

Méthodes d'activation électronique

Prof. Guillaume van der Rest
Laboratoire de Chimie Physique, UMR 8000
Université Paris Sud

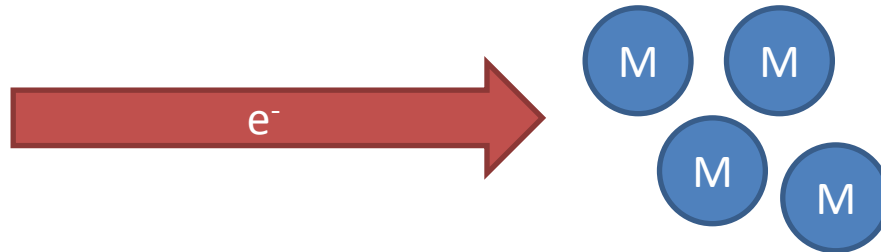
Plan du cours

1. Les origines de l'activation électronique
2. Mise en œuvre instrumentale
3. Fragmentation de peptides et protéines par ECD et ETD
4. Autres modes d'activation par des électrons

LES ORIGINES DE L'ACTIVATION ÉLECTRONIQUE

Activation par des électrons (ExD)

- Interaction directe avec un flux d'électron



Paramètres :

- Energie cinétique des électrons (eV)
Conséquence sur la section efficace d'interaction et l'énergie disponible dans le système
- Flux du faisceau d'électron
- Temps d'irradiation

- Transfert d'électron entre deux molécules



Dissociation par capture d'électrons: les origines

ELSEVIER

International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes 157/158 (1996) 357–364

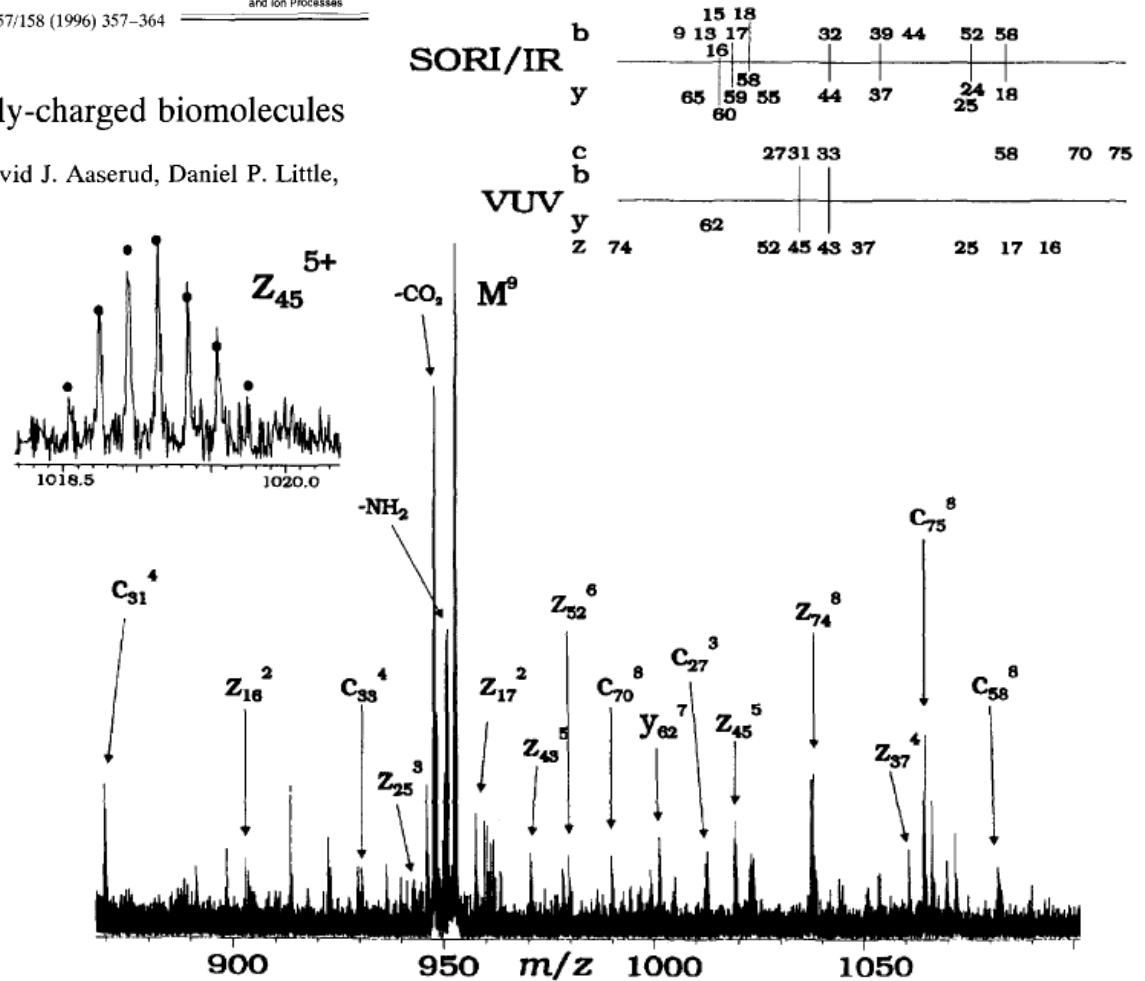
mass spectrometry
and ion processes

193 nm photodissociation of larger multiply-charged biomolecules

Ziqiang Guan, Neil L. Kelleher, Peter B. O'Connor, David J. Aaserud, Daniel P. Little,
Fred W. McLafferty*

Avant même que l'ECD soit identifié, ce qui marque les auteurs :

- Formation d'ions *c* et *z*
- Capacité à fragmenter des systèmes de grande taille.



Dissociation par capture d'électron : formation d'ions c et z

Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A Nonergodic Process

Roman A. Zubarev, Neil L. Kelleher, and Fred W. McLafferty*

J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 3265–3266

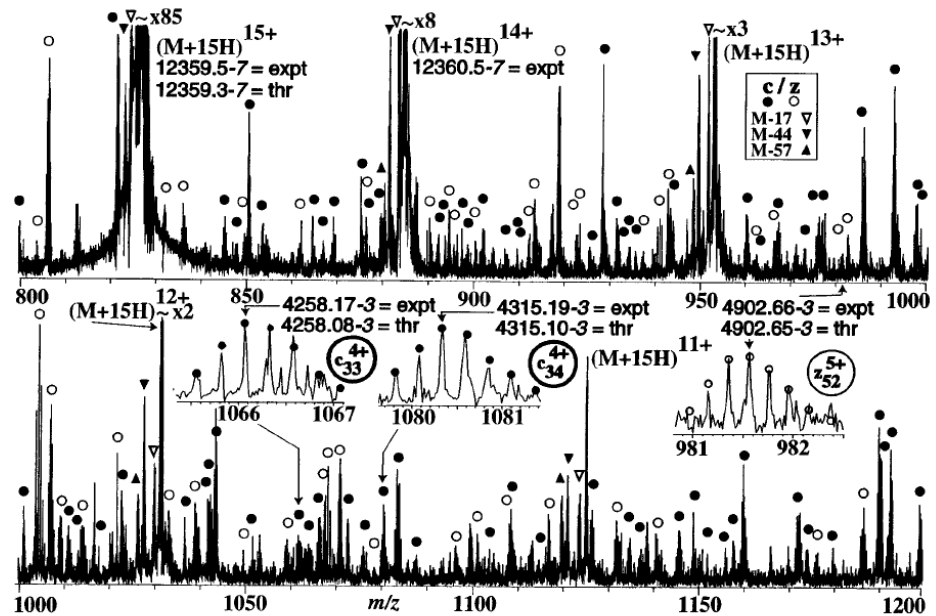
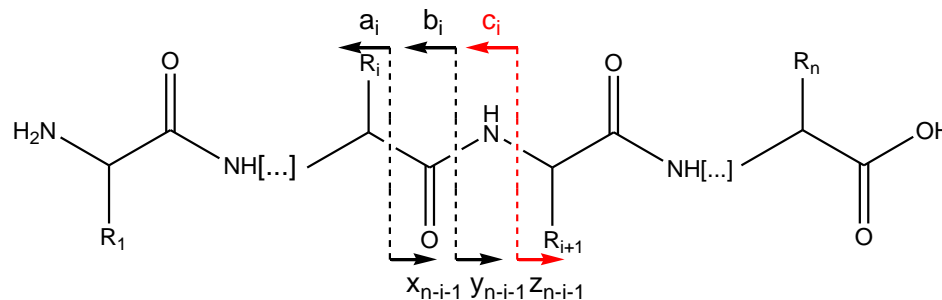
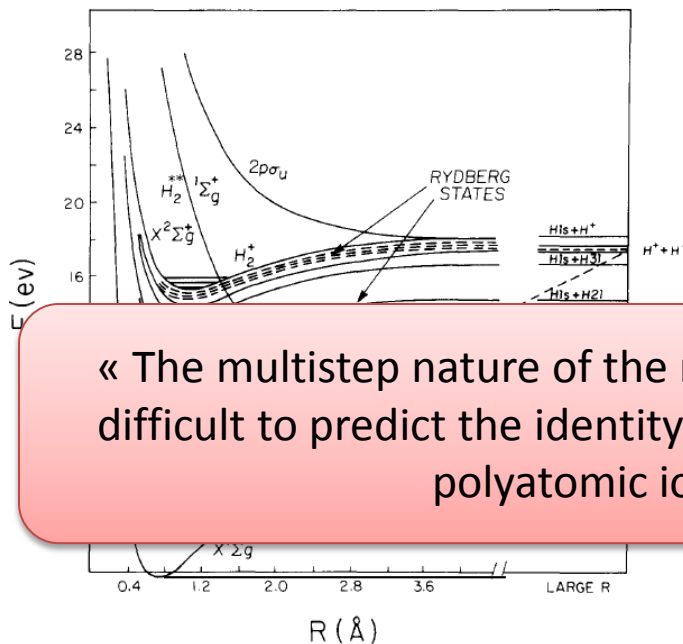


Figure 2. ECD spectra of 15+ ions of cytochrome *c* (Fe^{III}), 16^{75} scans: ∇ , -17 Da; \blacktriangledown , -44 Da; \blacktriangle , -59 Da; \bullet , *c* ions, \circ , *z* ions. Mass values are for the neutral molecule's most abundant isotopic peak; the mass difference (units of 1.0034 Da) between this and the monoisotopic peak is shown by the italicized final digit.⁶ Circles, as in Figure 1.



Recombinaison dissociative: la forme d'origine de l'ECD

- Vers le début des années 1980.
- Molécules d'intérêt astrophysique et planétaire (nuages plasmas ou ionosphère terrestre)



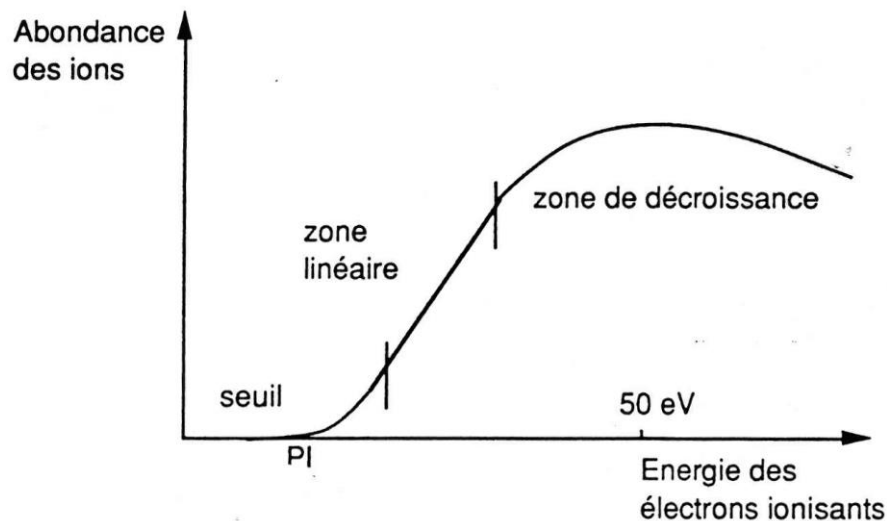
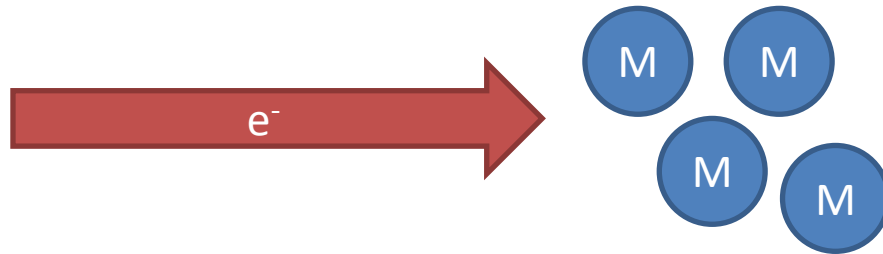
Les théories sur la DR servent de base à la compréhension des premières étapes de l'ECD:

- Capture directe dans un état dissociatif vs capture indirecte dans un état de Rydberg
- Dépendance à l'énergie des électrons en

« The multistep nature of the recombination process means that it is very difficult to predict the identity of the products. This is particularly true for polyatomic ions. » J.B.A. Mitchell, 1990

Review: Mitchell, *Physics Reports* 1990.

Ionisation électronique: une autre forme d'interaction électron - molécule



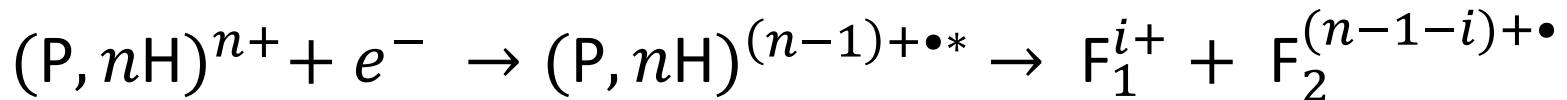
Molécules organiques: PI de l'ordre de 8-12 eV si neutres, plus si déjà chargées.

Fragmentation abondante induite par l'ionisation électronique à 50 eV.

La forme neutre peut ne pas s'ioniser mais interagir avec un électron conduisant à un dépôt d'énergie (via excitation électronique).

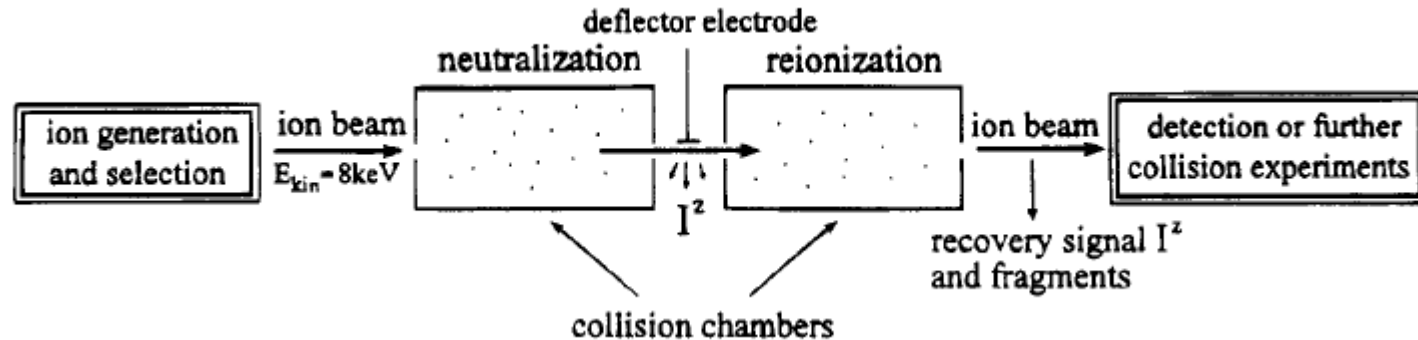
Electron capture dissociation

- Aujourd'hui, le terme ECD est réservé à la méthode d'activation par des électrons de basse énergie d'une molécule multichargée positive, suivant la réaction :



- On détecte ainsi les produits de réaction directement par spectrométrie de masse, et l'activation ECD se compare ainsi aux autres modes d'activation en MS/MS.
- D'autres termes sont apparus pour désigner d'autres modes d'interaction ion / électron.

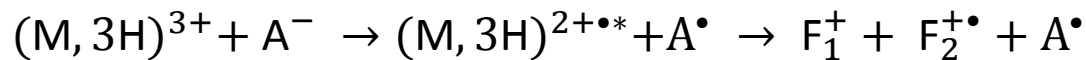
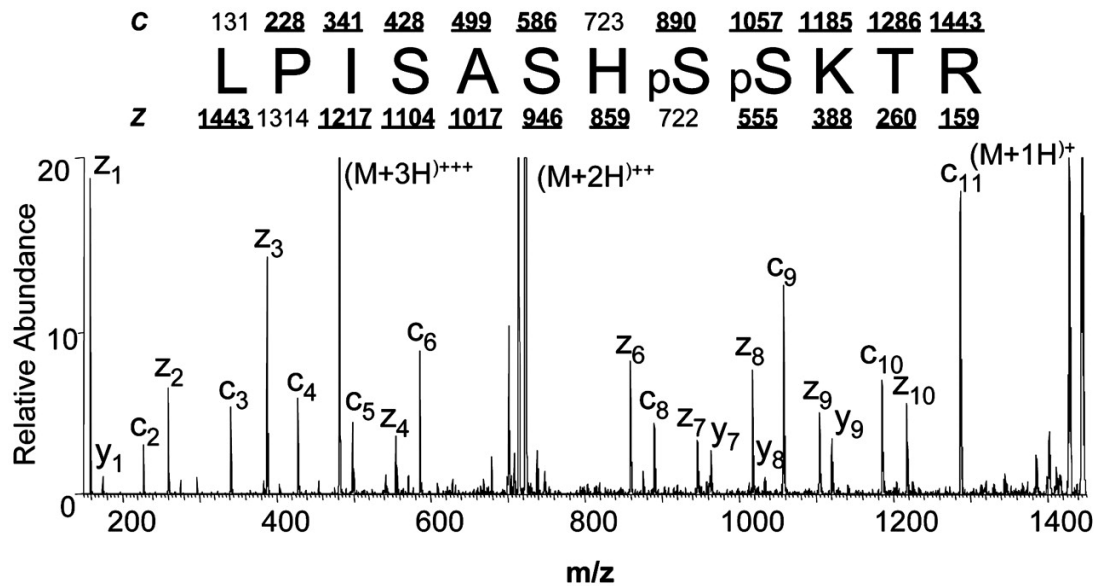
Neutralisation – réionisation sur des spectromètres de masse à secteurs (NRMS)



Schwarz, *Acc. Chem. Res.* 1994

- Neutralisation :
 - divers gaz utilisables (Xe, Hg, Na, Zn, NH_3 , NO, ...)
 - Transfert d'électron vers / de l'ion en faisceau
- Réionisation :
 - En général O_2
- L'énergie cinétique des collisions intervient pour apporter une énergie suffisante à des transferts d'électron endothermiques (notamment pour la réionisation)

Dissociation par transfert d'électron

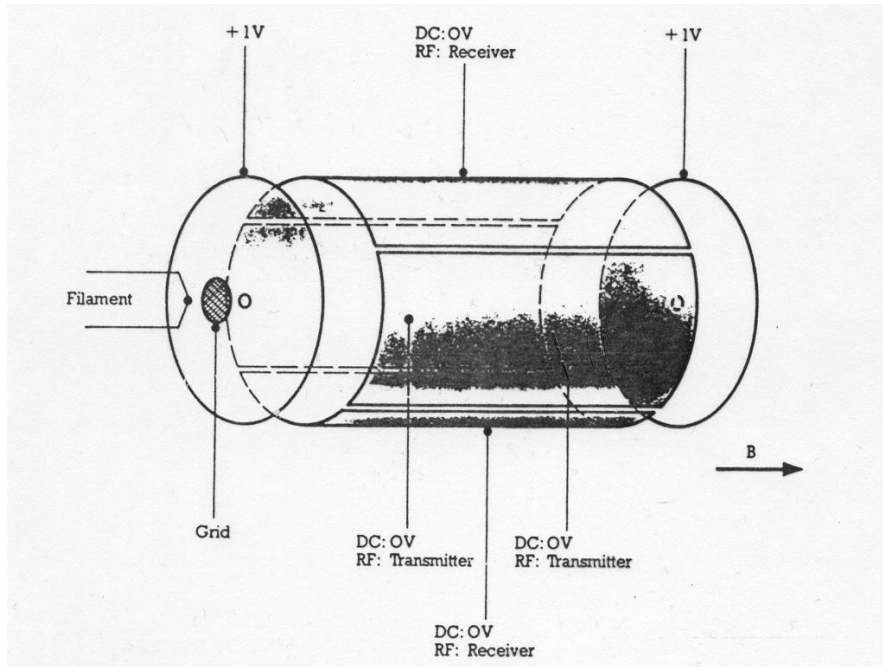


A = C₄H₉⁻ / C₄H₁₁⁻ formé dans une source IC négative (CH₄)

Syka et al, PNAS, 2004

MISE EN ŒUVRE INSTRUMENTALE

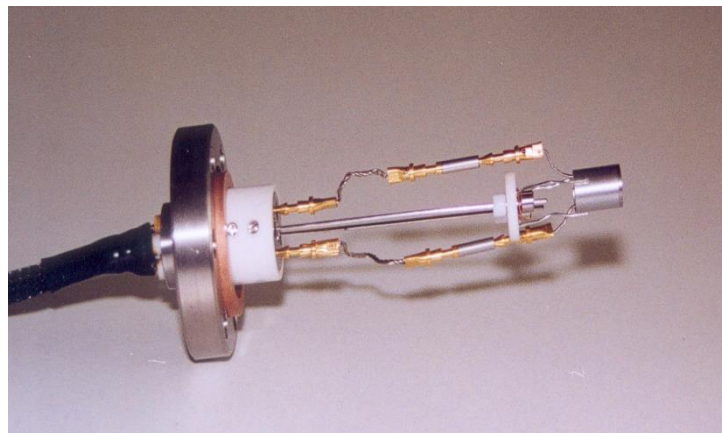
Cellule avec un filament d'ionisation électronique



Les problèmes :

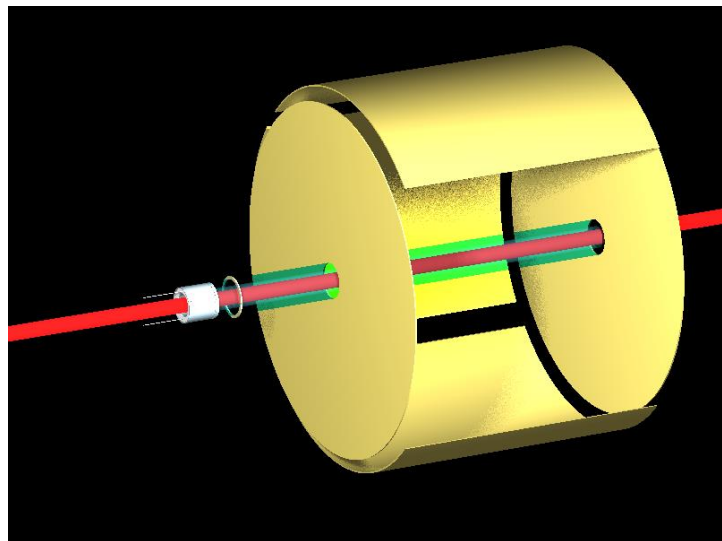
- Faible flux d'électrons
 - Augmenter le flux nécessite d'augmenter
 - T du filament
 - Potentiel du filament
- Section du filament et recouvrement des trajectoires ions / électrons
- Occupation de l'axe de l'instrument (IRMPD)

Cathode et cathode creuse



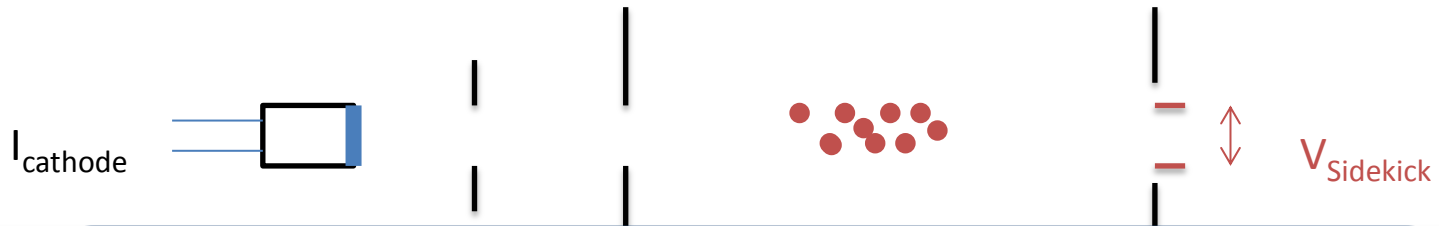
Cathode chauffée indirectement a remplacé le filament :

- Courant d'électron plus important
- Section du nuage d'électrons plus importante.

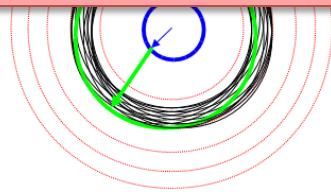


- Ajout d'une lentille d'extraction des électrons indépendante de la plaque du piège : flux d'électron contrôlé indépendamment de l'énergie cinétique des électrons
- Cathode creuse permet une combinaison ECD / IRMPD (ou autre source de photons)

Paramètres en ECD : la trajectoire des ions



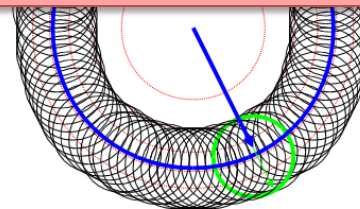
Le mouvement magnétron est périodique de l'ordre du kHz:
sur des irradiation de quelques millisecondes, il peut y avoir un effet
temporel!
(Observé par Y. Tsybin)



Cathode pleine :

Idéal: $r_c + r_M < r_{\text{cathode}}$

Limite : $|r_M - r_c| = r_{\text{cathode}}$



Cathode creuse :

Plus compliqué !

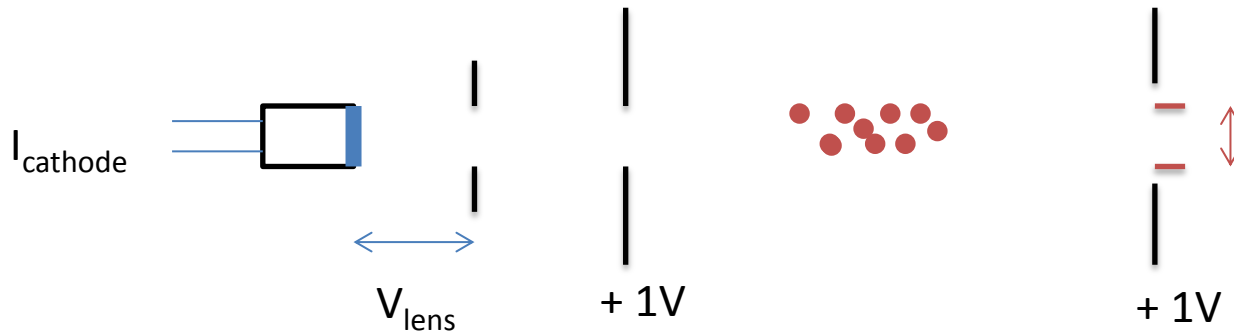
On aimerait avoir

$|r_M - r_c| > r_{\text{intérieur}}$

Et

$r_c + r_M < r_{\text{extérieur}}$

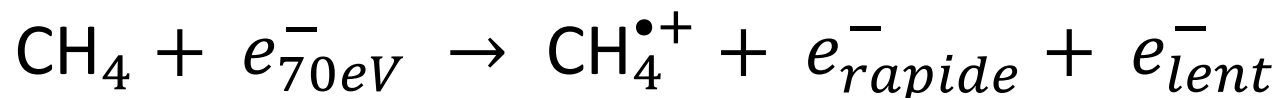
Paramètres en ECD : énergie, flux et durée d'irradiation



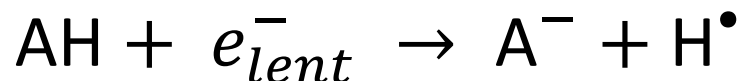
- Contrôle l'énergie des électrons.
 - Efficacité de capture décroît rapidement avec l'énergie des électrons.
- Contrôle du flux d'électron :
 - Température de la cathode
 - Fixée par le courant de chauffage
 - Limites données par le constructeur pour la durée de vie de la cathode.
 - Potentiel d'extraction (V_{lens}) : on n'y pense pas toujours, peut s'optimiser. Mais comme c'est une lentille, il y a aussi un effet sur les trajectoires.
 - Etat de surface de la cathode (on ne le contrôle pas, mais peut varier avec le temps, ou avec ce qui est introduit dans l'instrument).
- Durée de l'irradiation :
 - A priori, on attendrait des résultats similaires à flux x durée constant.
Mais : flux dépend de la durée (surface moyennement conductrice)
Temps longs : risques d'avoir des multiples captures d'électrons. En théorie: $\text{Effcapture} \sim 1/n$ charges.

Instrumentation pour l'ETD : source d'anions

- Source d'ionisation chimique négative « classique »

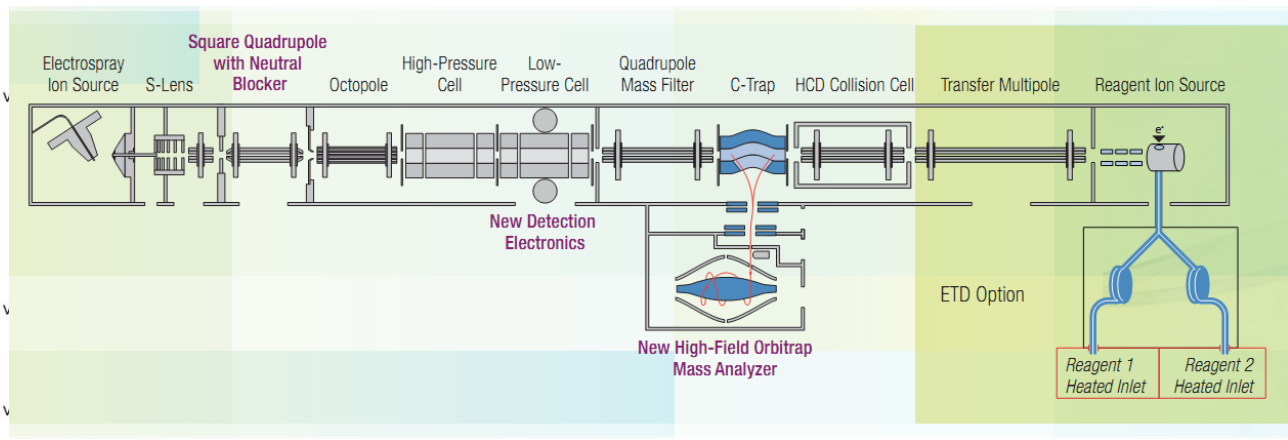
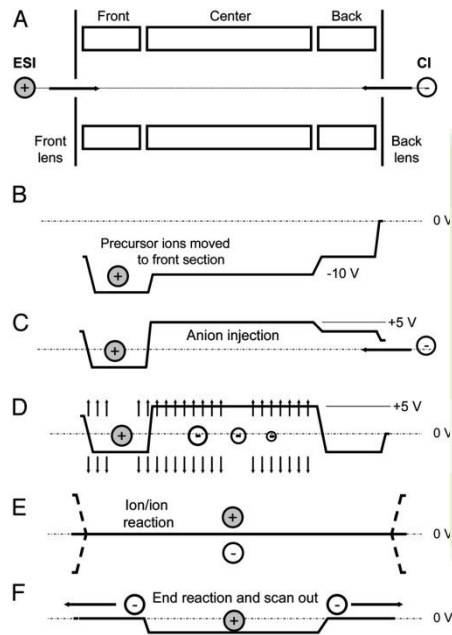


ou



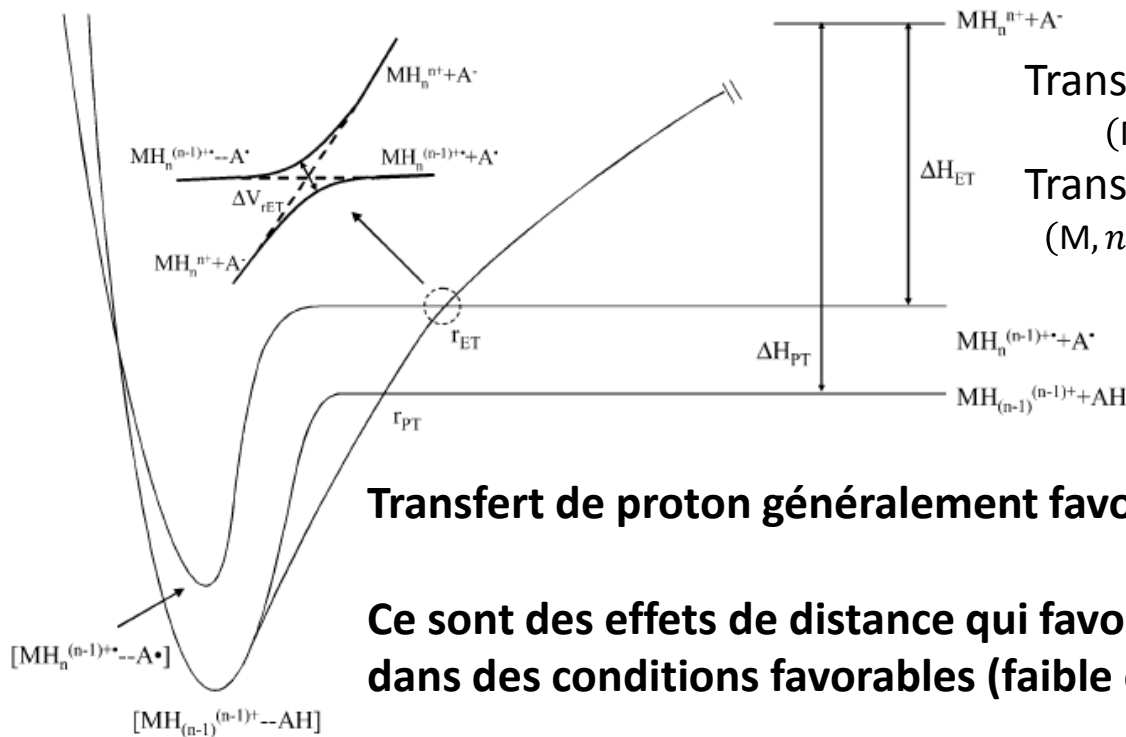
- Source APCI négative, suivant le même principe (avec N_2 comme gaz modérateur).

Instrumentation pour l'ETD : pièges quadropolaires pour cations et anions

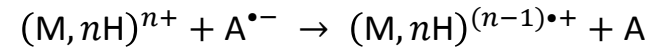


Syka et al, PNAS, 2004

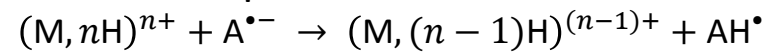
Réactions en compétition : Transfert de proton ou transfert d'électron ?



Transfert d'électron :



Transfert de proton :



Transfert de proton généralement favorable énergétiquement.

Ce sont des effets de distance qui favorisent le transfert d'électron dans des conditions favorables (faible changement de géométrie).*

D'autres réactions compétitives existent (transfert de H[•], ...)

Gunavardena, *J. Am. Chem. Soc.*, 12627 (2005)

Réactifs pour le transfert d'électron

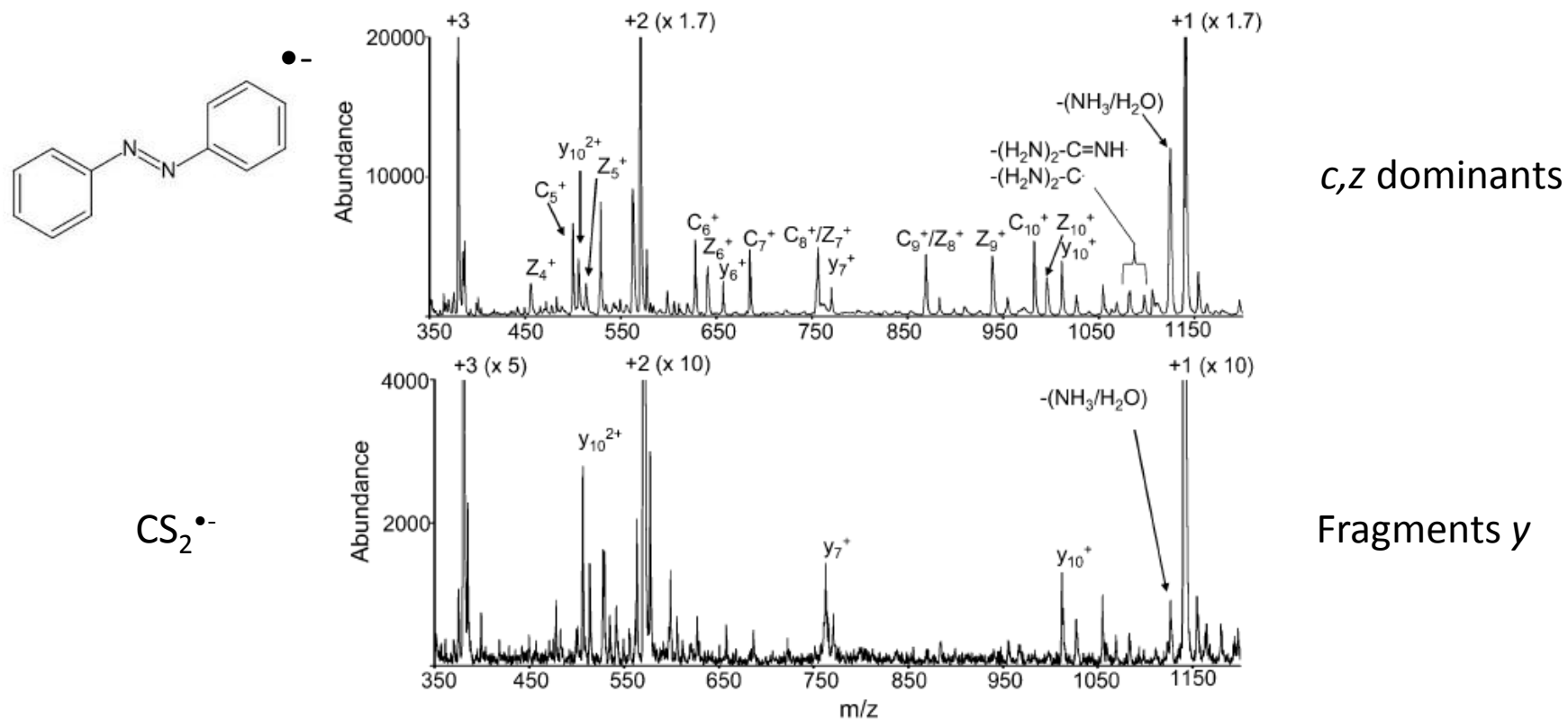
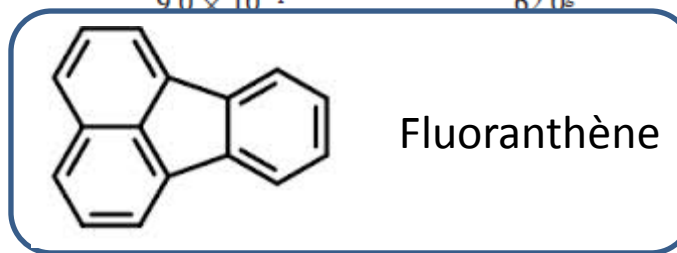


Figure 4. Post ion/ion reaction spectra of KGAILKGAILR $[M + 3H]^{3+}$ and (a) the azobenzene molecular anion and (b) $CS_2^{\bullet-}$.

Gunavardena, *J. Am. Chem. Soc.*, 12627 (2005)

Résultats sur 28 réactifs testés

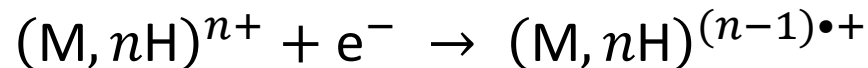
reagent	Franck–Condon factor $\langle 0 0\rangle^2$	Franck–Condon factor $\sum \langle 0 \leq 10\rangle^2$ ^b	EA (A) (kcal/mol)	% ETD ^{c,d}	R ^e
norbornodiene ^f	6.5×10^{-3}	1.1×10^{-2}	5.6 ^g	7.2	0.10
cis-stilbene ^f	5.8×10^{-5}	5.2×10^{-3}	10.4 ^h	9.8	0.60
O ₂	4.9×10^{-2}	9.7×10^{-1}	10.4 ^g	4.9	0.81
CS ₂	2.9×10^{-8}	4.9×10^{-5}	11.8 ^j	<0.01	
azobenzene	1.6×10^{-1}	1.8×10^{-1}	13.1 ^g	48.8	0.86
fluoranthene	3.6×10^{-1}	3.6×10^{-1}	14.5 ^j	37.4	0.96
perylene	4.1×10^{-1}	4.1×10^{-1}	22.4 ^g	20.9	0.88
nitrobenzene ^k	1.3×10^{-1}	1.4×10^{-1}	23.0 ^j	14.7	0.83
SF ₆	6.7×10^{-11}	6.7×10^{-11}	24.2 ^j	<0.01	
SO ₂	7.0×10^{-2}	4.6×10^{-1}	25.5 ^g	30.1	0.86
<i>m</i> -dinitrobenzene	2.6×10^{-2}	2.7×10^{-1}	38.3 ^j	26.6	0.87
<i>o</i> -dinitrobenzene	8.9×10^{-6}	1.2×10^{-4}	38.3 ^j	17.2	0.83
S ₂ O ^l	5.6×10^{-2}	3.5×10^{-1}	43.3 ^g	7.3	0.82
SO ₃	2.0×10^{-10}	6.9×10^{-8}	43.8 ^j	<0.01	
<i>p</i> -dinitrobenzene	1.6×10^{-1}	1.8×10^{-1}	46.1 ^j	16.4	0.88
S ₃	8.2×10^{-2}	5.2×10^{-1}	48.3 ^g	7.0	0.71
O ₃	4.8×10^{-2}	3.8×10^{-1}	48.5 ^g	4.8	0.95
NO ₂ [*]	3.6×10^{-4}	2.3×10^{-1}	52.4 ^g	8.5	0.16
1,3,5-trinitrobenzene	6.1×10^{-1}	6.5×10^{-1}	60.6 ^j	7.9	0.47
CO ₃	6.3×10^{-1}	9.0×10^{-1}	62.0 ^g	<0.01	
I [*]	N/A			<0.01	
CH ₃ COO [*]	3.6×10^{-3}			<0.01	
NO ₃ [*]	4.3×10^{-3}			<0.01	
[PDCH-F] [*]	7.5×10^{-4}			<0.01	
H ₂ PO ₄	3.1×10^{-10}			<0.01	
SF ₅ [*]	8.0×10^{-8}			<0.01	
HSO ₄	4.3×10^{-3}			<0.01	
picric acid	4.1×10^{-8}			<0.01	



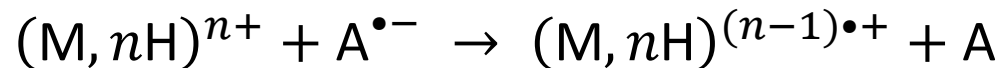
Gunavardena, *J. Am. Chem. Soc.*, 12627 (2005)

Autres paramètres comptant en ETD

- Temps de réaction
- Activation supplémentaire (Supplemental Activation)
 - L'énergie déposée est plus faible qu'en ECD de l'affinité électronique de A



$$\Delta_r H = EA([M, nH]^{n+})$$



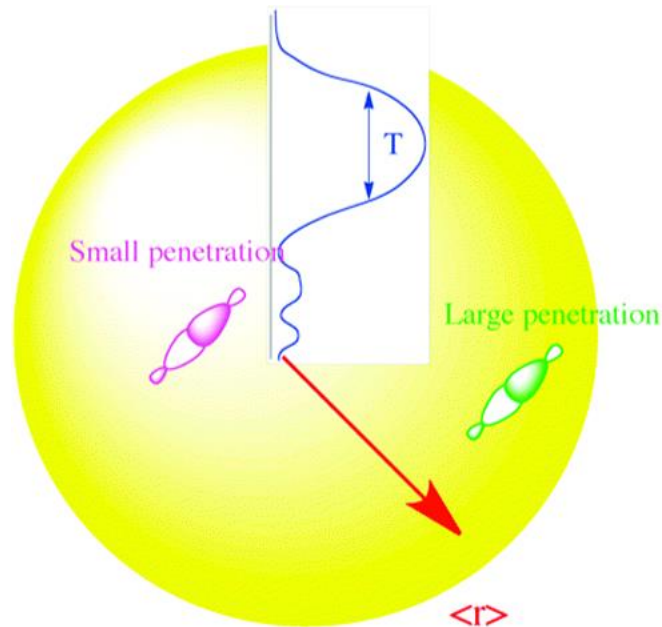
$$\Delta_r H = EA([M, nH]^{n+}) - EA(A)$$

- Environ 60 kJ/mol (0,6 eV) de moins.
- Il peut être nécessaire d'aider à la dissociation d'un complexe (c, z•) en le dissociant via des collisions

FRAGMENTATION DE PEPTIDES ET DE PROTÉINES PAR ECD ET ETD

Au niveau moléculaire

- Arrivée initiale de l'électron
 - Généralement proposé dans des orbitales de Rydberg.
 - Formalisation par J. Simons.



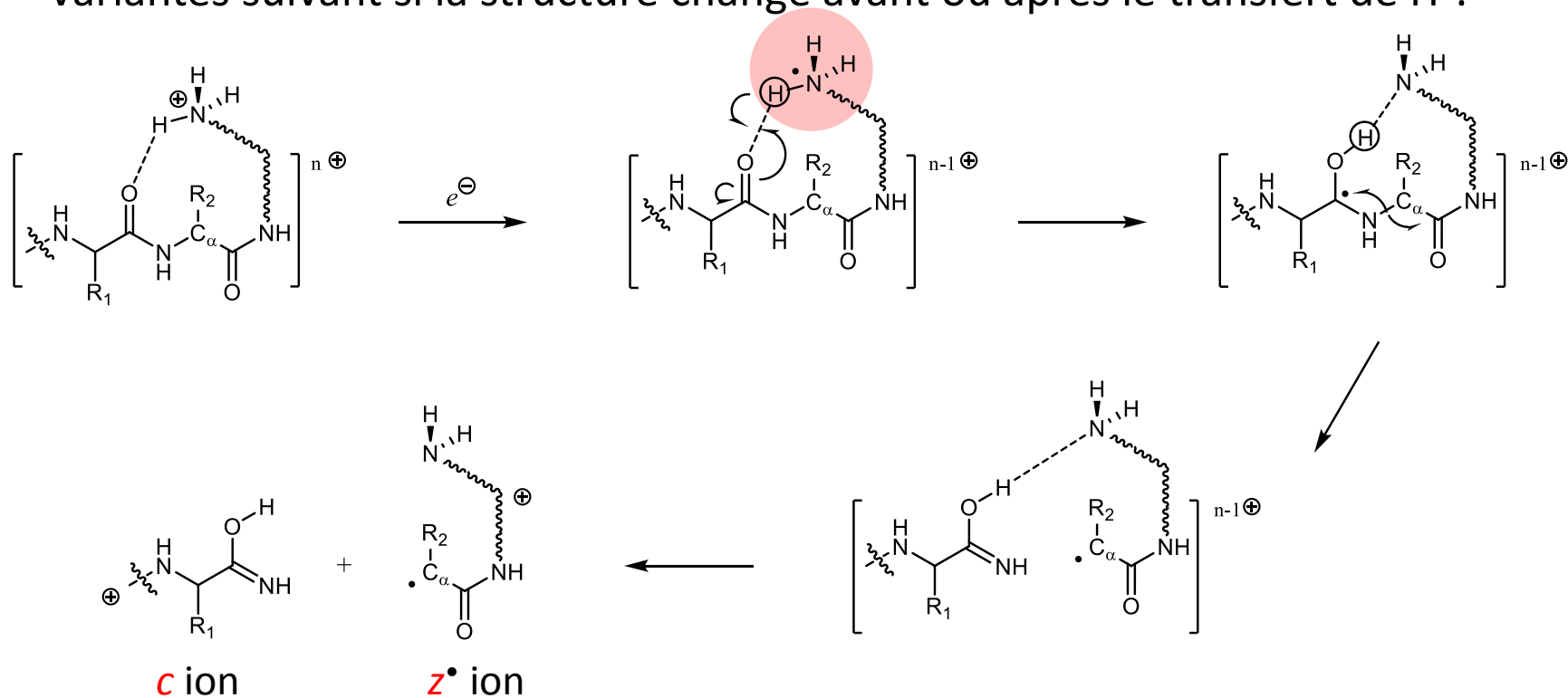
Le recouvrement entre l'orbitale de Rydberg et les orbitales vers lesquelles seront dirigés les électrons permet un transfert vers différentes régions d'un même polypeptides lorsque le nombre quantique de la Rydberg est suffisamment élevé.

J. Am. Chem. Soc. **132** 7074 (2010)

Fragmentation localisée sur site positif (Cornell-like)

Capture de l'électron au niveau d'un ammonium suivi d'un transfert d'atome d'hydrogène sur un carbonyle.

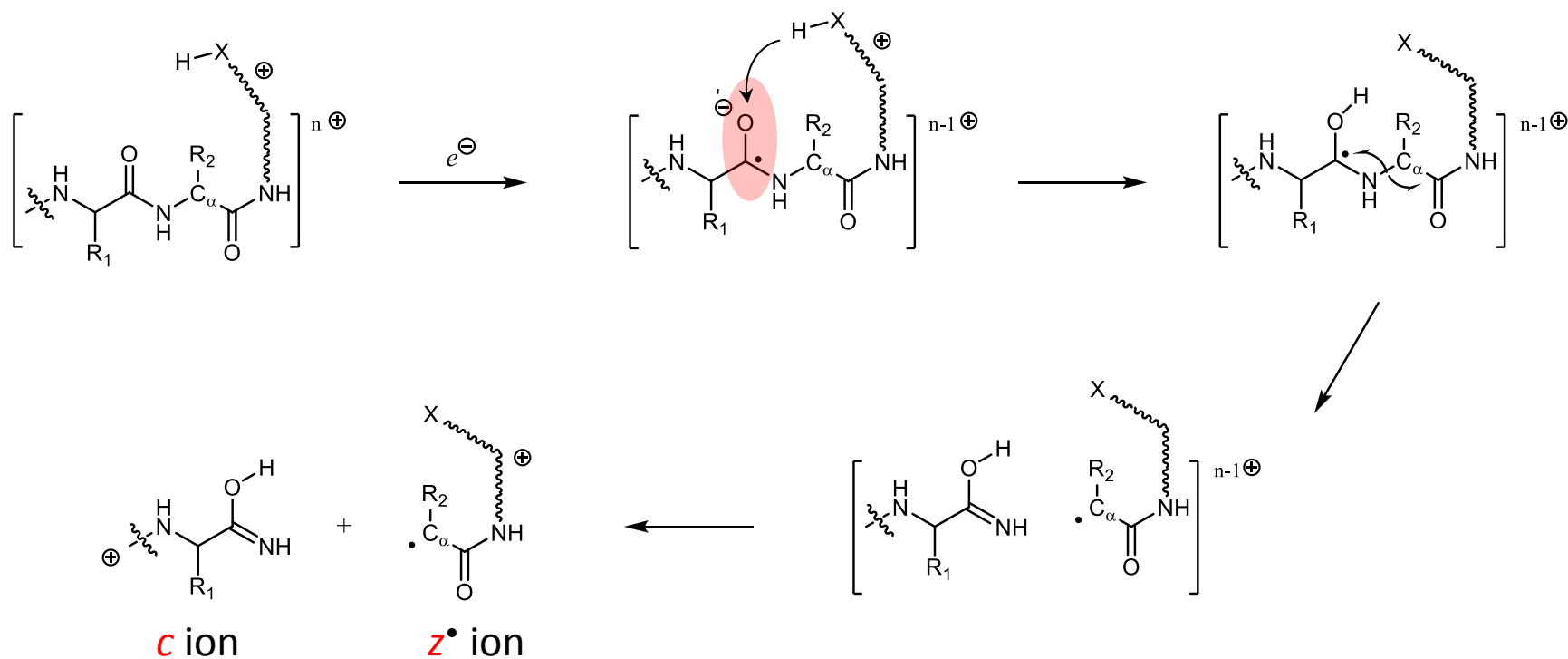
Variantes suivant si la structure change avant ou après le transfert de H•.



Fragmentation dirigée par un carbonyle

1. Washington

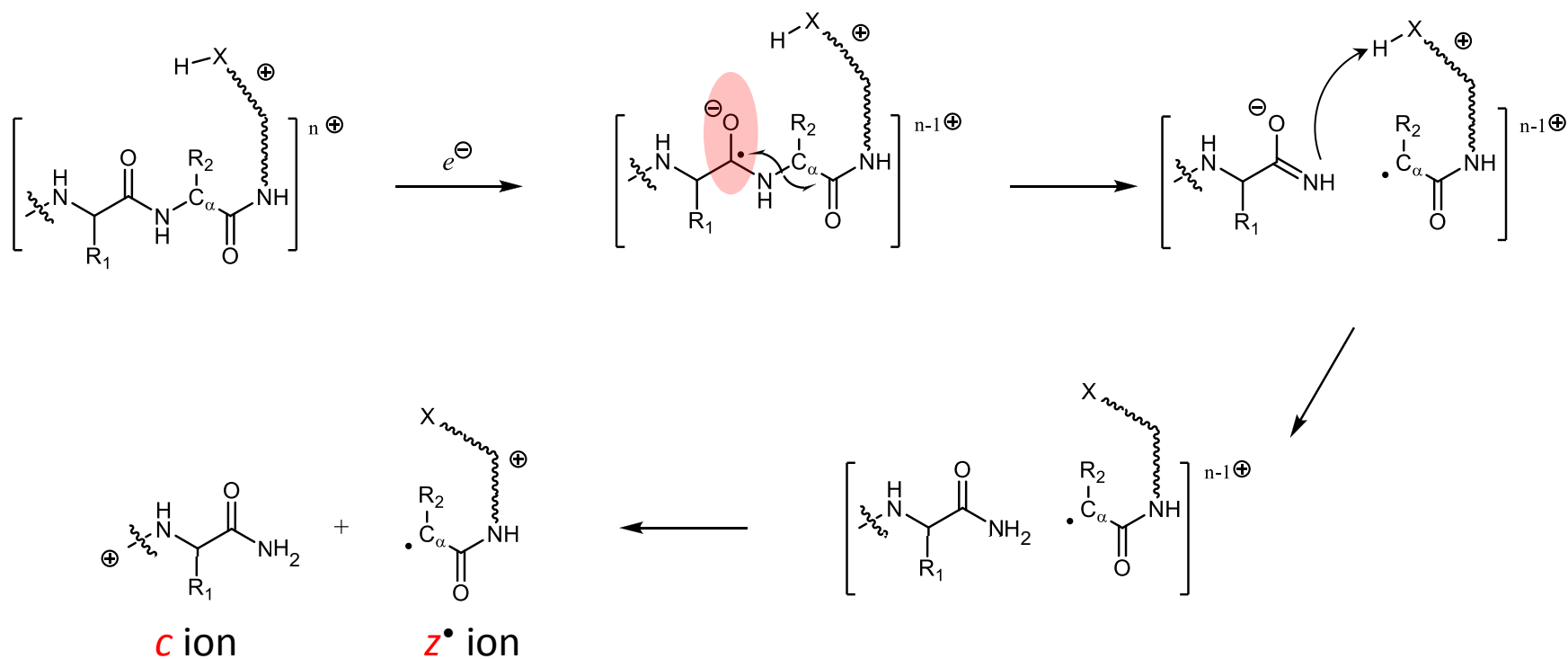
Capture de l'électron dans une orbitale π^* d'un carbonyle suivie 1. d'un transfert de proton, 2. d'une coupure N-C $_{\alpha}$



Fragmentation dirigée par un carbonyle

2. Utah

Capture de l'électron dans une orbitale π^* d'un carbonyle suivie 1. d'une coupure N-C $_{\alpha}$, 2. d'un transfert de proton



Après la coupure du squelette covalent

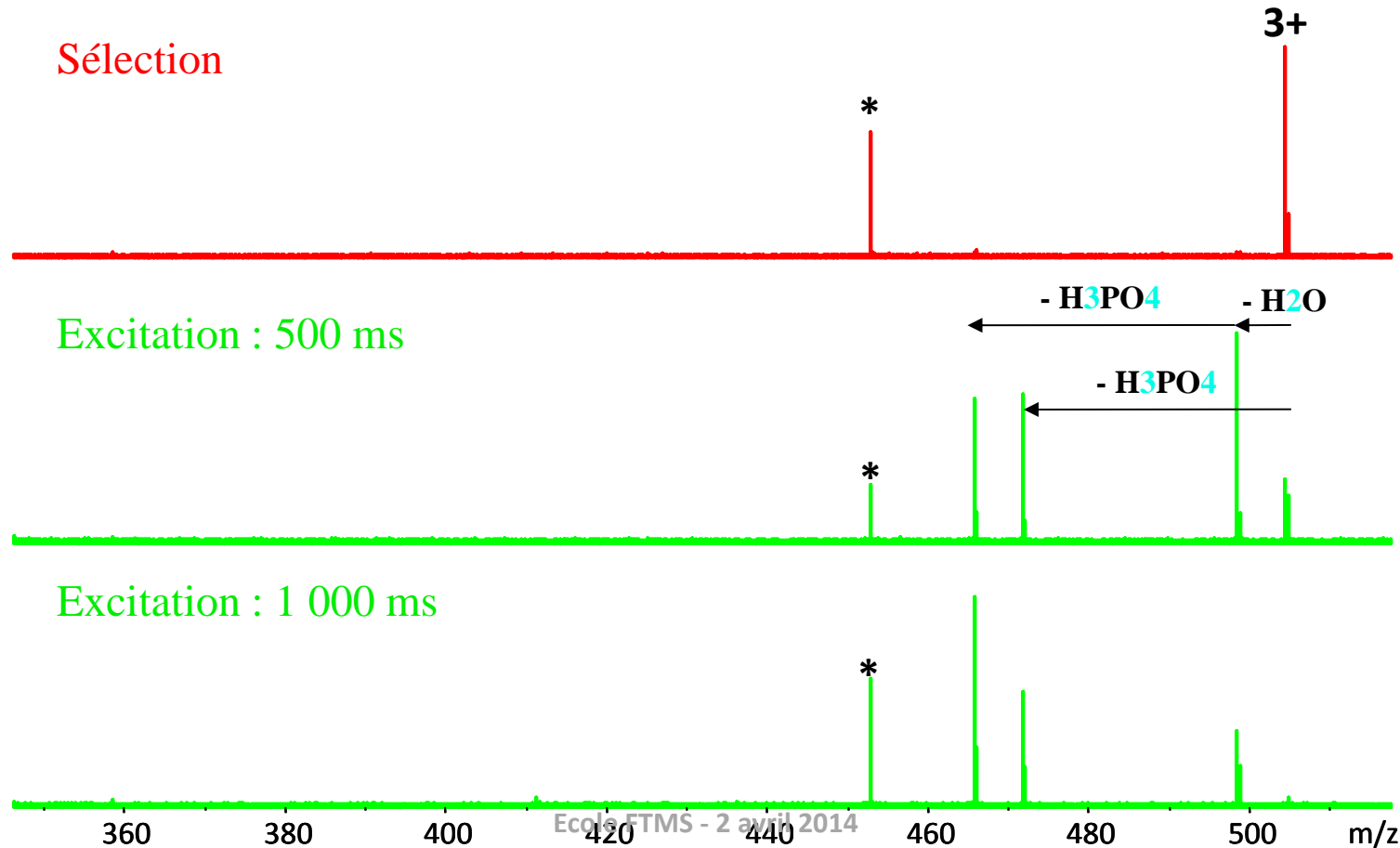
- Transferts de H^\bullet
 - dans le fragment z^\bullet
 - Fragmentation secondaire (perte de chaînes latérales, de groupements amines, ...)
 - entre fragments c et z^\bullet
 - Formation d'ions $[c+H]^\bullet$ ou $[z-H]$ dépendante de la durée de vie du complexe $[c, z^\bullet]$ intermédiaire.
- Séparation des entités c et z
 - parfois formation d'une espèce stable $[M, nH]^{(n-1)\bullet+}$

Peptide phosphorylé : CAD

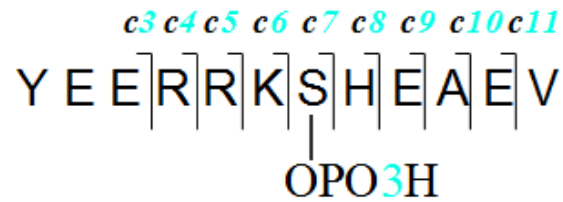


{ Mr = 1611.6
Nano-ESI, 7 μM, 4 μl, SORI-CID sur Xe

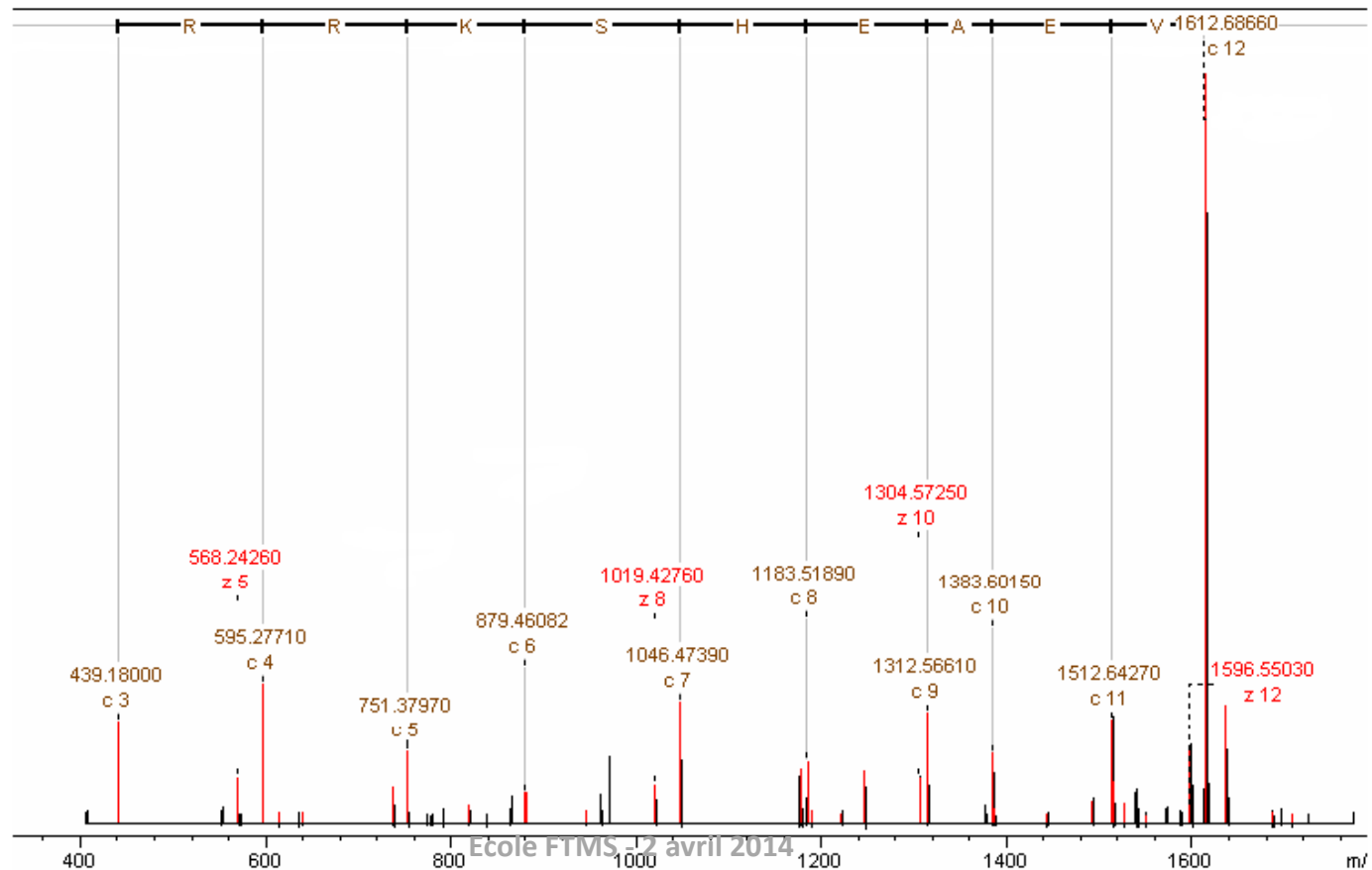
Sélection



Peptide phosphorylé ECD



Mr = 1611.6
Nano-ESI, 7 μ M, 4 μ l, ECD 80ms, 2.5V



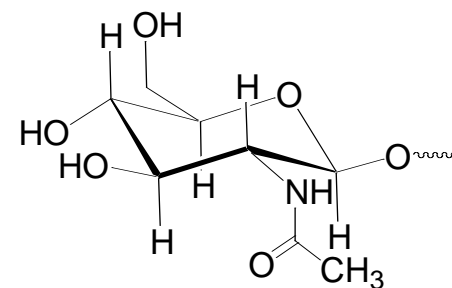
Peptide glycosylé : CAD

KGGGTTSTTSAPG
|
GalNac

{ Mr = 1323.615
{ Nano-ESI, 10 μ M, 4 μ l, SORI-CID sur Xe

Sélection

2+



Excitation : 500 ms

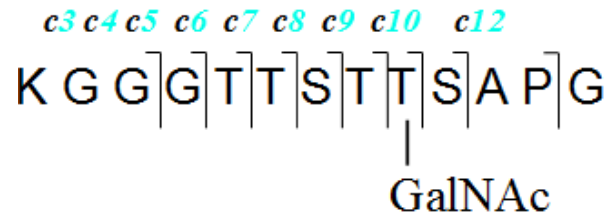
b11

- GalNac

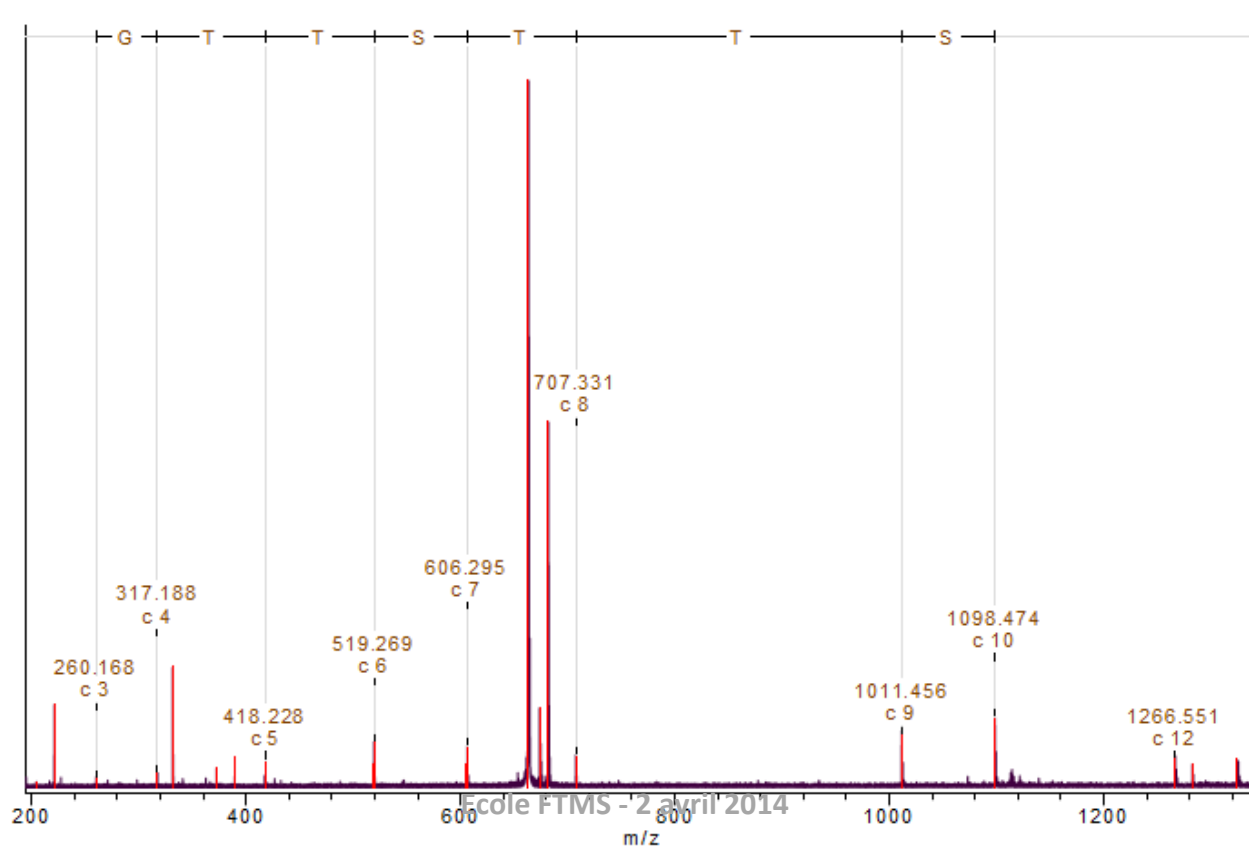
2+

- GalNac

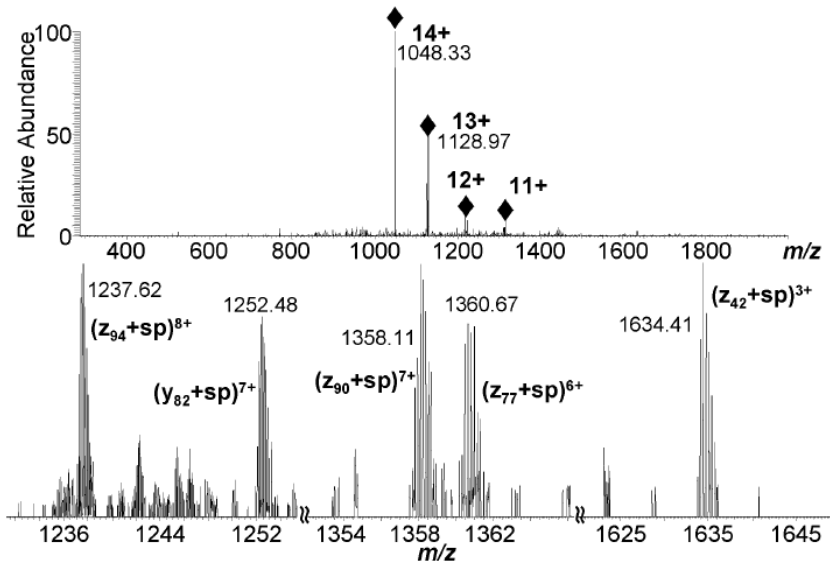
Peptide phosphorylé: ECD



{ Mr = 1323.615
 Nano-ESI, 7 μM, 4μl, ECD 150ms, 11V



Application à des complexes non-covalents



➤ Conservation des liaisons hydrogène entre la protéine et son ligand.

Figure 1. ECD mass spectrum of the 14+ 1:1 α -synuclein–spermine complex (m/z 1048; top), with expanded regions shown (bottom).

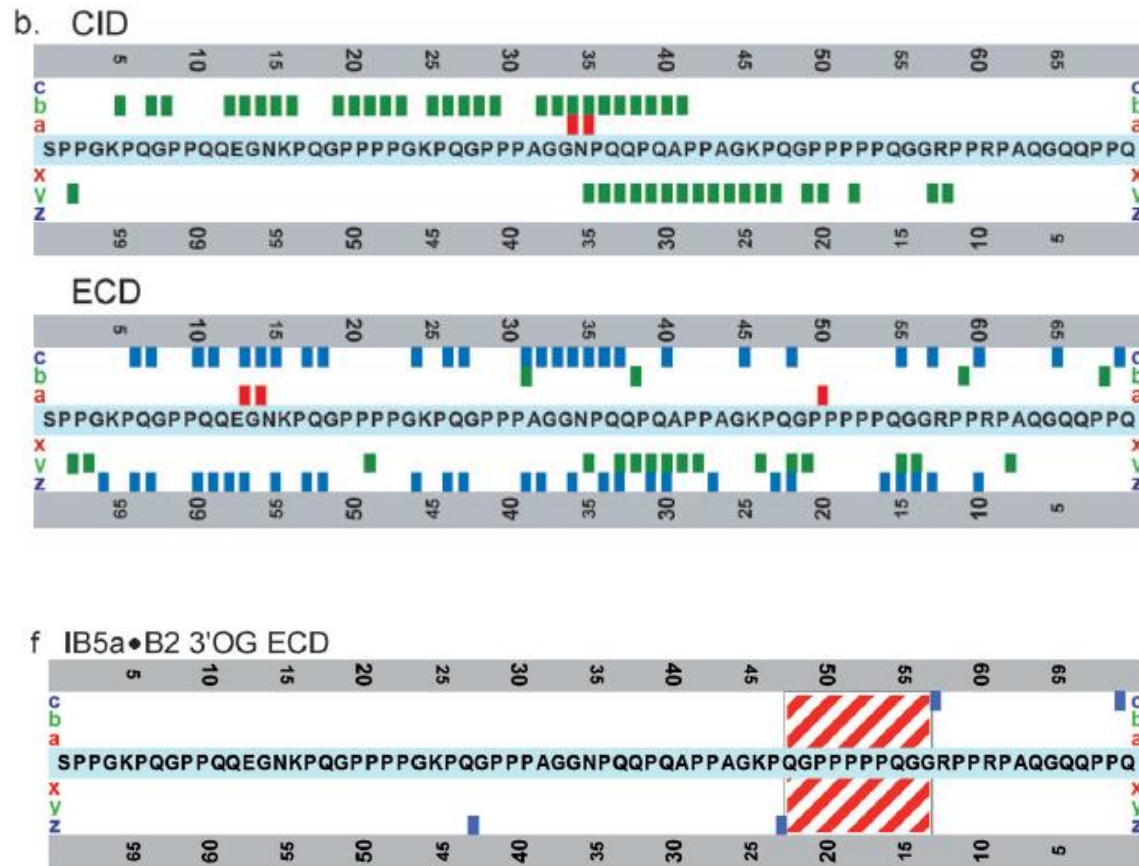


Figure 2. ECD generated products from the 14+-charged 1:1 α -synuclein–spermine complex. Product ions that retain spermine binding are indicated by the extra line underneath the fragments (e.g., L).

Y. Xie, *J. Am. Chem. Soc.* 14432 (2006)

Localisation du site de liaison de tanins : liaison IB-5 avec 3'-OG

Sans 3'-OG

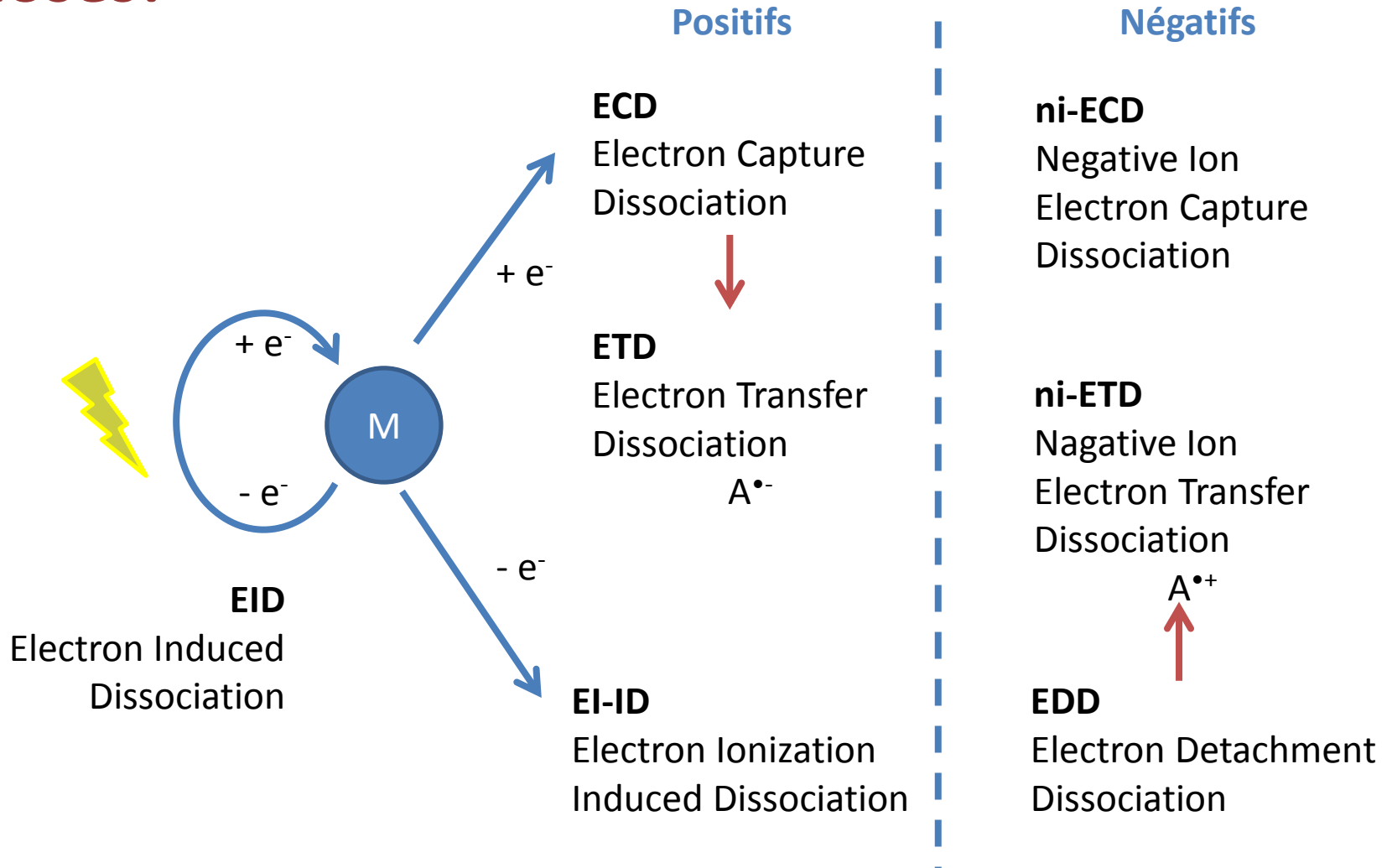


Avec 3'-OG

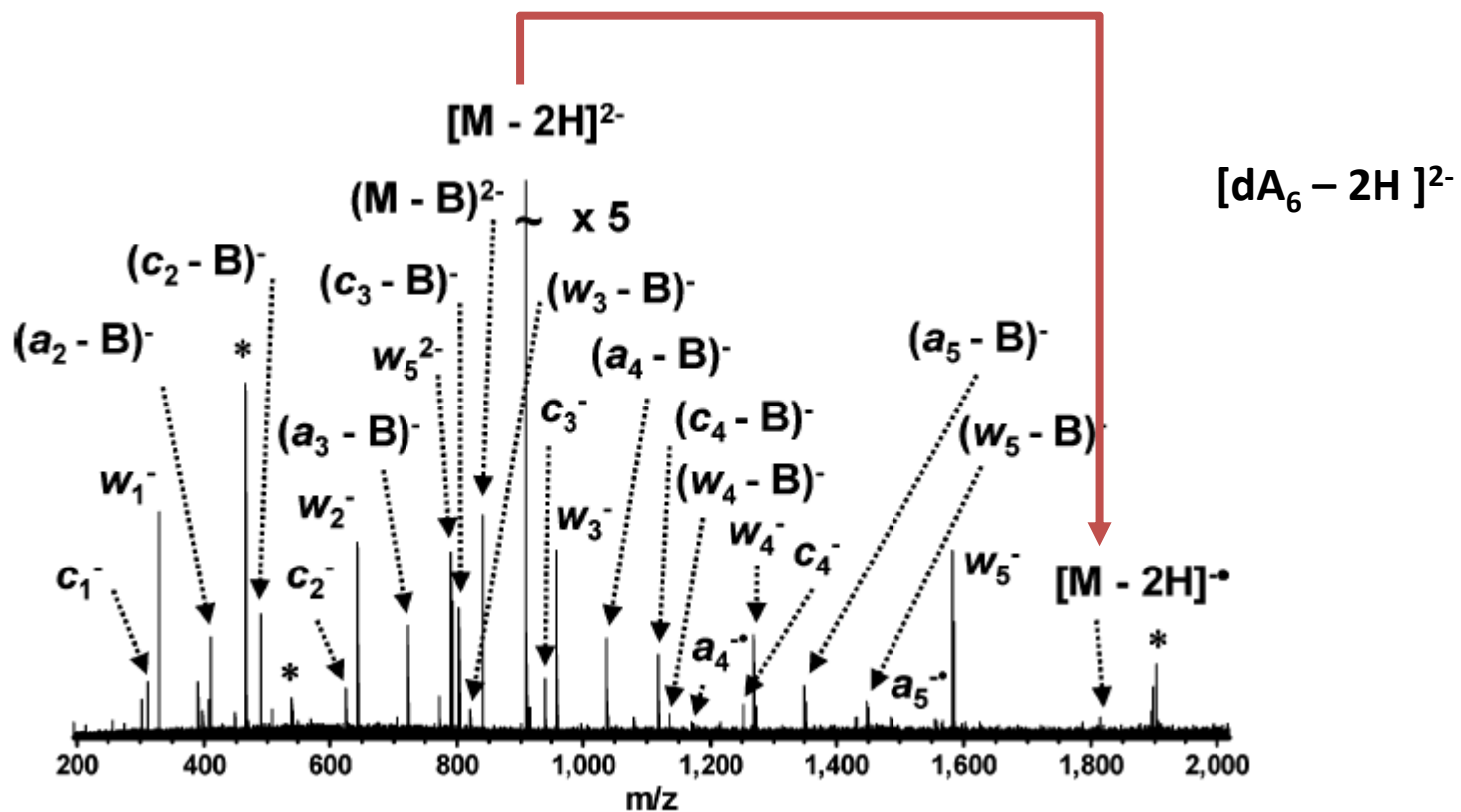
Canon, *Angew. Chem. Int. Ed.* 8377 (2013)

AUTRES MODES D'ACTIVATION PAR DES ÉLECTRONS

Le faisceau d'électron peut faire d'autres choses!



EDD sur des oligonucléotides

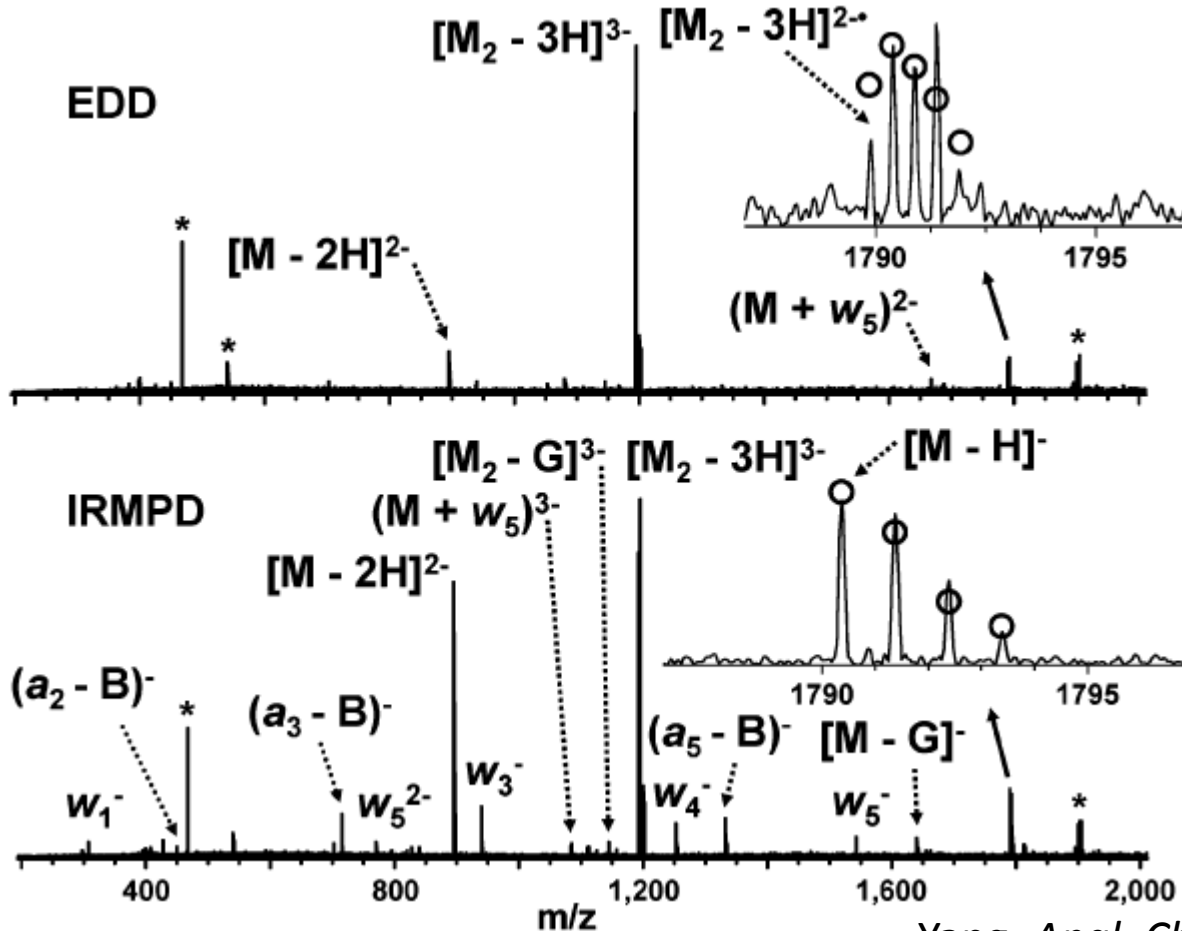


1s irradiation, 17 eV

Yang, *Anal. Chem.* 1876 (2005)

Comparaison EDD / IRMPD sur des oligonucléotides

Duplex :
M = d(GCATGC)

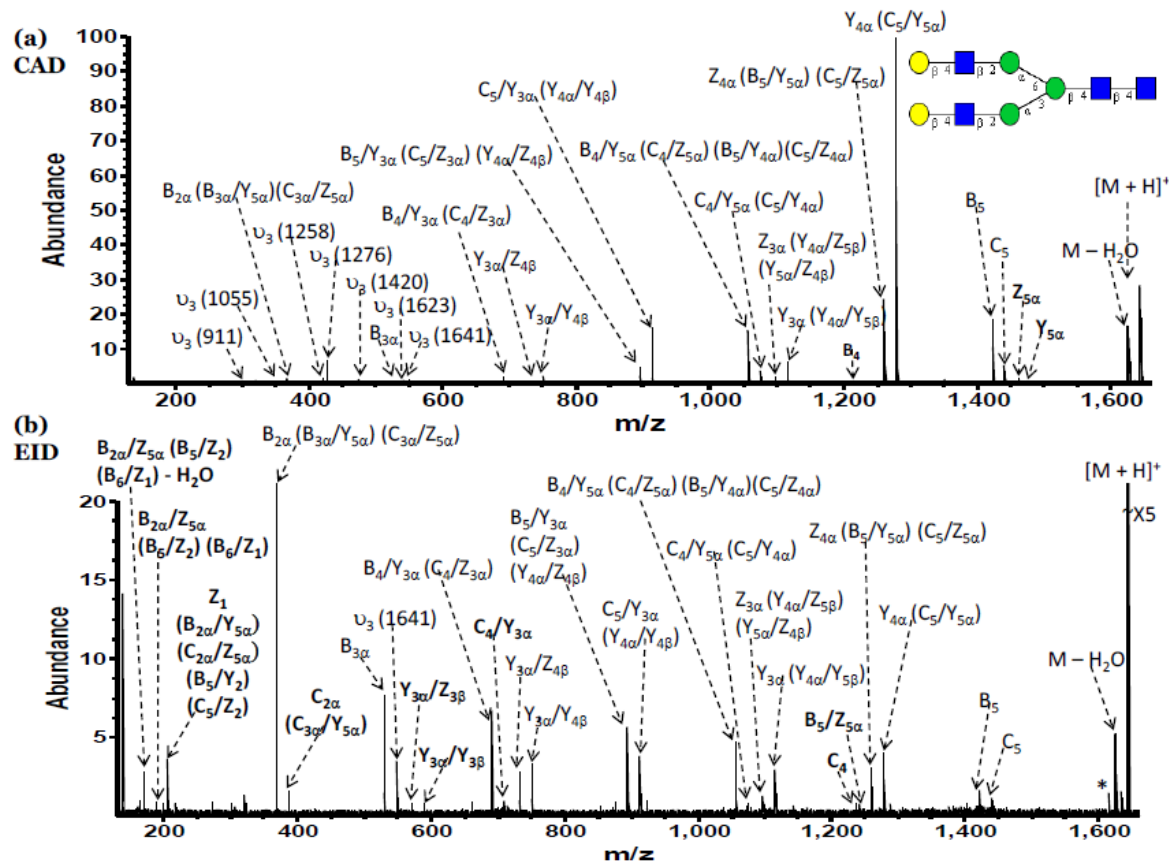


EDD : 16 eV, 1s

IRMPD : 10 W, 150 ms

Yang, *Anal. Chem.* 1876 (2005)

Dissociation induite par des électrons (EID)



Bias : -11 à -20 V
 Temps: 0,3 – 0,5 s

Figure 4.9 CAD and EID of an asialo, galactosylated, biantennary glycan (NA2): (a) CAD, (b) EID. For both spectra, precursor ions are labeled [M + H]⁺. *: noise; v₃: third harmonic peaks. Bold font indicates fragments that are unique to CAD or EID.

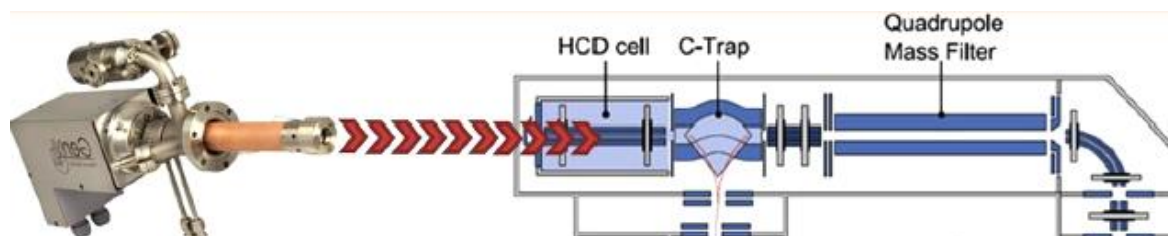
Mécanismes mis en jeu ?

- EDD : Processus radicalaires, avec formation d'une espèce radicalaire « déficiente en H• »
 - Potentiellement plusieurs sites de détachement possibles, et localisation de la fragmentation dirigée par les sites chargés.
 - Effet du dépôt d'énergie s'ajoute, conduisant à des fragmentation de type CAD en parallèle.
- EID: Deux voies possibles, ionisation/capture ou excitation électronique.

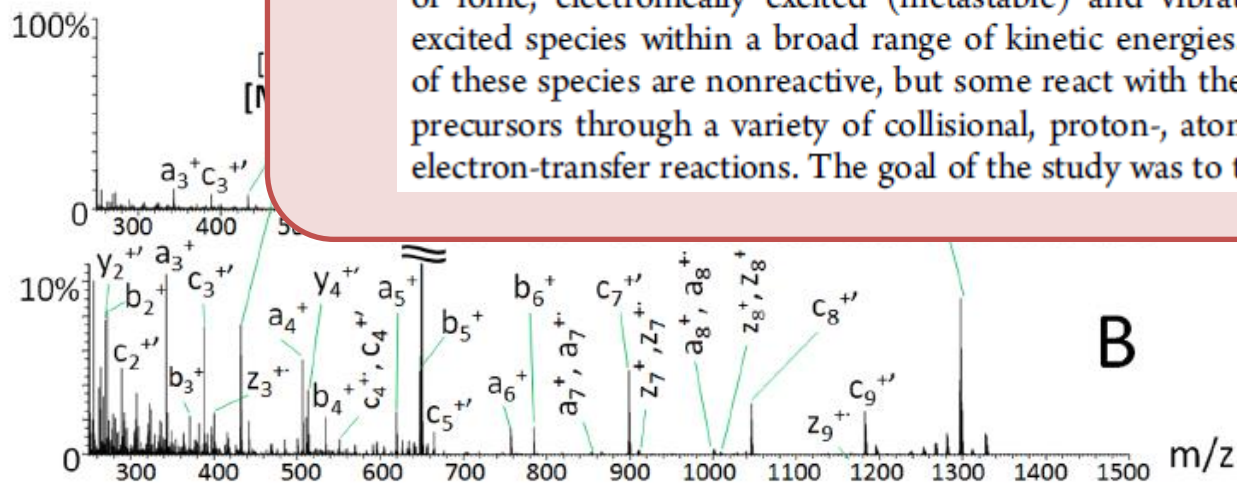
Et l'avenir? Encore une technique?

Fragmentation of Positively-Charged Biological Ions Activated with a Beam of High-Energy Cations

Konstantin Chingin,[†] Alexander Makarov,[‡] Eduard Denisov,[‡] Oleksii Rebrov,[†] and Roman A. Zubarev^{*,†,§}



cations generated with a microwave plasma source. The accelerated ion beam (up to 1–2 keV) contains a large variety of ionic, electronically excited (metastable) and vibrationally excited species within a broad range of kinetic energies. Many of these species are nonreactive, but some react with the target precursors through a variety of collisional, proton-, atom-, and electron-transfer reactions. The goal of the study was to test the



Chingin, *Anal. Chem.* 372 (2014)