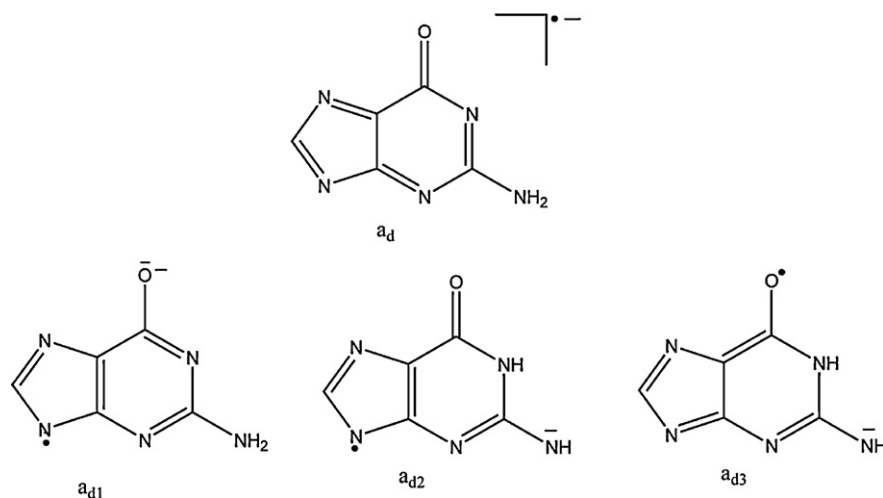


Fig. 4. Different structures proposed for radical guanine anions [40].

ratio. From our results with SORI-CID this ion abundance ratios evolves as: $\text{dpG} > \text{dpA} > \text{dpU} > \text{dpC}$. This evolution suggests comparing only purines (G and A bases) and pyrimidines (U and C bases). Indeed, it seems necessary to separate these two classes of 2'-deoxynucleotide-5'-monophosphates, for such comparison. The role played by the acidity is not the only one because the excitation energy effect influences strongly this ratio as shown in the work of Kebarle [29].

A similar trend is observed in EID mode. However, the consecutive losses of $[\text{BH} + \text{H}_2\text{O}]$ are reinforced whereas the B^- ion decrease partially for the purine bases and disappears for pyrimidine bases. Note that the consecutive losses reflected higher internal energy on the deprotonated 2'-deoxynucleotide-5'-monophosphate. Nevertheless, from Kebarle's study, it should be expected enhanced B^- anion abundances with higher internal energy which is not observed from our results, since the B^- abundance decreased (or disappeared) [29].

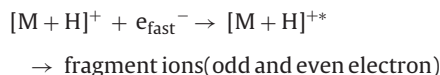
The loss of H_2O from the $[(\text{dpX}-\text{H})-\text{XH}]^-$ ($\text{X}=\text{C}, \text{U}, \text{A}$ or G) fragment ions was observed from the deprotonated 2'-deoxynucleotide-5'-monophosphate. Habibi-Goudarzi and McLuckey et al. [7] proposed that this arises from the hydroxyl loss at $3'\alpha\text{C}$ and the proton at $4'\alpha\text{C}$. Minor contributions are observed for H_2PO_4^- (m/z 97), the formation of this ion is explained by an E2 type mechanism in which the phosphate alkoxide attacks the $4'\alpha\text{C}-\text{H}$ of the sugar while the phosphate ester linkage oxygen becomes the anion leaving group. The abundance of H_2PO_4^- ion in EID spectra is generally greater than the one in SORI-CID spectra. This trend cannot be explained only by considering the acidity and the activation mode (SORI-CID vs EID). Most likely, it also depends on the initial conformation of the precursor ion. Interestingly the fragment ion $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_3\text{PO}_4]^-$ was not detected while the H_2PO_4^- ion is detected. This indicates that the acidity of H_3PO_4 is much higher than that of the $[\text{M}-\text{H}_3\text{PO}_4]$ neutral, and therefore that the lifetime of the $[\text{H}_2\text{PO}_4, (\text{M}-\text{H}_3\text{PO}_4)]^-$ ion dipole complex is too short to allow proton exchange. The loss of 43 u from the precursor ions corresponds to CONH via a retro Diels–Alder like mechanism [7]. The 2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate presenting particular behavior, it will be discussed latter.

Compared to the SORI-CID, the EID spectra of the deprotonated 2'-deoxynucleotide-5'-monophosphates displayed more information. The H_2O loss is also detected with larger abundance in the EID spectra. Under EID conditions, additional fragment ions such as sugar cross-ring cleavages are significantly more abundant than those detected in the SORI-CID spectra [37]. These fragment ions are very useful for determining the deoxyribose substituent location.

These cleavages are mainly observed using keV range collisions as well as from multiply charged oligonucleotide by ECD and EDD [38,12,39]. Beside the loss of nucleobase and the formation of the H_2PO_4^- fragment ion, the EID spectra displayed in several cases radical fragment ions. The formation of these radical ions will be discussed in detail with the deprotonated 2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate (*vide infra*).

3.2. SORI-CID and EID spectra of 2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate

The SORI-CID spectrum of deprotonated 2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate (m/z 346) is reported in Fig. 3a. The main fragment ions were detected at m/z 195 corresponding to the loss of the nucleobase (GH) and deprotonated guanine (G^- , m/z 150). The EID spectrum of deprotonated 2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate (Fig. 3b) displays the m/z 195 ion as main fragment ion. Its consecutive water loss yielding m/z 177 is produced in a similar abundance in the other EID spectra. The m/z 166 and m/z 139 fragment ions were identified as odd electron species that were produced from the rupture of the ribose ring ($^{1,4}\text{A}$ and $^{0,3}\text{A}$). Interestingly additional ions are detected at m/z 247 and m/z 149 which were not observed in CID and on other nucleotide EID spectra. The latter is attributed to $[\text{G}-\text{H}]^{\bullet-}$ radical anion (as confirmed by its elemental composition $\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_3\text{O}^{\bullet-}$ from the accurate mass measurements). The non-radical deprotonated base expected at m/z 150 ($\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_3\text{O}^-$) is detected with very low abundance. The m/z 149 ion, $\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_3\text{O}^{\bullet-}$, odd-electron anion corresponds to dehydrogenated guanine. Its formation could formally involve the release of one $\text{H}^\bullet$ from the m/z 150 deprotonated guanine. In fact, the formation of such odd-electron $[\text{B}-\text{H}]^{\bullet-}$ species has been already considered for explaining some fragment ions generated through particular pathways under EID conditions [27]. The following equation may explain the origin of such charged radical species using fast electron bombardment (*i.e.*, electron kinetic energy of about 20 eV) which yields very likely vertical electronic excitation resulting into vibrational energy in the excited electronic level rather than vibrational energy in the fundamental electronic level:



This process can be considered rather than a stepwise pathway formally proposed in the literature for positive ion $[\text{M} + \text{H}]^+$ which is described by an electronic excitation yielding electron stripping

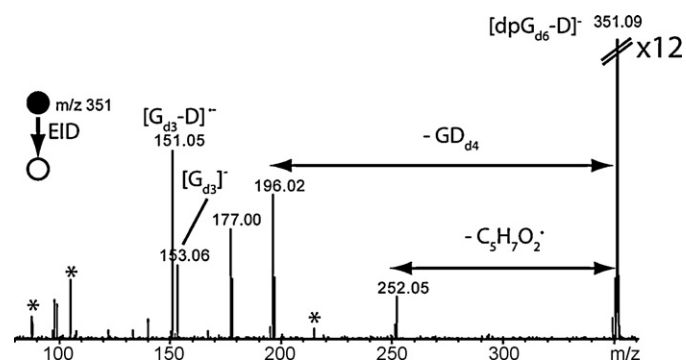


Fig. 5. EID spectrum of $[\text{dpG}_{\text{d6}}-\text{D}]^-$ (m/z 351).

followed by capture of the produced slow electron [27]. In fact, both pathways are similar formally since they assumed, an electronic excited state; the electron can migrate to different sites.

In the EID spectra of the deprotonated 2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate (Fig. 3b), the dehydrogenated nucleobase radical anion $[\text{G}-\text{H}]^{\bullet-}$ is produced as the product ion base peak. This means that its formation is favored and this oxidized species is stable toward further dissociations. Different structures could be proposed (Fig. 4) by considering formation of distonic forms (e.g., the a and a_{di} series calculations are in progress) [40].

Note that the guanine is the nucleic base characterized by the highest electron affinity [41] and the previous observation of the m/z 149 ion suggests also by analogy that the $\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_5\text{O}$ neutral must be characterized by a higher EA value than that of the other nucleic bases [42].

The second additional peak at m/z 247 with the $\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_5\text{O}_5\text{P}^{\bullet-}$ elemental composition, is intriguing because the formation of this radical anion involves, formally the loss of the ribose residue radical (i.e., $\text{C}_5\text{H}_5\text{O}_3^{\bullet}$). The existence of this ion implies that both the phosphate and guanine moieties are maintained together. Two hypotheses can be considered to rationalize the formation of the m/z 247 ion:

- either the even-electron precursor ion in its excited electronic state isomerizes into one particularly stable ion-dipole complex allowing the oxidized ribose residue radical $\text{C}_5\text{H}_5\text{O}_3^{\bullet}$ release. This could take place by a stepwise process, which could be initiated by the homolytic cleavage of the C-C linkage between the sugar moiety and the nucleic base.
- or according to a similar molecular isomerization pathway, the complex which, instead of yielding an ion-dipole complex after the sugar residue release, results into a covalent system in which the nucleic base and the phosphate are bound.

Independently of the previous assumption, the produced m/z 247 ion must be an odd-electron species in a distonic form. This will be discussed later (*vide infra*).

3.3. H/D exchange

H/D exchange experiments were conducted using CH_3OD solution (Fig. 5). The precursor ion at m/z 346 was shifted to m/z 351 consistent with 5 H/D exchanges. The m/z 247 fragment ion was shifted to m/z 252 indicating the presence of 5 deuterons. The oxidized guanine $[\text{B}-\text{H}]^{\bullet-}$ radical anion was detected at m/z 151 (the guanine radical anion without H/D exchange was detected at m/z 149). This indicates that two labile deuterium remained on this radical ion. This is consistent with the structures proposed in Fig. 4.

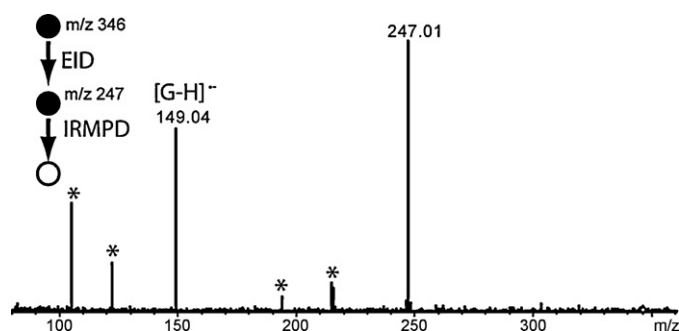


Fig. 6. MS^3 (EID/IRMPD) experiment of m/z 247 for deprotonated 2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate.

3.4. Sequential MS^3 experiments

Fig. 6 displayed the sequential MS^3 experiments from the deprotonated 2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate (EID (m/z 346)/IRMPD (m/z 247)). The EID/IRMPD spectrum displayed only the m/z 149 fragment ion corresponding to the radical nucleobase, demonstrating that the radical nucleobase was produced consecutively from the ion-complex species (m/z 247). Double resonance (DR-IRMPD) experiments with variable excitation energy on the m/z 247 ion was carried out (data not reported), but the relative abundance of the m/z 149 ion remained unchanged [43]. This indicates that the ion-dipole complex is dissociated consecutively with a too high rate constant to observe the DR effect. In this case, the decomposition can be faster than the time of ejection. Gidden and Bowers [41] have proposed that the conformation of 2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate was in a *syn* conformation in which the phosphate group is linked to the nucleobase (guanine) by an intra molecular non covalent bond. Our experiments demonstrated that this non covalent bond was preserved during EID of $[\text{dpG}-\text{H}]^-$ (e.g., m/z 247 fragment ion (Fig. 7)); this behavior presents some analogy to ECD that can allow the cleavage of covalent bond without affecting labile groups (e.g., phosphate group) and preserved non-covalent bonds [44,45].

3.5. Sequential MS^3 experiments on $[\text{dpG}-2\text{H}]^{\bullet-}$

Interestingly, the $\text{H}^{\bullet}$ loss from the precursor ion was produced in significant amount; such radical release was also reported recently [46]. This $\text{H}^{\bullet}$ loss was proposed to be the initial step for the formation of fragment ions through radical driven pathways [27,46]. To demonstrate this suggestion, sequential MS^3 experiments have been carried out. In this case, the double resonance experiment cannot be concomitantly applied with EID, because the $[\text{M}-2\text{H}]^{\bullet-}$ ion (m/z 345) that should be ejected is too close to the $[\text{M}-\text{H}]^-$ precursor ion (m/z 346). Fig. 8a displayed the isolation spectrum of $[\text{dpG}-2\text{H}]^{\bullet-}$, this showed an effective isolation to perform the

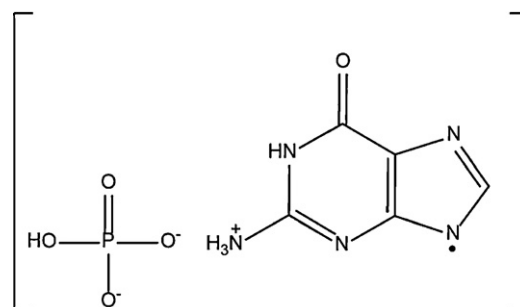


Fig. 7. Proposed structure for m/z 247 ion-dipole complex.

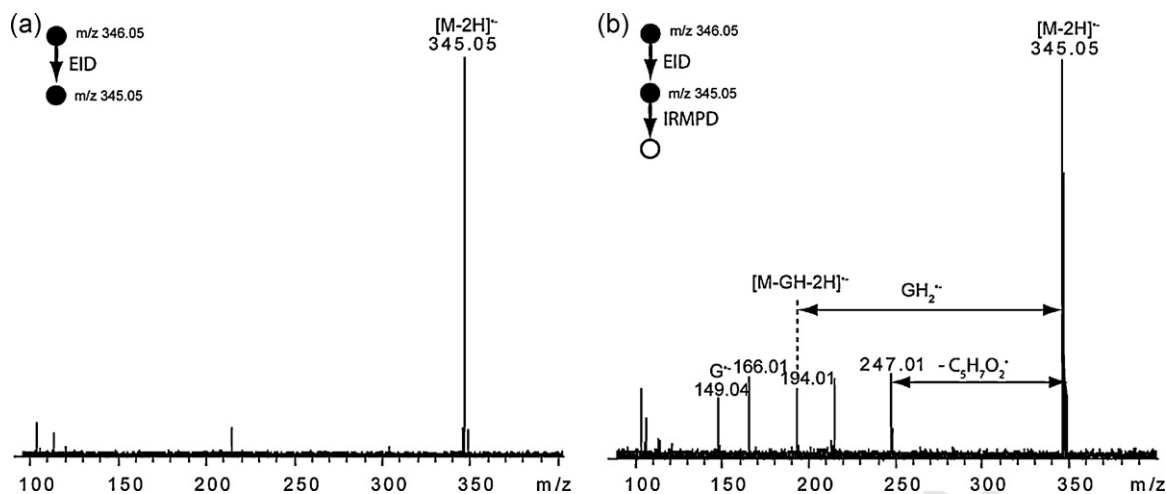


Fig. 8. (a) Isolation spectrum of [dpG-2H]⁺• (*m/z* 345) after EID activation of *m/z* 346 and (b) MS³ spectrum (EID/IRMPD) of [dpG-2H]⁺• (*m/z* 345).

sequential MS³ experiment. In the EID/IRMPD MS³ spectrum (Fig. 8b), the *m/z* 247 ion was detected as well as the guanine radical ion (*m/z* 149). Interestingly, the [M-GH-2H]⁺• ion (*m/z* 194) was observed. This contrasts with the EID spectrum in which both the [M-GH-2H]⁺• and [M-GH-H]⁺• ions (*m/z* 194 and *m/z* 195) were detected. The fragment ion at *m/z* 166 (^{1,4}A) in this sequential MS³ spectrum, identified as a radical fragment ion (C₄H₇O₅P[•]), is also detected. So this experiment confirmed that the fragment ions characteristic of the EID mode are produced through the consecutive dissociation of the unexpected [M-2H]⁺• ion. In the H/D exchange experiment (Fig. 5) the *m/z* 247 ion was shifted to *m/z* 252, indicating the introduction of 5 deuterons; this means that the H[•] loss from the precursor ion during EID activation is not one of the exchangeable protons.

4. Conclusion

The EID spectra displayed more fragment ions than the SORI-CID spectra but all fragment ions observed in the SORI-CID spectra are also detected in the EID spectra. In SORI-CID, the fragmentations from vibrationally activated species yielded mainly charge driven fragmentations, while in EID, radical driven decomposition pathways took place. The principal difference between SORI-CID and EID is the formation of odd-electron fragment ions produced only in EID. Interestingly, cross ring cleavages were detected in the EID spectra which are useful for ribose substituent location. These product ions are in particular very important for location of the substituent in the ribose. Sequential MS³ experiment (EID/IRMPD) demonstrated the stepwise process *via* formation of a stable ion-dipole complex, consistent with the initial precursor ion gas phase conformation, likely due to the formation of intra molecular salt bridge (calculation are in progress). This demonstrated that non covalent bonds can be preserved in EID. Sequential MS³ (EID/IRMPD) spectrum of [dpG-2H]⁺• evidenced that all the fragments specific of the EID mode were produced consecutively to the loss of H[•] from the [dpG-H]⁺ precursor ion. The EID mode appears to be a useful tool to investigate molecular structure and non-covalent interactions.

Acknowledgments

University Pierre & Marie Curie and Sanofi Aventis are acknowledged for financial support. The TGE High field FT-ICR (CNRS) and SM³P platform are gratefully acknowledged for the access to the FTICR mass spectrometer.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ijms.2012.01.015.

References

- [1] J.W. Flora, J.C. Hannis, D.C. Muddiman, High-mass accuracy of product ions produced by SORI-CID using a dual electrospray ionization source coupled with FTICR mass spectrometry, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1247–1251.
- [2] G. Chowdhury, F.P. Guengerich, Direct detection and mapping of sites of base modification in DNA fragments by tandem mass spectrometry, *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (2008) 381–384.
- [3] J. Ni, S.C. Pomerantz, J. Rozenski, Y. Zhang, J.A. McCloskey, Interpretation of oligonucleotide mass spectra for determination of sequence using electrospray ionization and tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1989–1999.
- [4] J. Yang, K. Hakansson, Characterization of oligodeoxynucleotide fragmentation pathways in infrared multiphoton dissociation and electron detachment dissociation by Fourier transform ion cyclotron double resonance, *Eur. J. Mass Spectrom.* 15 (2009) 293–304.
- [5] R.A. Zubarev, M. Witt, G. Baykut, Two-fold efficiency increase by selective excitation of ions for consecutive activation by ion–electron reactions and vibrational excitation in tandem Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Anal. Chem.* 77 (2005) 2992–2996.
- [6] P.M. Mayer, C. Poon, The mechanisms of collisional activation of ions in mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 28 (2009) 608–639.
- [7] S. Habibi-Goudarzi, S.A. McLuckey, Ion trap collisional activation of the deprotonated deoxymononucleoside and deoxydinucleoside monophosphates, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 6 (1995) 102–113.
- [8] A. Stensballe, O.N. Jensen, J.V. Olsen, K.F. Haselmann, R.A. Zubarev, Electron capture dissociation of singly and multiply phosphorylated peptides, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14 (2000) 1793–1800.
- [9] R.A. Zubarev, D.M. Horn, E.K. Fridriksson, N.L. Kelleher, N.A. Kruger, M.A. Lewis, B.K. Carpenter, F.W. McLafferty, Electron capture dissociation for structural characterization of multiply charged protein cations, *Anal. Chem.* 72 (2000) 563–573.
- [10] R.A. Zubarev, Reactions of polypeptide ions with electrons in the gas phase, *Mass Spectrom. Rev.* 22 (2003) 57–77.
- [11] K. Breuker, H. Oh, D.M. Horn, B.A. Cerda, F.W. McLafferty, Detailed unfolding and folding of gaseous ubiquitin ions characterized by electron capture dissociation, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 6407–6420.
- [12] L. Han, C.E. Costello, Electron transfer dissociation of milk oligosaccharides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22 (2011) 997–1013.
- [13] V. Gabelica, F. Rosu, P.E. De, R. Antoine, T. Tabarin, M. Broyer, P. Dugourd, Electron photodetachment dissociation of DNA anions with covalently or noncovalently bound chromophores, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (2007) 1990–2000.
- [14] R. Antoine, L. Joly, T. Tabarin, M. Broyer, P. Dugourd, J. Lemoine, Photo-induced formation of radical anion peptides. Electron photo-detachment dissociation experiments, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 265–268.
- [15] B.A. Budnik, K.F. Haselmann, R.A. Zubarev, Electron detachment dissociation of peptide di-anions: an electron-hole recombination phenomenon, *Chem. Phys. Lett.* 342 (2001) 299–302.
- [16] Y. Xu, C. Afonso, R. Wen, J.C. Tabet, Investigation of double-stranded DNA/drug interaction by ESI/FT ICR: orientation of dissociations relates to stabilizing salt bridges, *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 1531–1544.

- [17] J. Yang, J. Mo, J.T. Adamson, K. Hakansson, Characterization of oligodeoxynucleotides by electron detachment dissociation Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1876–1882.
- [18] J.T. Adamson, K. Hakansson, Electron detachment dissociation of neutral and sialylated oligosaccharides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (2007) 2162–2172.
- [19] C. Kinet, V. Gabelica, D. Balbeur, E. De Pauw, Electron detachment dissociation (EDD) pathways in oligonucleotides, *Int. J. Mass Spectrom.* 283 (2009) 206–213.
- [20] J. Yang, K. Hakansson, Fragmentation of oligoribonucleotides from gas-phase ion–electron reactions, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 17 (2006) 1369–1375.
- [21] V.H. Nguyen, C. Afonso, J.-C. Tabet, Concomitant EDD and EID of DNA evidenced by MSn and double resonance experiments, *Int. J. Mass Spectrom.* 301 (2011) 224–233.
- [22] H.J. Yoo, H. Liu, K. Hakansson, Infrared multiphoton dissociation and electron-induced dissociation as alternative MS/MS strategies for metabolite identification, *Anal. Chem.* (Washington, DC, U.S.) 79 (2007) 7858–7866.
- [23] R.B. Cody, B.S. Freiser, Electron impact excitation of ions from organics: an alternative to collision induced dissociation, *Anal. Chem.* 51 (1979) 547–551.
- [24] B.A. Budnik, K.F. Haselmann, Y.N. Elkin, V.I. Gorbach, R.A. Zubarev, Applications of electron–ion dissociation reactions for analysis of polycationic chito-oligosaccharides in Fourier transform mass spectrometry, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5994–6001.
- [25] B.A. Budnik, 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 (2000) 19–23.
- [26] J. Berkowitz, The quantum yield of ionization, *Phys. Essays* 13 (2000) 248–255.
- [27] H. Lioe, 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 (2007) 1429–1437.
- [28] Y.M.E. Fung, C.M. Adams, R.A. Zubarev, Electron ionization dissociation of singly and multiply charged peptides, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 9977–9985.
- [29] Y. Ho, P. Kebarle, Studies of the dissociation mechanisms of deprotonated mononucleotides by energy resolved collision-induced dissociation, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 165–166 (1997) 433–455.
- [30] R.L. Cerny, M.L. Gross, L. Grotjahn, Fast atom bombardment combined with tandem mass spectrometry for the study of dinucleotides, *Anal. Biochem.* 156 (1986) 424–435.
- [31] G. Aravind, R. Antoine, B. Klaerke, J. Lemoine, A. Racaud, D.B. Rabhek, J. Rajput, P. Dugourd, L.H. Andersen, Sub-microsecond photodissociation pathways of gas phase adenosine 5'-monophosphate nucleotide ions, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12 (2010) 3486–3490.
- [32] S. Nielsen, J. Andersen, J. Forster, P. Hvelplund, B. Liu, U. Pedersen, S. Tomita, Photodestruction of adenosine 5'-monophosphate (AMP) nucleotide ions in vacuo: statistical versus nonstatistical processes, *Phys. Rev. Lett.* 91 (2003).
- [33] J.C. Marcum, A. Halevi, J.M. Weber, Photodamage to isolated mononucleotides-photodissociation spectra and fragment channels, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11 (2009) 1740–1751.
- [34] A. Bagag, A. Giuliani, O. Laprevote, Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of nucleic bases, ribonucleosides and ribonucleotides, *Int. J. Mass Spectrom.* 264 (2007) 1–9.
- [35] M.T. Rodgers, S. Campbell, E.M. Marzluff, J.L. Beauchamp, Low-energy collision-induced dissociation of deprotonated dinucleotides: determination of the energetically favored dissociation pathways and the relative acidities of the nucleic acid bases, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 137 (1994) 121–149.
- [36] E.P.L. Hunter, S.G. Lias, Evaluated gas phase basicities and proton affinities of molecules: an update, *J. Phys. Chem. Ref. Data* 27 (1998) 413–656.
- [37] B. Domon, C.E. Costello, A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates, *Glycoconj. J.* 5 (1988) 397–409.
- [38] D.J. Harvey, R.H. Bateman, M.R. Green, High-energy collision-induced fragmentation of complex oligosaccharides ionized by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 32 (1997) 167–187.
- [39] J.T. Adamson, K. Hakansson, Electron capture dissociation of oligosaccharides ionized with alkali, alkaline Earth, and transition metals, *Anal. Chem.* 79 (2007) 2901–2910.
- [40] S. Naumov, S.C. von, Guanine-derived radicals: dielectric constant-dependent stability and UV/vis spectral properties: a DFT study, *Radiat. Res.* 169 (2008) 364–372.
- [41] J. Gidden, M.T. Bowers, Gas-phase conformations of deprotonated and protonated mononucleotides determined by ion mobility and theoretical modeling, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 12829–12837.
- [42] D. Roca-Sanjuan, M. Merchán, L. Serrano-Andrés, M. Rubio, Ab initio determination of the electron affinities of DNA and RNA nucleobases, *J. Chem. Phys.* 129 (2008), 095104/095101–095104/95104.
- [43] S. Bourgoign-Voillard, E.L. Zins, F. Fournier, Y. Jacquot, C. Afonso, C. Pepe, G. Leclercq, J.C. Tabet, Stereochemical effects during M–H (–) dissociations of epimeric 11-OH-17 beta-estradiols and distant electronic effects of substituents at C-(11) position on gas phase acidity, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20 (2009) 2318–2333.
- [44] R. Zubarev, Electron-capture dissociation tandem mass spectrometry, *Curr. Opin. Biotechnol.* 15 (2004) 12–16.
- [45] Y. Xie, J. Zhang, S. Yin, J.A. Loo, Top-down ESI-ECD-FT-ICR mass spectrometry localizes noncovalent protein–ligand binding sites, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 14432–14433.
- [46] H. Kang, C. Dedonder-Lardeux, C. Juvet, S. Martrenchard, G. Gregoire, C. Desfrancois, J.P. Schermann, M. Barat, J.A. Fayeton, Photo-induced dissociation of protonated tryptophan TrpH(+): A direct dissociation channel in the excited states controls the hydrogen atom loss, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6 (2004) 2628–2632.

Chapitre II : Partie expérimentale

Chapitre I : Introduction

Chapitre III : Résultats et discussion

