

LA METHODE DIAMS : Desorption/Ionization on self-Assembled Monolayer Surface Une nouvelle technique de désorption ionisation laser sans matrice pour la Spectrométrie de Masse

Matthieu Bounichou

▶ **To cite this version:**

Matthieu Bounichou. LA METHODE DIAMS : Desorption/Ionization on self-Assembled Monolayer Surface Une nouvelle technique de désorption ionisation laser sans matrice pour la Spectrométrie de Masse. Chimie. Université d'Angers, 2010. Français. NNT : . tel-00579883

HAL Id: tel-00579883

https://theses.hal.science/tel-00579883

Submitted on 25 Mar 2011

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

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

UNIVERSITE D'ANGERS

Année 2009-2010

N° d'ordre : 992

LA METHODE DIAMS :
Desorption/Ionization on self-Assembled Monolayer Surface

Une nouvelle technique de désorption ionisation laser sans matrice pour la Spectrométrie de Masse

Thèse de Doctorat

Spécialité : Chimie analytique

Ecole Doctorale : 3MPL

Présentée et soutenue publiquement

le : 21 mai 2010

à : Angers

par : Matthieu Bounichou

Rapporteurs :

Alain Brunelle	Directeur de Recherches à l'ICSN
Olivier Laprévote	Professeur à l'université Paris Descartes

Examinateurs :

Pascal Richomme	Professeur à l'université d'Angers
Jean-Claude Tabet	Professeur à l'université Pierre et Marie Curie

Directeurs de thèse :

David Rondeau	Professeur à l'université de Brest
Eric Levillain	Directeur de Recherches au laboratoire CIMA

Laboratoire CIMA, UFR Science,
2, Bd Lavoisier 49045
Angers Cedex 01

ED 500

Remerciements

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au sein du laboratoire de Chimie, Ingénierie Moléculaire d'Angers, unité mixte de recherche 6200-CNRS, et de la Plateforme d'Ingénierie et Analyses Moléculaires.

Je souhaite remercier Messieurs Patric Batail, directeur du CIMA, et Pascal Richomme, directeur de la PIAM, pour m'avoir accueilli dans leurs structures respectives et m'avoir ainsi permis de jouir de tous les avantages qu'elles pouvaient m'apporter.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Messieurs Alain Brunelle et Olivier Laprévote pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce mémoire. Je remercie de même une nouvelle fois Monsieur Pascal Richomme pour sa participation en tant que membre du jury ainsi que Monsieur Jean-Claude Tabet sans qui je ne présenterais pas ce travail aujourd'hui.

A mes directeurs de thèse, David Rondeau et Eric Levillain, merci pour avoir été mes guides durant ces années de thèse, pour votre patience et pour votre présence dans mon jury de thèse. Un grand merci à David pour ses myriades d'idées face aux difficultés et surtout pour ses apports irremplaçables sur les sujets les plus théoriques. Un grand merci à Eric pour sa dynamique, ses conseils et pour avoir toujours été disponible et à l'écoute.

Je remercie vivement toutes les personnes avec qui nous avons eu l'occasion de collaborer, Christine Enjalbal, Emmanuelle Leize, Manuel Chapelle, Yann Hebert et Nicolas Galand ainsi que Stéphanie Habert qui a travaillé lors de son stage sur les mesures d'énergie interne à partir des peptides.

Je remercie tous les autres membres du groupe PCDA, pour leur convivialité et leur altruisme, je pense notamment à Lionel Sanguinet qui m'a mis sur les rails et épaulé dès mon arrivée et à Olivier Alévêque pour avoir été mon fournisseur de plaques d'or et s'être toujours débrouillé pour répondre à mes demandes.

Mes remerciements vont enfin à tous mes collègues, plus particulièrement à Sylvie, Marie, Christelle, Laurent, Kamal et Gislain pour leur amitié.

Je me dois bien sûr de remercier l'ANR et la région Pays de la Loire qui ont financé ma bourse et ces travaux.

Sommaire :

INTRODUCTION :

Introduction 1

CHAPITRE I :

LE RAYONNEMENT LASER ET SON IMPLICATION EN SPECTROMETRIE DE MASSE

1 Le rayonnement laser 7

1.1 Absorption et émission de photons 7

1.2 Principe de fonctionnement d'un laser 9

1.3 Caractéristiques principales d'un faisceau laser 13

2 L'interaction du rayonnement Laser avec une surface et son application en spectrométrie de masse par désorption ionisation laser 14

2.1 La désorption ionisation laser à partir d'une surface métallique ou d'un matériau 15

2.2 La désorption ionisation laser à partir d'une surface moléculaire 20

2.3 La désorption ionisation laser à partir d'une interface molécule cristallisée/vide 25

2.4 Les méthodes de désorption ionisation laser sans matrice post-MALDI 41

3 L'analyseur à temps de vol pour la détection d'ions gazeux produits par les processus LDI 46

3.1 Les bases de l'analyseur à temps de vol 47

3.2 Distributions temporelle, spatiale et cinétique. 50

3.3 Le Biflex III 55

4 Bibliographie 59

CHAPITRE II :

PRINCIPE, ELABORATION ET FAISABILITE DE LA METHODE DIAMS

1 LES MONOCOUCHES ORGANIQUES AUTO-ASSEMBLEES 65

1.1 Définition et caractéristiques d'une SAM 65

1.2 Les monocouches auto-assemblées en spectrométrie de masse 67

2 LES PRECURSEURS DE MATERIAUX MOLECULAIRES POUR LE PROCESSUS LDI SANS MATRICE 67

2.1 Propriétés requises 68

2.2 Molécule précurseur utilisée en DIAMS-MS : 68

2.3 Synthèse dirigée 70

2.4 Caractérisation des molécules cibles en solution 73

Sommaire :

3 ELABORATION ET CONTROLE DES SURFACES MODIFIEES POUR LE DIAMS 74

3.1 Différents substrats et méthodes de préparation des SAMs ... 74

3.2 Modification de surface ... 78

3.3 Contrôle de la modification de surface ... 80

4 ETUDES DE FAISABILITE DE LA METHODE DIAMS/TOF ... 86

4.1 Dépôt des échantillons sur les plaques DIAMS ... 86

4.2 Exemple de composés étudiés en DIAMS-MS ... 86

5 ETUDE STATISTIQUE POUR EVALUER LA REPETABILITE ET LA REPRODUCTIBILITE DE LA METHODE DIAMS/TOF ... 93

5.1 Méthode et expérience ... 94

5.2 La répétabilité ... 98

5.3 La reproductibilité ... 103

6 QUANTIFICATION EN DIAMS-MS : DOSAGE D'UN COMPOSE DE FAIBLE POIDS MOLECULAIRE. ... 107

6.1 Dosage dans l'eau. ... 107

6.2 Dosage dans un plasma bovin. ... 110

7 CONCLUSION ... 114

8 BIBLIOGRAPHIE ... 115

CHAPITRE III :

EVALUATIONS COMPARATIVES DES DISTRIBUTIONS D'ENERGIE INTERNE D'IONS GAZEUX PRODUITS PAR LA METHODE DIAMS

1 PRINCIPE DE LA METHODE DE RENDEMENT DE SURVIE D'IONS (SY) ... 121

1.1 Les hypothèses inhérentes à la méthode SY dans le cas des sels de benzylpyridinium ... 122

1.2 De la mesure des rendements de survie d'ions expérimentaux à l'évaluation de la distribution d'énergie interne ... 124

1.3 La méthode SY incluant le déplacement cinétique et le calcul de l'énergie seuil d'apparition de fragments ... 127

1.4 L'énergie thermique ... 130

1.5 Le logiciel MassKinetics et les rendements de survie d'ion théoriques ... 131

2 EVALUATION DE LA DISTRIBUTION D'ENERGIE INTERNE EN DIAMS ET LDI SUR OR DES IONS BENZYLPYRIDINIUM SUBSTITUES ... 134

2.1 Structures des sels de benzylpyridinium ... 134

2.2 Fréquences de vibration et énergie critique de réaction via les calculs de chimie quantique ... 135

2.3 Mesure de rendements de survie expérimentaux en DIAMS et LDI sur or ... 136

2.4 Evaluation de la distribution d'énergie interne pas MassKinetics ... 137

2.5 Interprétations ... 139

3 EVALUATION DE LA DISTRIBUTION D'ENERGIE INTERNE EN DIAMS ET LDI SUR OR DE PEPTIDES MODELES.....142

3.1 Nature et préparation des peptides thermomètres utilisés.....142

3.2 Réactivité des peptides protonés.....143

3.3 Réalisation des fichiers de fréquence des peptides protonés.....147

3.4 Evaluation des distributions d'énergie interne et interprétation.....150

4 BIBLIOGRAPHIE.....153

CHAPITRE IV :

EVALUATIONS COMPARATIVES DES VITESSES INITIALES D'IONS GAZEUX PRODUITS PAR LA METHODE DIAMS

1 PRINCIPES THEORIQUES DE LA MESURE DE VITESSES INITIALES D'IONS GAZEUX DANS UN ANALYSEUR A TEMPS DE VOL.....156

2 DETERMINATIONS DES VITESSES INITIALES D'IONS PRODUITS EN LDI SUR OR ET EN DIAMS.....158

2.1 Expérience et méthode.....158

2.2 Résultats et discution.....159

3 BIBLIOGRAPHIE.....161

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives.....162

ANNEXES :

Annexe I: Calculs pour la détermination de l'énergie cinétique initiale des ions.....165

Annexe II: Spectres de masse du peptides LEIFSEFR.....172

RESUMES :

Résumé / Abstract.....175

Introduction

Dans un article de la revue The journal of the American Society for Mass Spectrometry parue en 1991, Alfred Nier rappelait le contexte lié à l'apparition de la spectrométrie de masse en écrivant : "Before 1940 mass spectroscopy was employed primarily for the determination of the masses and relative abundances of isotopes. Developments had proceeded in two general directions. The first of these dealt mainly with the measurement of atomic masses." Dans cet article, il ne précisait pas quelle était la deuxième direction générale prise par la spectrométrie de masse au cours de son développement. Mais, on peut se permettre de compléter cette affirmation, en proposant qu'un des challenges les mieux définis, fut aussi de proposer un accès le plus rapide possible à la structure moléculaire d'entités de taille croissante. La réponse apportée concerna le développement de méthodes physiques en relation avec l'analyse chimique structurale pour mesurer le plus précisément possible les rapports masse sur charge (*m/z*) des ions générés en phase gazeuse, mais aussi pour comprendre et anticiper leur réactivité lors des étapes de fragmentation. En clair, il s'agissait d'obtenir les formules brutes des composés analysés et de révéler leur structure moléculaire. Cependant, au préalable, il était nécessaire de proposer des méthodes de transfert en phase gazeuse des molécules à détecter, que ce soit avant ou après l'étape d'ionisation. Les méthodes dites d'ionisation ont été développées selon deux axes principaux.

Le premier de ces axes a consisté à proposer des techniques capables d'ioniser l'analyte neutre introduit en continu dans la source. On vit alors apparaître successivement : la source d'ionisation par impact d'électron (EI) en 1940,[1] la source d'ionisation chimique (CI) en 1966,[2] la source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) en 1975,[3] et la source d'ionisation par électronébullisation ou electrospray (ESI) en 1984.[4] En EI et CI, la molécule est introduite et ionisée en phase gazeuse. En APCI, elle est infusée en phase liquide avant d'être vaporisée et ionisée en phase gazeuse. En ESI, l'ionisation initiale est réalisée en phase liquide avant la dispersion de l'échantillon dans le brouillard de gouttelettes chargées. Il apparaît ainsi que le développement de ce type de sources d'ionisation a été en relation avec l'analyse de composés de tailles et de susceptibilités thermiques croissantes. Dans la même période, le champ d'investigation de la spectrométrie de masse qui était avant tout restreint à la caractérisation structurale de petites molécules organiques, s'est élargi à l'analyse de bio-polymères et même de complexes supramoléculaires. Les applications de la spectrométrie de masse intéressèrent aussi l'analyse quantitative et l'analyse de mélanges complexes parce que ce type de sources est adapté à un couplage avec les méthodes chromatographiques.[5]

Parallèlement au développement de ces sources, une autre méthodologie d'ionisation en spectrométrie de masse émerge. Le principe est différent dans la mesure où l'échantillon doit ici être déposé sur une surface avant introduction dans la source d'ionisation. En 1973, la désorption

par effet de champ (FD) fut ainsi introduite.[6] Suivie par l'apparition de méthodes d'ionisation impliquant un bombardement de particules sur l'échantillon déposé. Parmi ces dernières, on peut citer la technique PDMS (Plasma Desorption Mass Spectrometry) qui produit des ions gazeux suite à un bombardement de la cible par des particules issues de la fission de l'isotope 32 du californium,[7, 8] et les sources de désorption ionisation laser (LDI), [9, 10] si l'irradiation laser est considérée comme un bombardement de photons. L'avantage de ces méthodes, si on admet que les ions ne se fragmentent pas, est qu'il devient possible d'analyser un mélange de composés directement déposé sur la surface, sans passer par le processus de séparation chromatographique. Il subsiste cependant un inconvénient majeur, lié à des difficultés dans l'analyse de composés thermolabiles et non volatiles. En effet, il est dans ce cas nécessaire que le processus de vaporisation/désorption/ionisation soit plus rapide que la décomposition thermique du composé à l'état condensé et que l'énergie interne accumulée par les ions gazeux ne soit pas trop élevée afin de ne pas observer des décompositions métastables des ions émis.[6, 9] Pour circonvenir à cet inconvénient, l'idée d'introduire un composé intermédiaire entre la source d'énergie et la production d'ions gazeux a été mise à contribution. Les techniques d'ionisation assistées par matrice comme les méthodes FAB (Fast Atom Bombardment)[11, 12] et MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)[13, 14] ont été alors développées. En FAB, l'échantillon est mélangé à une matrice visqueuse et l'ensemble subit un bombardement d'atomes rapides d'argon ou de xénon qui permet d'expulser en phase gazeuse l'analyte intact. Celui-ci s'ionise alors que les molécules de matrices ont participé au transfert d'énergie et protégé l'échantillon. En MALDI, l'échantillon déposé est co-cristallisé avec des molécules de matrice en large excès qui absorbent à la longueur d'onde du laser utilisé. Ce sont ces molécules qui initient le processus de désorption ionisation laser, protègent l'échantillon vis-à-vis de l'irradiation et permettent d'analyser des composés thermolabiles par spectrométrie de masse dans des conditions douces. L'ionisation MALDI est particulièrement bien adaptée à l'analyse de bio-polymères de hauts poids moléculaires et de mélanges complexes sans étapes préalables de séparation des constituants. Il est cependant rapidement apparu qu'elle ne permettait pas d'analyser des petites molécules à cause de la présence des ions de matrices dans les gammes de faibles rapports *m/z*.

De nombreuses méthodes de désorption ionisation laser dites sans matrice sont apparues postérieurement au MALDI.[15, 16] Elles utilisent des surfaces modifiées par différents types de matériaux afin de constituer des milieux de confinement et de protection de l'échantillon vis à vis du rayonnement laser. Le but est alors de proposer des méthodes LDI alternatives au MALDI pour l'analyse haut débit de composés thermolabiles et de faibles poids moléculaires.

C'est dans cette optique, qu'une nouvelle méthode d'ionisation appelée DIAMS (pour Desorption/Ionization on self Assembled Monolayer Surface) a été développée à l'Université

d'Angers au sein du groupe Physico-Chimie et Dispositif pour l'Analyse de l'UMR 6200 CIMA (Chimie et Ingénierie Moléculaire d'Angers) et publiée en 2006.[17] L'intérêt d'utiliser des monocouches auto-assemblées en spectrométrie de masse pour la désorption/ionisation laser a depuis été confirmé au travers du dépôt d'un brevet par The Korea Research Institut of Standards and Science avec une date de priorité au 25/04/08.

Il était donc intéressant de réaliser une étude plus complète dédiée spécifiquement à la méthode DIAMS. Dans un premier temps, les caractéristiques principales de la technique ont été systématisées et sa faisabilité a été évaluée plus précisément au travers d'analyses qualitatives et quantitatives de différentes molécules cibles. C'est ce qui est présenté au sein de ce mémoire, dans le chapitre "Principes, élaboration et faisabilité de la méthode DIAMS". Dans un deuxième temps, la compréhension des phénomènes impliqués dans l'obtention d'ions gazeux a fait l'objet d'études mécanistiques grâce à des évaluations comparatives de distributions d'énergie interne et de vitesses initiales des ions produits. Ces études sont regroupées respectivement dans les chapitres "Evaluations comparatives des distributions d'énergie interne d'ions gazeux produits par la méthode DIAMS" et "Evaluations comparatives des vitesses initiales d'ions gazeux produits par la méthode DIAMS". Cependant, afin de mieux situer la méthode DIAMS parmi les autres méthodes liées à l'utilisation d'une source laser et de mieux anticiper les différents phénomènes impliqués dans les processus LDI/MS, un premier chapitre consacré au "rayonnement laser et son implication en Spectrométrie de Masse" est d'abord proposé.

(1) Bleakney W. *Physical Review* **1929**, *34*, 157-160.
(2) Munson M.S.B.; Field F.H. *Journal of the American Chemical Society* **1966**, *88*, 2621-2630.
(3) Carroll D.I.; Dzidic I.; Stillwell R.N.; Haegele K.D.; Horning E.C. *Analytical Chemistry* **1975**, *47*, 2369-2373.
(4) Yamashita M.; Fenn J.B. *Journal of Physical Chemistry* **1984**, *88*, 4451-4459.
(5) Abian J. *Journal of Mass Spectrometry* **1999**, *34*, 157-168.
(6) Schulten H.R.; Prinz H.; Beckey H.D.; Tomberg W.; Klein W.; Korte F. *Chemosphere* **1973**, *2*, 23-30.
(7) Macfarlane R.D.; Torgerson D.F. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics* **1976**, *21*, 81-92.
(8) Macfarlane R.D.; Torgerson D.F. *Science* **1976**, *191*, 920-925.
(9) Tabet J.C.; Cotter R.J. *Analytical Chemistry* **1984**, *56*, 1662-1667.
(10) Posthumus M.A.; Kistemaker P.G.; Meuzelaar H.L.C.; Ten Noever de Brauw M.C. *Analytical Chemistry* **1978**, *50*, 985-991.
(11) Barber M.; Bordoli R.S.; Sedgwick R.D.; Tyler A.N. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1981**, 325-327.
(12) Barber M.; Bordoli R.S.; Sedgwick R.D.; Tyler A.N. *Nature* **1981**, *293*, 270-275.
(13) Tanaka K.; Waki H.; Ido Y.; Akita S.; Yoshida Y.; Yoshida T. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151-153.
(14) Karas M.; Hillenkamp F. *Analytical Chemistry* **1988**, *60*, 2299-2301.
(15) Peterson D.S. *Mass Spectrometry Reviews* **2007**, *26*, 19-34.
(16) Afonso C.; Budimir N.; Fournier F.; Tabet J.C. *Current Pharmaceutical Design* **2005**, *11*, 2559-2576.
(17) Sanguinet L.; Alévèque O.; Blanchard P.; Dias M.; Levillain E.; Rondeau D. *Journal of Mass Spectrometry* **2006**, *41*, 830-833.

Chapitre I :

Le rayonnement laser et son implication en Spectrométrie de Masse

Les lasers sont définis comme des sources lumineuses pouvant produire un rayonnement électromagnétique cohérent de forte intensité. Les sources laser tiennent une place de plus en plus importante en ce qui concerne les problèmes d'analyse de la matière, celles-ci permettant de sonder le milieu à distance, de façon ultrarapide et avec une grande résolution spatiale. En spectrométrie de masse, les lasers sont utilisés pour transférer de l'énergie à la matière afin de la faire passer en phase gazeuse, de l'ioniser ou de la fragmenter. Dans ce cas, un faisceau laser, focalisé sur une surface, permet de désorber des particules sous forme neutre ou ionisée. La désorption laser couplée à un analyseur en masse permet d'avoir accès à la caractérisation d'une large gamme de composés, que ce soient des minéraux ou des molécules organiques ou biologiques. Le caractère pulsé de la production des ions gazeux inhérent au phénomène laser, a conduit au couplage de ce type de sources avec des analyseurs à temps de vol (TOF pour Time of Flight).

Malgré la démocratisation de l'utilisation des lasers, leur rôle fondamental dans les sources de type désorption/ionisation laser implique une description succincte de son fonctionnement. Celle qui est donnée ici s'articule selon deux grands axes. Le premier est lié aux caractéristiques propres du rayonnement laser alors que le deuxième s'attache à décrire l'interaction du rayonnement avec différents types de surfaces et les grandes applications analytiques de la spectrométrie par désorption ionisation.

1 Le rayonnement laser

La particularité, qui fait du rayonnement laser une source lumineuse si différente, réside dans le fait qu'il est émis par émission stimulée. Les dispositions très spéciales du système émissif permettent d'utiliser ce phénomène d'absorption et d'émission de photons et de fournir une lumière très intense et d'une très grande pureté spectrale. Le premier laser a été mis au point vers 1960 et le terme laser provient de l'acronyme *"light amplification by stimulated emission of radiation"* (en français : "amplification de la lumière par émission stimulée de radiation").[1, 2] Il peut donc être utile de rappeler les caractéristiques d'un faisceau laser, dans la mesure où son principe de fonctionnement a fait l'objet d'une description préalable.

1.1 Absorption et émission de photons

Sous irradiation lumineuse, les molécules ou atomes d'un matériau peuvent absorber de l'énergie photonique, ce qui conduit au peuplement d'un ou de plusieurs de ses niveaux excités. Les espèces excitées peuvent retourner à leur état fondamental en libérant de l'énergie sous forme de chaleur, de lumière ou de quantité de mouvement. Le principe de l'émission laser est alors d'utiliser cette interaction rayonnement matière pour créer et amplifier de la lumière, en mettant notamment à profit les phénomènes d'absorption, d'émission spontanée et d'émission stimulée.

- **L'absorption** d'une énergie extérieure, appelée énergie de pompage dans le cas des lasers, permet d'exciter les atomes d'un état fondamental $\boldsymbol{E_1}$ vers un état excité $\boldsymbol{E_2}$. Dans le cas des lasers, les atomes/molécules utilisés absorbent dans un domaine du rayonnement électromagnétique de la lumière, c'est-à-dire à une valeur de longueur d'onde correspondant à une transition possible vers un état excité (Figure 1.1).

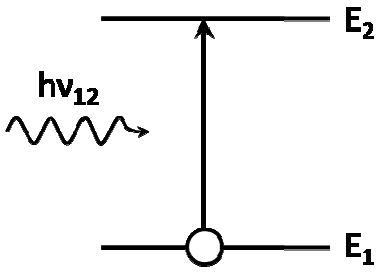


Figure 1.1 : Schéma illustrant le peuplement d'un état excité E_2 à partir d'un état fondamental E_1 lors de l'absorption d'un photon de longueur d'onde $h\nu_{12}$

La dynamique du phénomène d'absorption dépend d'une part, du rapport entre les populations de l'état excité N_2 et de l'état fondamental N_1, et d'autre part, de l'écart d'énergie entre les niveaux considérés et donc de l'intensité de l'excitation.

- **L'émission spontanée** est un phénomène naturel de retour à un état de plus basse énergie. Les électrons d'un atome excité ou d'une molécule excitée tendent à retourner vers leur état fondamental. Cette transition électronique entre l'état excité et un état de plus basse énergie est spontanée et accompagnée de l'émission d'un photon d'énergie $\boldsymbol{h\nu_{21} = E_2 - E_1}$ (Figure 1.2).

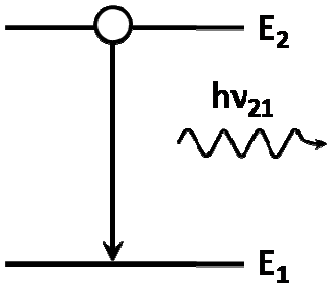


Figure 1.2 : Schéma illustrant une émission spontanée d'un photon dont la longueur d'onde $h\nu_{21}$ correspond à l'écart entre les niveaux d'énergie de l'état excité E_2 et de l'état fondamental E_1

Cette émission spontanée est incohérente puisque chaque atome/molécule émet indépendamment des autres. Ainsi, il n'y a pas de relation de phase, de direction, de polarisation entre les différentes émissions, et le rayonnement est omnidirectionnel.

- **L'émission stimulée**, proposée par Einstein en 1917, correspond, comme pour l'émission spontanée, à la libération d'un photon par relaxation d'un atome excité ou d'une molécule excitée vers un niveau d'énergie inférieur.[3] La désexcitation est provoquée par l'arrivée d'un photon d'énergie *hv* et accompagnée de l'émission d'un deuxième photon. (Figure 1.3).

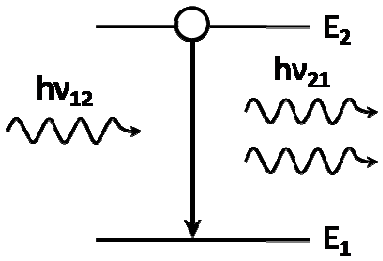


Figure 1.3 : Schéma illustrant une émission stimulée induite par l'absorption d'un photon de longueur d'onde $h\nu_{21}$

L'émission stimulée possède des propriétés remarquables. En effet, les rayonnements inducteurs et induits présentent:

- la même phase,
- la même direction,
- la même polarisation.

Il n'y a donc physiquement aucun moyen possible de séparer les photons inducteurs et les photons induits. On dit que l'émission est cohérente et qu'il y a "amplification de lumière par émission stimulée de rayonnement".

Dans le cas de l'émission stimulée, la vitesse de désexcitation est proportionnelle à la population du niveau supérieur et à la quantité de photons inducteurs.

1.2 Principe de fonctionnement d'un laser

Comme dit précédemment, le principe d'un laser est d'utiliser le phénomène d'émission stimulée pour produire et amplifier un flux de photons. Le dispositif utilisé est un oscillateur laser, il permet de mettre en œuvre ce type de relaxation et d'obtenir un rayonnement de forte intensité.

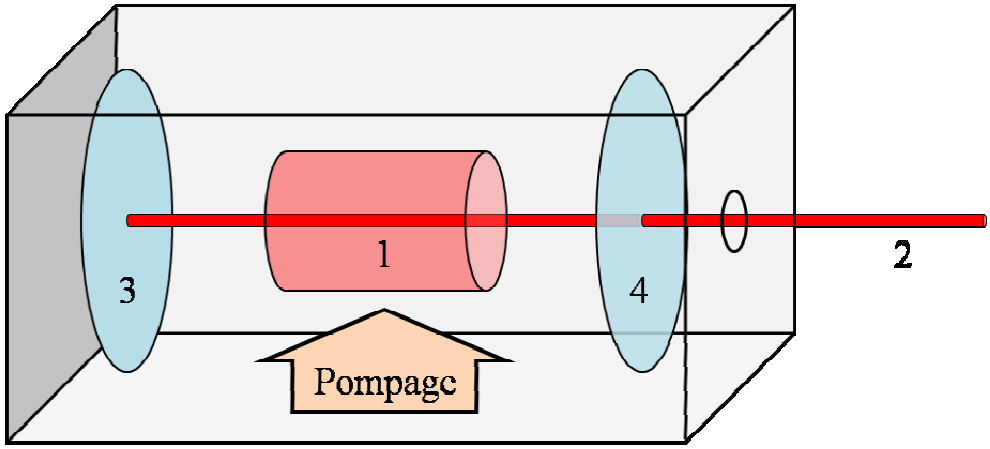


Figure 1.4 : Principe de fonctionnement du laser

1- milieu actif 2- faisceau laser 3- miroir 4- miroir semi-réfléchissant

Classiquement, un oscillateur laser est constitué de trois éléments fondamentaux (Figure 1.4) :

- un milieu actif,
- un système de pompage,
- une cavité résonante (miroirs 3 et 4).

Dans le cas d'un laser, un des miroirs est semi-réfléchissant afin de permettre l'utilisation du rayonnement.

1.2.1 Le milieu actif

Le milieu actif est en quelque sorte l'élément clé du dispositif. C'est d'ailleurs lui qui définit la caractéristique principale d'un laser, à savoir, la longueur d'onde à laquelle il émet. De ce fait, les différents lasers sont généralement désignés par le milieu actif qu'ils utilisent (Tableau 1.1). Cet élément, aussi appelé milieu amplificateur, est choisi pour sa prédisposition à fournir un rayonnement laser. Pour cela il doit présenter un niveau excité qui se peuple facilement, qui ait une assez longue durée de vie et qui permette une désexcitation radiative.

La matière qui compose le milieu actif peut être sous forme liquide, solide ou gazeuse (Tableau 1.1). Les molécules ou atomes qui le constituent sont excités en continu par le système de pompage puis relaxés par émission stimulée. La longueur d'onde à laquelle émet le laser est justement déterminée par l'énergie libérée lors de cette désexcitation radiative, c'est à dire par la différence entre les deux niveaux d'énergie mis en jeu.

Type de laser	Milieu actif	Longueur d'onde
Laser à solide	Rubis : Alumine (Al_2O_3) dopé Cr^{3+}	694 nm
	Saphir : Alumine (Al_2O_3) dopé Ti^{3+}	800 nm
	Verre dopé au Nd^{3+}	1053 nm
	Nd-YAG : Grenat d'Yttrium et d'Aluminium dopé Nd^{3+}	1064 nm
Laser à gaz	Mélange d'argon et de fluor (ArF)	193 nm
	Mélange de krypton et de fluor (KrF)	249 nm
	Mélange de xénon et de chlore (XeCl)	307 nm
	Azote (N_2)	337,1 nm
	Mélange d'hélium et de néon (HeNe)	632 nm
	Dioxyde de carbone (CO_2)	10,6 µm
Laser à semi-conducteur	AsGa	904 nm
Laser à colorant	Rhodamine	400 à 800 nm

Tableau 1.1 : Classification des différents lasers en fonction de leur milieu actif et de leur longueur d'onde d'émission

1.2.2 Le processus d'inversion de population

Le rayonnement laser émis est initié par une désexcitation d'une espèce excitée du milieu actif sous forme d'émission spontanée. Ensuite, par une interaction de proche en proche, le photon émis peut soit être absorbé soit provoquer une émission stimulée en fonction de la répartition de population de l'espèce rencontrée. Dans un système à l'équilibre et à température ambiante, les niveaux les plus peuplés sont les niveaux de plus basse énergie. Dans un tel cas, la réponse globale du système sera une absorption du photon et il n'y a pas formation du faisceau laser. Pour obtenir un rayonnement laser, la population du milieu actif est inversée de façon à peupler majoritairement les niveaux énergétiques supérieurs. Ainsi un photon émis possède une plus grande probabilité de rencontrer une espèce excitée qu'une espèce au repos et le phénomène d'émission stimulée prend le pas sur l'absorption. La création de nouveaux photons entraine une réaction en cascade qui contribue à la formation du faisceau laser et à son amplification. L'inversion de population est réalisée par une excitation extérieure, appelée "pompage", qui permet de promouvoir les atomes ou molécules du milieu actif vers leurs niveaux énergétiques supérieurs et de disposer d'une réserve permanente d'espèces excitées susceptibles d'émettre.

L'obtention d'une inversion de population en utilisant des systèmes de pompage à deux niveaux d'énergie s'avère très difficile, ainsi les systèmes classiques utilisent trois ou quatre niveaux d'énergie (Figure 1.5).

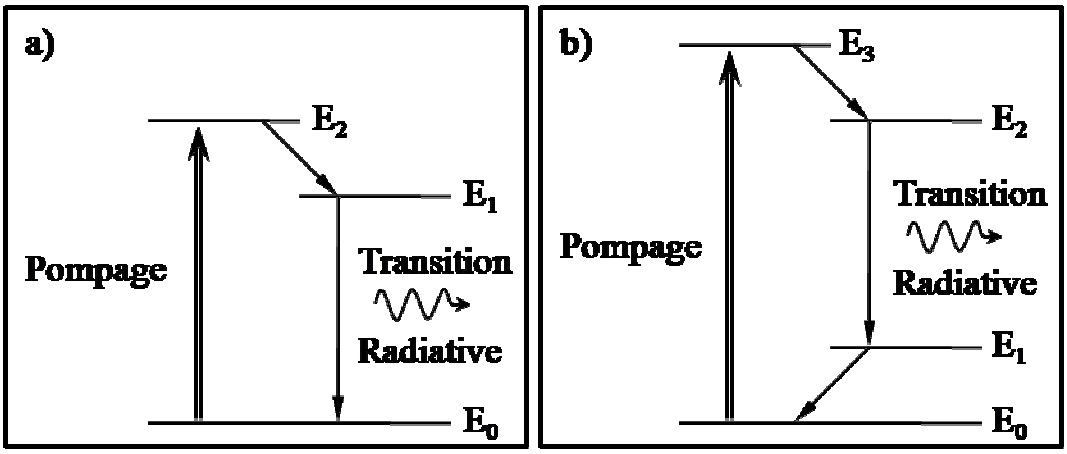


Figure 1.5 : Description schématique de systèmes de pompage à 3 niveaux a) et à 4 niveaux b)

Dans un système à trois niveaux (Figure 1.5 a)), le niveau E_2 est peuplé lors du pompage. Ce niveau doit avoir une courte durée de vie afin de peupler rapidement un niveau E_1 d'énergie inférieure par le biais d'un transfert non radiatif. A l'inverse, le niveau E_1 doit être métastable pour servir de réservoir et rendre l'inversion de population possible. L'avantage de cette configuration étant que le niveau E_2 est toujours très peu peuplé, ce qui aide la transition de pompage entre E_0 et E_2, et le niveau E_1 est toujours très peuplé, ce qui facilite la désexcitation radiative qui a lieu entre E_1 et E_0.
Le pompage à quatre niveaux (Figure 1.5 b)) fonctionne de façon similaire. Lors du pompage, le niveau E_3 est peuplé, s'en suit une désexcitation non radiative rapide vers un niveau métastable E_2. La différence avec le système à trois niveaux est que la transition radiative se produit vers un autre niveau intermédiaire instable E_1 qui se vide en permanence par désexcitation non radiative vers l'état fondamental. Dans cette configuration, le niveau E_1 est très peu peuplé, ce qui encourage la désexcitation radiative entre E_2 et E_1, et le niveau E_0 est plus peuplé que dans le pompage à 3 niveaux ce qui favorise la transition de pompage.
Différents types de pompage se distinguent :

- **Le pompage optique :** le milieu actif est excité par une lampe à décharge, à chaque pulsation lumineuse, les niveaux énergétiques supérieurs sont abondamment peuplés. Ce mode de pompage est utilisé dans les lasers à solide, dont le milieu actif est un cristal dopé dont les impuretés permettent d'atteindre la bonne configuration de niveaux d'énergie.
- **Le pompage électronique :** ce type de pompage est généralement utilisé dans les lasers à gaz. Les électrons d'une décharge électrique sont accélérés et interagissent avec le milieu

actif gazeux. Ils cèdent une partie de leur énergie cinétique aux atomes ou molécules qui vont être excités ou ionisés et provoquent l'inversion de population.

- **Le pompage chimique :** certaines réactions chimiques produisent directement une inversion de population, comme dans le laser à fluorure d'hydrogène. Mais ce sont généralement des réactions exothermiques qui sont utilisées pour exciter d'autres molécules et engendrer l'inversion de population.

1.2.3 La cavité laser

L'inversion de population seule n'est pas suffisante pour obtenir l'effet laser, elle ne permet qu'une amplification limitée. Il faut concentrer les photons dans une direction et multiplier le coefficient d'amplification du milieu actif, c'est le rôle de la cavité optique. Elle est formée par les deux miroirs parallèles, représentés par les éléments 3 et 4 sur la Figure 1.4, qui encadrent le milieu actif. Un premier miroir totalement réfléchissant et un second semi-réfléchissant qui laisse sortir le rayonnement laser.

Après l'opération de pompage sur les atomes du milieu actif qui réalise l'inversion de population, les premiers photons sont générés par émission spontanée sans direction privilégiée. Ces photons interagissent avec les atomes excités voisins et se multiplient par émission stimulée. La configuration des miroirs est prévue pour que seuls soient conservés les photons qui évoluent dans l'axe normal aux miroirs, ceux qui se propageraient dans une autre direction sont rapidement perdus. Quelques allés-retours dans la cavité suffisent pour obtenir un gain important et un faisceau suffisamment intense pour traverser le miroir semi-réfléchissant.

1.3 Caractéristiques principales d'un faisceau laser

Le rayonnement laser se distingue par ces quatre principales propriétés :

- **Directivité et faible divergence :** Une propriété fondamentale du rayonnement laser est sa directivité. Laquelle est principalement due au principe de fonctionnement de la cavité, qui concentre les photons le long de l'axe normal aux miroirs, et à l'amplification par émission stimulée, pour laquelle les nouveaux photons émis ont la même direction que les photons inducteurs.

  Cette directivité est seulement limitée par les phénomènes de diffraction dans le milieu de propagation qui peuvent induire une faible divergence du faisceau.
- **Monochromaticité :** La lumière produite par un laser est monochromatique. Les lasers existants proposent une large gamme de longueurs d'onde allant du domaine de l'infrarouge à celui des rayons X, celles-ci sont déterminées par la transition radiative exploitée et par les dimensions de la cavité optique.

- **Irradiance :** Liée à la quantité d'énergie (ou densité de photon) délivrée par le laser, elle est exprimée en $W.cm^{-2}$ et représente la puissance transmise par unité de surface, c'est-à-dire une quantité d'énergie par unité de temps et de surface. Les faisceaux laser peuvent atteindre de très fortes intensités ou irradiances grâce à l'amplification du rayonnement dans la cavité et par concentration du faisceau en utilisant une optique adaptée. Il faut remarquer que le terme de fluence peut être également utilisé pour caractériser l'énergie d'un faisceau laser. Il s'agit alors d'une quantité d'énergie transmise par unité de surface, exprimée en $J.cm^{-2}$.
- **Cohérence :** Lorsqu'un photon est émis, son rayonnement électromagnétique est défini comme un train d'onde. Dans le cas du rayonnement laser, les trains d'onde de tous les photons émis sont en phase aussi bien spatialement que temporellement, c'est pourquoi le rayonnement laser est dit cohérent.

2 L'interaction du rayonnement Laser avec une surface et son application en spectrométrie de masse par désorption ionisation laser

Comme pour n'importe qu'elle onde électromagnétique, lorsque le faisceau laser atteint une surface, il y a compétition entre les phénomènes d'absorption, de réflexion et de transmission. En spectrométrie de masse, l'interaction laser/matière est notamment utilisée en désorption ionisation laser, désignée par l'acronyme anglophone LDI (pour Laser Desorption Ionization).

En général, l'irradiation d'une surface par un laser peut engendrer des phénomènes allant d'un simple échauffement local à la vaporisation, la désorption ou l'ablation des constituants de celle-ci. La vaporisation étant le passage d'un état condensé à l'état gazeux, elle sous-entend la fusion de la matière et donc que sa vitesse de vaporisation soit très supérieure à sa cinétique de décomposition thermique *in situ*, sans quoi l'évaporation laisse place à la pyrolyse. La désorption est un processus physique différent puisqu'elle met en jeu des ruptures de liaisons formées entre des molécules ou des ions et une surface adsorbante. C'est un phénomène endothermique qui est favorisé par une faible pression, une température élevée ou la présence d'un champ électrique intense. Enfin, l'ablation est plutôt à définir comme un phénomène macroscopique de retrait d'une certaine quantité de matière à partir d'une substance déposée en surface.

Les mécanismes qui, suite à une interaction laser-matière, génèrent des ions sont difficiles à modéliser. Le phénomène peut être succinctement décrit de la façon suivante : sous l'effet de l'onde électromagnétique, la matière irradiée passe dans un état excité et la redistribution de l'énergie stockée conduit à différents processus de désorption et/ou d'ionisation. Différents mécanismes expliquant le passage des molécules de la phase solide à la phase gaz sous l'effet d'une irradiation laser ont été proposés.[4, 5] Ils ont notamment montré qu'il fallait prendre en compte la nature de la

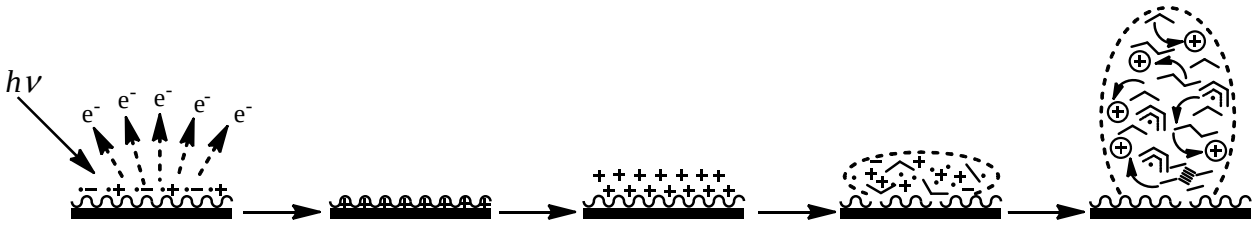
surface irradiée et la valeur de l'irradiance du faisceau laser, ce qu'il faudra nécessairement considérer lors d'une description plus précise des mécanismes LDI.

Dans ce contexte, on propose de considérer trois types génériques de surfaces, la surface métallique ou composée d'oxyde de métaux ou de film polymérique, la surface recouverte de films moléculaires ou de molécules adsorbées et la surface recouverte de molécules cristallisées absorbant à la longueur d'onde du laser. Chacun pouvant être associé à des techniques de désorption/ionisation laser, ainsi le deuxième cas peut par exemple correspondre à un dépôt LDI et le dernier, à la méthode MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization).

Cependant, pour décrire l'ensemble des étapes intervenant de l'irradiation de la surface à l'observation des ions sur les spectres de masse, il est aussi nécessaire de s'attacher aux processus d'ionisation en phase gaz. A ce sujet, le comportement du nuage gazeux émis est particulièrement à considérer, que ce soit en mode MALDI ou dans ce que l'on peut maintenant référencer comme le mode LDI sans matrice.

2.1 La désorption ionisation laser à partir d'une surface métallique ou d'un matériau

Le processus LDI impliquant l'irradiation laser d'une surface constituée de métaux, d'oxydes métalliques ou d'un matériau quelconque, peut s'illustrer de façon générale selon une suite d'évènements illustrés dans la Figure 1.6.



t ≤ 0,01 ns	t ≤ 0,1 ns	t ≤ 1 ns	t = 2 ns	5 ns ≤ t ≤ 100 µs
Emission de photoélectrons suite à l'absorption non linéaire de photons	Apparition de charges en surfaces suite à la formation d'excitons et à l'émission thermoïonique	Ionisation de surface conduisant à l'émission d'ions secondaires	Formation d'un plasma par émission d'ions, de radicaux d'atomes et de molécules neutres	Expansion du nuage constituant la plume du laser dont la densité élevée conduit à des réactions ion/molécule et à l'émission d'agrégats ionisés

Figure 1.6 Schéma illustrant les principales étapes conduisant à la formation d'ions gazeux à partir d'une interaction laser/surface

Ces événements sont cependant liés aux différents régimes d'irradiance du laser. En effet, suivant les domaines d'énergie du rayonnement, la description mécanistique doit englober un ensemble de phénomènes allant de la simple volatilisation à l'ignition du plasma formé tel qu'illustré dans la Figure 1.7.

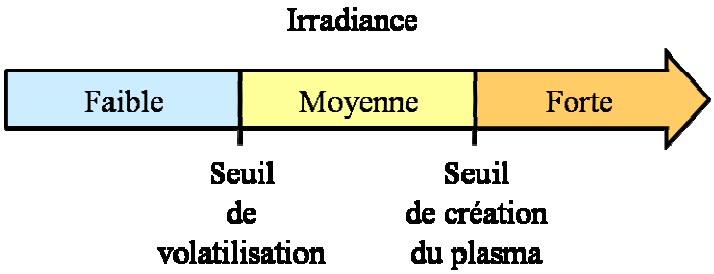


Figure 1.7 : Représentation schématique des trois zones d'irradiance en fonction des seuils de volatilisation et de création d'un plasma de la molécule irradiée

2.1.1 Faible irradiance $I_0 < 10^5$ W.cm^{-2}:

En dessous du seuil de volatilisation des molécules irradiées, c'est principalement un phénomène de désorption par échauffement de la surface qui s'opère. Même si les transferts de matière à travers l'interface solide/vide sont négligeables, cet échauffement conduit au détachement de quelques molécules et d'ions adsorbés. On peut alors envisager que les spectres de masse obtenus dans des conditions similaires contiendraient une grande majorité d'ions moléculaires, certainement préformés en phase solide.

2.1.2 Irradiance moyenne (Intensité $I_0 < 10^6$ à 10^7 W.cm^{-2})

Pour une irradiance moyenne, trois phases différentes doivent être prises en compte. Dans la phase dite de préablation (ΦI), l'intensité effectivement reçue par la surface $I(t)$ va non seulement dépendre du profil de l'intensité de l'impulsion laser I_0, mais aussi du coefficient d'absorption linéaire α du matériau et de la profondeur de pénétration x du rayonnement dans la matière, tel que : $I(t) = I_0(t) \cdot e^{-\alpha(t) \cdot x(t)}$.[6] Plus le matériau a un coefficient α élevé, plus l'intensité seuil d'ablation I_{seuil} de surface sera faible. Quand le seuil de volatilisation est dépassé, c'est à dire durant la phase d'ablation proprement dite (ΦII), l'évaporation ou l'éjection des molécules à la surface de la cible devient non négligeable. Ce qui entraine la formation d'un nuage de molécules gazeuses en expansion, appelé la plume. Ce nuage a un coefficient d'absorption β qui va induire un effet d'écran sur la surface en cours d'irradiation. A cause de la plume, l'intensité laser qui atteint réellement la surface est maintenant liée aux propriétés d'absorption du nuage gazeux telle que : $I(t) = I_0(t) \cdot e^{-\beta(t) \cdot x(t)}$. La vitesse de formation du nuage ou vitesse d'ablation devient : $v_{ablation} = k\left[I_0(t) \cdot e^{-\beta(t) \cdot x(t)} - I_{seuil} \right]$. En résumé, l'intensité réellement reçue par la surface au cours de l'irradiation est liée à l'intensité du faisceau laser, à la vitesse d'éjection de la matière, à l'effet d'écran du nuage formé et à la durée de l'impulsion laser. Une des conséquences de l'influence de ces paramètres qui interagissent, est illustrée dans la Figure 1.8.

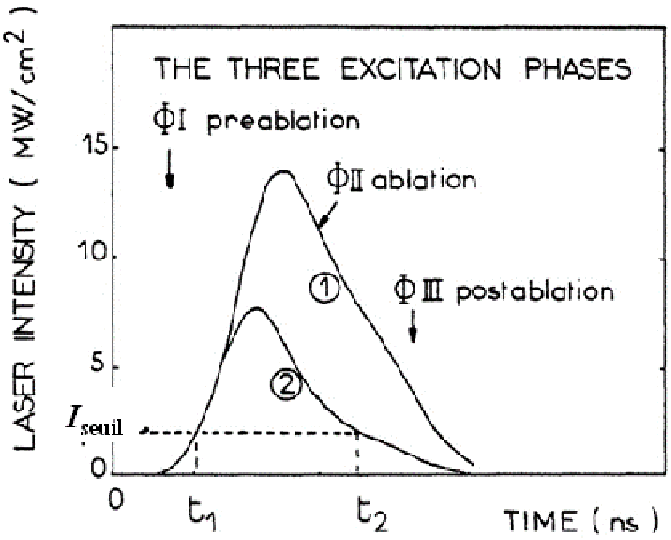


Figure 1.8 : Comparaison des profils de l'intensité (irradiance) d'une impulsion délivrée lors d'un pulse de laser excimère (193 nm, 200 mJ.cm^{-2}) (courbe 1) et de l'intensité (irradiance) effectivement reçue par la surface après absorption par le nuage gazeux créé (courbe 2) au cours des phases de désorption ionisation laser à irradiance moyenne.[6]

A travers cet exemple, il apparaît que l'effet d'écran induit une décroissance de l'intensité réelle reçue par la surface plus rapide que celle du faisceau émis. Alors que la phase d'ablation (ΦII) semble avoir commencé avec une intensité seuil d'ablation I_{seuil} correspondant à celle du laser (valeur de I_0 au temps t_1 sur Figure 1.8), la phase de postablation (ΦIII) va se mettre en place avant l'abaissement de I_0 à une valeur de I_{seuil} effectivement reçue par la surface. Pour une plume formée avec un coefficient d'absorption β relativement faible, le nuage formé restera optiquement transparent. Il ne sera chauffé que par un transfert de matière thermiquement excitée à travers la surface puis refroidie par le phénomène d'expansion. Ce modèle dit de la plume froide est cohérent avec des températures mesurées dans le nuage gazeux relativement basses et dans lequel l'ionisation thermique n'est donc pas un processus significatif.[7] On parle alors d'une énergie thermique transférée par conduction thermique de la cible. Par contre, il faut bien garder à l'esprit qu'au moment où la plume se forme, elle présente une densité de matière élevée qui rend possibles des réactions d'ionisation en phase gaz. Ces dernières comptent parmi les voies les plus probables de production des ions qui contribueront aux grandes lignes du spectre de masse,[8] les réactions de protonation et de cationisation étant souvent la source de la majorité des ions du nuage.[9]

2.1.3 Forte irradiance $I_0 > 10^8$ W.cm^{-2}:

Au terme de conductivité thermique K (W.m^{-1}.K^{-1}) définit pour un matériau ou un alliage comme sa capacité à transférer 1'énergie du rayonnement par conduction, on substitue le terme de diffusivité

thermique $\kappa = \frac{K}{\rho \cdot C}$ ($m^2.s^{-1}$) où ρ est la masse volumique en g. m^{-3} et *C* la capacité calorifique en $J.g^{-1}.K^{-1}$.[10] La diffusivité thermique est donc le rapport entre la conductivité thermique et la capacité thermique du matériau considéré. Une diffusivité thermique importante (*K* grand et le produit $\rho.C$ petit) comme dans le cas de métaux tels que le cuivre ou l'or, signifie que le milieu est plus apte à transférer la chaleur qu'à la stocker. La profondeur de pénétration du rayonnement laser *x* est alors calculée à partir de la diffusivité thermique κ et de la durée de l'impulsion τ telle que : $x = 0,969(\kappa\tau)^{1/2}$. Cette pénétration thermique, liée au rayonnement et au matériau, conduit à l'expulsion de matière ionisée et neutre créant un plasma à la surface de la cible irradiée. Plus l'impulsion est courte, plus l'intensité du laser nécessaire à l'ignition du plasma sera élevée.[6] L'expansion du plasma généré à haute irradiance dans le vide peut être décrite selon quatre zones distinctes.

- Première zone : c'est la zone la plus proche de la surface. La densité est maximum et la température qui y règne résulte d'un transfert d'une énergie thermique de l'ordre de 0,1 à 0,2 eV par conduction depuis la cible. On notera que cette valeur d'énergie exprimée en eV dans le cas des plasmas, peut être comparée à une température thermodynamique comprise entre 1000 et 5000 K, permettant d'envisager la formation thermique d'ions et de radicaux.[11]
- Deuxième zone : C'est la zone d'expansion adiabatique initiale du plasma créé. Avec une pression moyenne, le taux de collision reste élevé et la température y est de l'ordre de 3 eV.
- Troisième zone : Elle est surtout caractéristique de l'utilisation de lasers à impulsions courtes (de l'ordre de la nanoseconde), concentrés sur de petites surfaces. Après induction d'une ionisation des atomes et création d'un plasma, ces lasers conduisent également à l'absorption des photons par des électrons libres. Ces électrons convertissent l'excès d'énergie photonique absorbée en énergie cinétique et entrent en collision avec des particules de la phase gaz (atomes, molécules, ions…) qui passent à dans un état excité. Si l'énergie de ces électrons est suffisante, les particules peuvent passer d'un état excité à un état ionisé en créant d'autres électrons libres dits "chauds" engendrant ainsi un phénomène d'avalanches. Ce processus d'absorption est connu sous le nom d'effet "bremsstrahlung inverse". Cette troisième zone, où le plasma absorbe le rayonnement incident et peut atteindre une énergie thermique de plusieurs dizaines d'eV, constitue l'événement le plus chaud du processus LDI à haute irradiance.
- Quatrième zone : Elle est délimitée par l'accroissement de l'expansion du plasma dans le vide. A l'intérieur de cette zone, les phénomènes de collisions se raréfient conduisant à une

perte des électrons chauds qui n'interagissent plus avec les neutres. Les ions positifs divergent certes classiquement du fait de l'expansion, mais il faut aussi ajouter que la perte des charges négatives conduit à l'apparition d'un potentiel positif provoquant un retour des cations vers les régions de plus hautes densités et d'énergies plus élevées.

Enfin, il a été démontré que des pulses de forte irradiance génèrent des ondes de choc dans la plume et des ondes de compression dans le solide.[12, 13] La détente rapide du nuage gazeux, des hautes pressions vers le vide, donne naissance à une onde de choc dans les zones à basse pression. A la frontière entre milieu ionisé et milieu externe, cette onde de choc se convertit en une surface où la température et la pression croient localement. Ce disque de matière dit de Mach se propage à vitesse subsonique alors que l'onde de choc évolue à la vitesse supersonique. Les valeurs des températures et des pressions dépendent notamment du rapport de pression de part et d'autre du disque de Mach au moment du choc. L'élévation de température et de pression se fait en des temps très courts, très inférieurs à la microseconde, et généralement de façon adiabatique. Les niveaux de température et de pression élevés se maintiennent pendant plusieurs centaines de microsecondes.

L'absorption du rayonnement par la cible et la plume ainsi que la propagation de l'onde de choc dans le nuage gazeux rendent compte des effets destructeurs de la désorption ionisation laser à haute irradiance qui conduiraient principalement à générer des ions fragments ou élémentaires.

2.2 La désorption ionisation laser à partir d'une surface moléculaire

Un grand nombre de molécules différentes peut être caractérisé par LDI-MS. Cependant, pour décrire les phénomènes qui interviennent lors d'une désorption laser d'une surface recouverte d'une couche de molécules, il faudrait tenir compte des propriétés de chaque entité présente au niveau de la surface telles que : leurs coefficients d'absorption α, leurs températures de fusion T_{fus} et de sublimation T_{sub}. Le but serait de pouvoir situer les irradiances seuils qui séparent les différents régimes.

Le mécanisme le plus communément admis considère que lors de l'interaction du faisceau laser avec la cible, la partie située au centre de l'impact atteint instantanément une température élevée à une vitesse de $\sim 10^{11}$ $K.s^{-1}$.[14] Ce qui induit la formation d'un plasma contenant des électrons, des cations (H^+, Na^+, K^+…) et des anions (O^-, Cl^-,…). Au niveau du pourtour de l'impact, les molécules adsorbées sont vaporisées à cause de la diffusion de la chaleur dont la vitesse dépend du coefficient d'absorption et de la conduction thermique de la surface ainsi que du flux de chaleur et de l'irradiance du faisceau laser.[15] Pour observer des ions sur un spectre de masse LDI, dans de telles conditions, il est nécessaire que la compétition qui s'établie entre le phénomène de désorption/vaporisation et la réaction chimique en surface (comme la pyrolyse par exemple) soit favorable à la production d'espèces gazeuses intactes.[14] Des vitesses de chauffage de l'ordre de 10^8

$K.s^{-1}$ semblent favorables à la mise en place d'un processus de désorption à la place d'un évènement réactionnel de surface.[16, 17]

Dans le but de présenter les différents processus de désorption/ionisation qui peuvent intervenir à différentes irradiances dans le cas d'une molécule déposée sur une surface, une modélisation a été proposée.[18] Ce modèle figure un cas général où les différents régimes sont séparés en fonction des facteurs les plus déterminants : l'irradiance laser, I_0 et le coefficient d'absorption optique du solide, α. La Figure 1.9 représente les zones d'existences de chaque régime et utilise trois seuils différents :

- le seuil de volatilisation, I_0^{volat}, qui correspond au seuil d'évaporation de la matière ionisée.
- le seuil de création du plasma, I_0^{plasm}, à partir duquel le gaz de la plume se transforme en plasma.
- le seuil d'opacité optique, I_0^{break}, qui est atteint lorsque la plume est si dense et ionisée qu'elle absorbe l'intégralité du rayonnement laser.

Ils sont figurés par des lignes pointillées verticales. Dans le cas de la Figure 1.9, les seuils mentionnés sont choisis comme fixes. Mais, ils peuvent aussi varier et dépendre alors d'autres propriétés de la molécule irradiée comme de ses températures de fusion et de sublimation ou de sa conduction thermique.

Ainsi, pour une irradiance croissante, sont successivement attendus d'après les étapes décrites dans la Figure 1.9 :

- Un échauffement de la surface et une désorption thermique jusqu'au seuil de volatilisation.
- Une fusion et une évaporation de la surface du solide pour une irradiance légèrement supérieure au seuil de volatilisation.
- Une évaporation plus en profondeur du solide irradié.
- La formation d'une plume optiquement transparente lorsque l'évaporation de la matière est plus importante.
- L'absorption d'une partie du rayonnement par la plume et la création d'un plasma au dessus du seuil de création de celui-ci.
- Une opacification complète de la plume à haute irradiance.
- On notera que les étapes d) et e) sont possibles pour des gammes de coefficients d'absorption de la molécule déposée plus larges que pour l'étape de volatilisation.

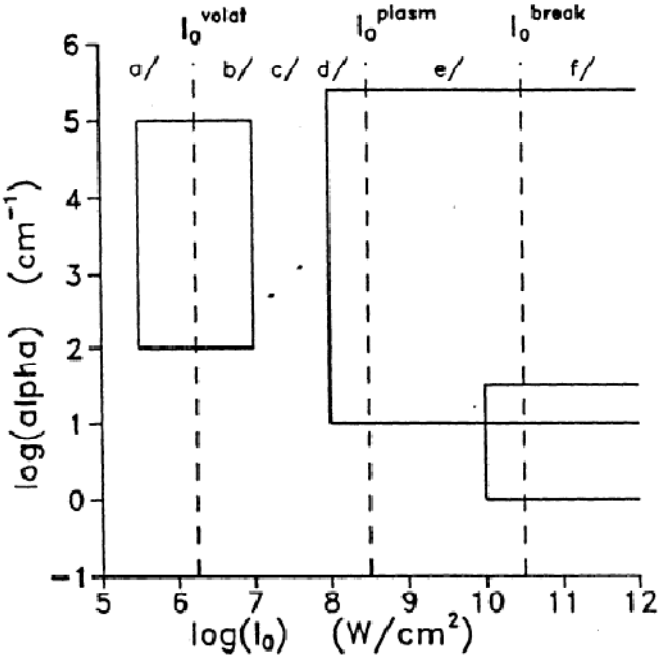


Figure 1.9 : Schéma représentant la répartition des différents régimes de l'interaction laser/solide en fonction de l'irradiance et du coefficient d'absorption de la molécule solide déposée.[18]

Les possibilités offertes par la désorption ionisation laser de molécules organiques déposées sur une surface ont été testées à partir de différents types de composés. Des oligosaccharides,[19, 20] des peptides,[19] des protéines[21] et des polymères de synthèse ont ainsi pu être détectés à l'état d'adduits de cations alcalinoterreux $[M+Na]^+$ et $[M+K]^+$.[22] On notera que dans tous les cas, c'est un laser à CO_2 qui a été utilisé et que les supports irradiés peuvent être de l'acier inoxydable ou de vespel.[19, 20] Une étude impliquant des analyses LDI comparatives de la Gramicidine S, dont les résultats sont reportés dans la Figure 1.10 et la Figure 1.11, a conduit à proposer les meilleures conditions d'obtention d'un spectre de LDI.[21] Le choix de l'or comme surface à irradier, semble améliorer la qualité de la détection (voir Figure 1.10). Une irradiance suffisante doit être atteinte afin d'initier le processus de désorption/ionisation (~10^8 W.cm^{-2}). Dans le cas de l'utilisation d'un film fin d'or, la présence de cations ajoutés sous forme de sel, n'est pas nécessaire à l'obtention du spectre de masse LDI sur or. Enfin, mentionnons que l'utilisation d'une molécule telle que la Rhodamine S, connue pour sa photostabilité et sa forte absorption à 530 nm, ne permet pas d'améliorer la détection de la Gramicidine S. Ainsi, l'utilisation de cette molécule comme intermédiaire dans la désorption/ionisation laser de la protéine analysée, c'est-à-dire comme matrice, n'apparaît pas utile dans la méthode de LDI sur or ; notamment parce c'est un modèle thermique qui caractérise le processus de désorption ionisation laser à partir d'une surface moléculaire.[16, 19, 23]

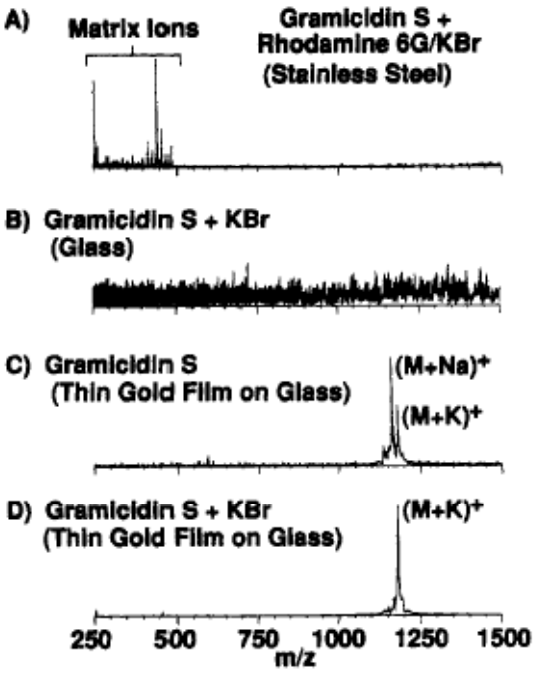


Figure 1.10 : Spectres de masse par désorption/ionisation laser de différentes solutions méthanoliques de Gramicidine S déposées sur une surface A) d'acier inoxydable, B) de verre, C) et D) recouverte d'un film d'or de 10 nm d'épaisseur.

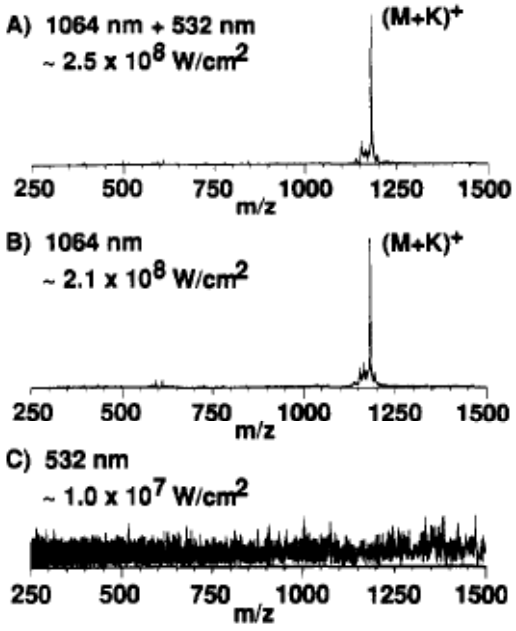


Figure 1.11 : Spectres de masse par désorption/ionisation laser du dépôt sur or d'une solution de Gramicidine S et de KBr dans le méthanol à différentes irradiances et longueurs d'onde du laser.

Enfin, mentionnons qu'à côté de ce mécanisme thermique, il ne faut pas perdre de vue que dans le cas de la présence d'une molécule absorbant à la longueur d'onde du laser, le cas de l'intervention d'un processus proprement dit de désorption, n'est pas à exclure. L'absorption de photons UV par des molécules adsorbées conduit au peuplement d'états électroniques excités de l'entité métal/adsorbat : $(M/A) \xrightarrow{h\nu} (M/A)^*$. Ces états peuvent être liants (M/A)*, antiliants (M+A)* ou ionisés $M^- + A^+$.

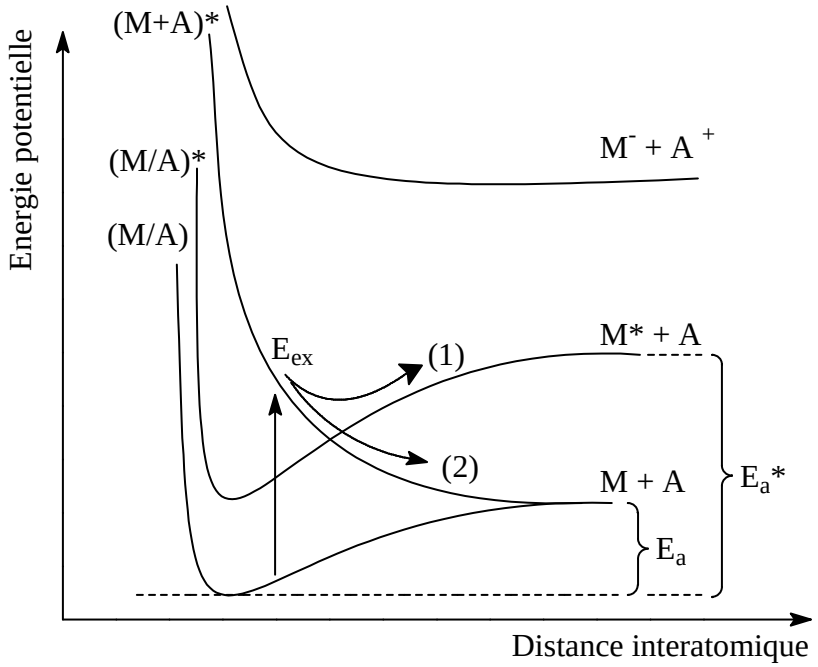


Figure 1.12 : Diagramme d'évolution d'énergie potentielle en fonction de la distance interatomique d'un simple oscillateur considéré comme représentatif du phénomène de désorption d'un adsorbat A à partir d'une surface métallique M via la formation de différents états excités.

A partir des courbes d'énergie potentielle de la Figure 1.12, il apparaît que si l'état antiliant (M+A)* est atteint lors de l'absorption d'une énergie E_{ex}, il doit y avoir apparition d'un champ de répulsion monotone qui conduit l'adsorbat à quitter la surface *via* le chemin (1) avec une énergie cinétique $E_{kin} = E_{ex} - E_a$. Par contre, si au travers d'un croisement intersystème, l'état antiliant (M+A)* peut se convertir en état électronique excité liant (M/A)*, la désorption de la molécule A de la surface sera retardée. Elle nécessitera un processus multiphotonique d'énergie supérieure à E_{ex} pour atteindre l'énergie de dissociation de la liaison métal-adsorbat liée à l'état excité correspondant. Ce mécanisme non-thermique est cohérent avec la détermination de distributions de vitesses fortement orientées perpendiculairement à la surface irradiée.[24] C'est peut être la prise en compte de ce mécanisme qui permet d'interpréter le fait que lors de l'irradiation de surfaces recouvertes par des monocouches auto assemblées absorbant à la longueur d'onde du laser, aucun ion provenant de l'espèce moléculaire chimi ou physi-sorbée n'est observé sur le spectre de masse. Ce comportement attribuable à des surfaces moléculaires, et non plus métalliques, a permis de développer de nouvelles méthodes de désorption ionisation laser de composés déposés directement sur ces SAMs (pour Self Assembled Monolayers). Dans ce cas, en fonction de la nature chimique et de l'organisation de la monocouche, elle devrait *a priori* constituer un milieu d'absorption du rayonnement laser, de conversion de l'énergie photonique en énergie de vaporisation/désorption et

de diffusion de l'énergie thermique accumulée par la surface. Ces processus seraient compétitifs vis-à-vis d'un mécanisme de rupture de la liaison S-Au du précurseur moléculaire de la monocouche. Les premiers résultats obtenus à partir de l'analyse LDI sur SAMs de différents types de composés, ont été proposés dans la littérature. Il s'agit de la méthode DIAMS (pour Desorption/Ionization on self-Assembled Monolayer Surfaces).[25] Ces travaux confirment qu'aucun ion caractéristique de la désorption de la monocouche n'est visible sur les spectres de masse. La Figure 1.13 A montre que le spectre de masse en mode d'ions positifs, est libre de signal entre la zone des pics des ions Na^+ (*m/z* 23) et K^+ (*m/z* 39) et la zone des adduits cationiques $[M+Na]^+$ et $[M+K]^+$ du PEG. Dans le cas de la Figure 1.13 B, le spectre DIAMS en mode négatif, ne conduit ni à l'observation d'ions caractéristiques du précurseur moléculaire désorbé de la SAM (*m/z* 415) ni à celle de l'anion Au (*m/z* 197). On notera que d'autres travaux concernant l'utilisation en UV/LDI de monocouches constituées de molécules de matrice pour la détection de peptides, de protéines et d'oligonucléotides, n'ont pas permis d'obtenir des spectres de masse libres d'ions de la monocouche.[26, 27]

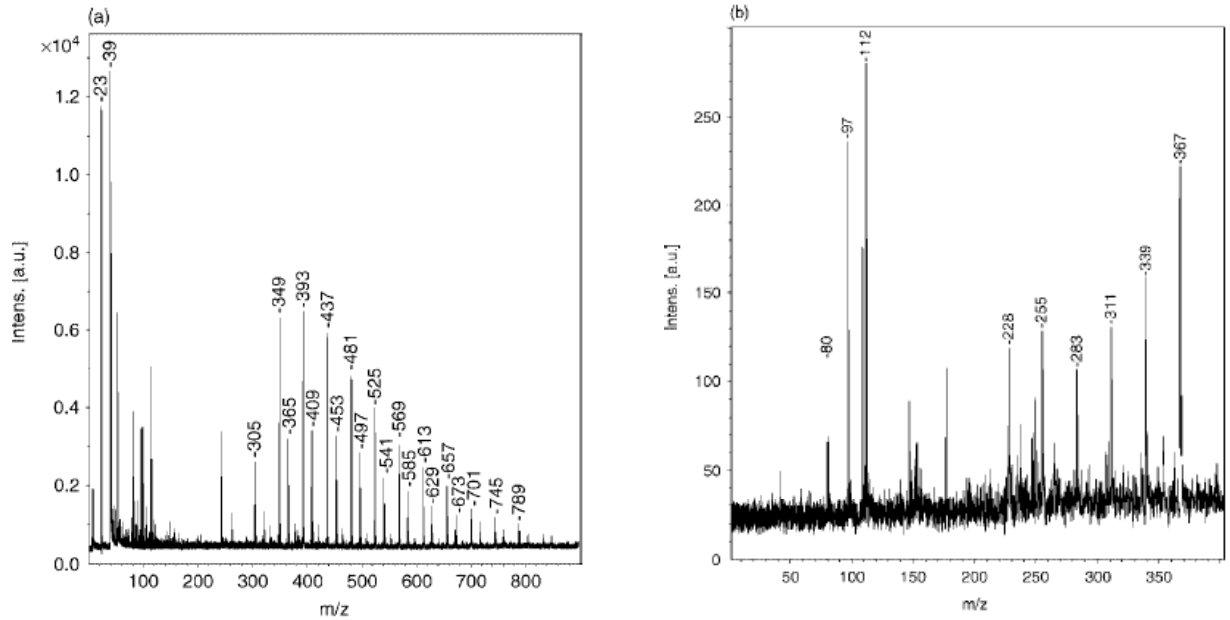


Figure 1.13 : A) Spectre DIAMS en mode positif d'un mélange de polyéthylèneglycol (PEG) ayant des masses nominales centrées autour de 400 et 600 g.mol^{-1}. B) Spectre DIAMS en mode négatif d'un mélange d'acides gras composé d'acide tétradécanoïque (m/z 227), d'acide héxadécanoïque (m/z 255), d'acide octadécanoïque (m/z 283), d'acide eicosanoïque (m/z 311), d'acide docosanoïque (m/z 339) et d'acide tétracosanoïque (m/z 367).

2.3 La désorption ionisation laser à partir d'une interface molécule cristallisée/vide

L'irradiation d'une surface recouverte de molécules cristallisées absorbant à la longueur d'onde du laser est la situation typique de la méthode MALDI (pour Matrix Assisted Laser

Desorption/Ionization). C'est en déposant sur une cible irradiée un mélange d'analytes de haut poids moléculaires et de petites molécules organiques aromatiques absorbant à la longueur d'onde du laser utilisé que Karas et Hillenkamp d'un côté et Tanaka de l'autre, ont développé une méthode capable de désorber et de ioniser dans des conditions douces, des composés thermolabiles tels que des protéines.[28, 29] La méthode MALDI est maintenant très largement utilisée en analyse chimique ou biologique. Son principe de fonctionnement peut être résumé selon l'illustration de la Figure 1.14. La substance à étudier est déposée par évaporation d'une goutte de solution contenant l'échantillon sur une surface métallique, appelée la cible. Cette cible est prévue pour être utilisée dans le bloc source de l'appareil. Elle est introduite par un sas qui permet de faire la transition entre la pression atmosphérique extérieure et le vide secondaire de l'appareil. Sous l'effet de l'irradiation, les substances situées sur la surface sont transférées en phase gazeuse et les ions formés sont ensuite séparés en fonction de leur rapport *m/z* par un analyseur. Historiquement, ce type de source est couplé à un analyseur à temps de vol qui est parfaitement adapté à la nature pulsée de ce type d'ionisation.

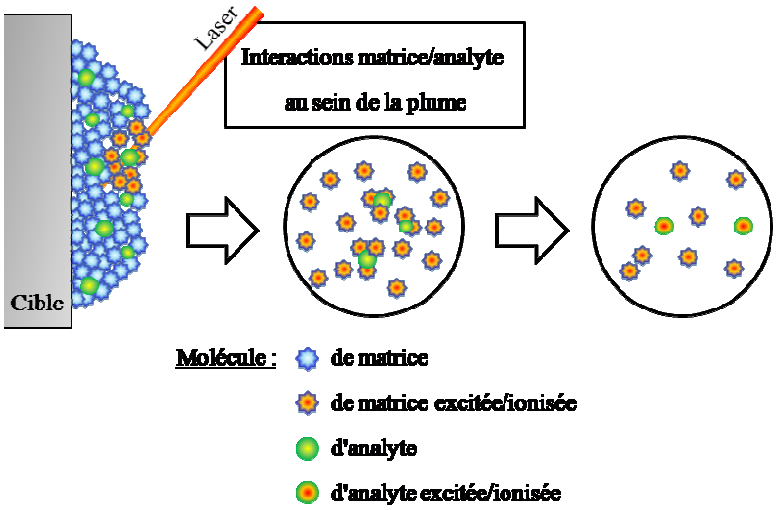


Figure 1.14 : Les différentes étapes de la désorption/ionisation laser assistée par matrice.

L'utilisation très répandue de la spectrométrie de masse par désorption/ionisation laser assistée par matrice conduit d'abord à présenter les caractéristiques les plus communément adoptées pour l'obtention d'un spectre de masse MALDI. Ensuite, pour décrire plus précisément l'ensemble des processus conduisant à la formation d'ions gazeux, à partir du dépôt cristallisé et irradié, il faut considérer d'un côté, une phénoménologie qualifiée "d'ablation/désorption" et de l'autre des tentatives de description de l'évolution de la matrice expulsée sous forme de clusters ou de nuage moléculaire au sein de la plume en expansion dans le vide. Dans le premier cas on pourra insister sur l'expulsion d'ions préformés en phase solide et dans le deuxième cas, il sera plus judicieux de

prendre en compte l'occurrence de phénomènes d'ionisation en phase gazeuse. Mais, il faut garder à l'esprit que cette description mécanistique de la méthode MALDI ne peut être réalisée sans prendre en compte l'état de la surface. Il est donc intéressant de mentionner également le lien qui peut exister entre l'allure des spectres de masse obtenus et les conditions de préparation de l'ensemble matrice/échantillon déposé et cristallisé sur la cible.

2.3.1 Caractéristiques générales d'une méthode MALDI

La mise en œuvre d'une analyse MALDI/MS est liée de façon générale, à des caractéristiques du rayonnement laser telles que celles regroupées dans le Tableau 1.2. L'utilisation de molécules de faibles poids moléculaires devant absorber à la longueur du laser et contribuer à la formation d'ions gazeux étant inhérente à la technique MALDI, un tableau regroupant les principales matrices utilisables en MALDI est présenté (voir Tableau 1.3).

Paramètres	Valeurs typiques*
Longueur d'onde du laser, λ	266 nm, 337 nm, 355 nm
Profondeur de pénétration dans l'échantillon, δ	50 – 200 nm
Energie des photons, E_v	4,71 eV (266 nm) ; 3,72 eV (337 nm) ; 3,53 eV (355 nm)
Durée du pulse laser, τ	0,5 à 10 ns
Diamètre du spot laser sur la surface de l'échantillon *D*	50 – 200 µm
Energie par pulse laser, *E*	1 à 10 µJ
Puissance d'un tir laser moyennée sur toute la durée du pulse P_{avg}	10^2 à 5.10^3 W
Fluence du laser (énergie par pulse laser et unité d'aire), *H*	30 à 600 J.m^{-2}
Irradiance du laser (fluence sur la durée du pulse), *I*	10^6 à 5.10^7 W.cm^{-2}

Tableau 1.2 : Principaux paramètres, gammes d'utilisation et valeurs les plus représentatives du rayonnement laser utilisé en analyse UV-MALDI pour les matrices les plus communes et un diamètre du spot laser de 100 µm.

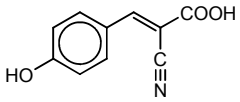
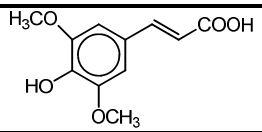
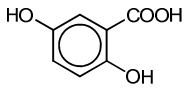
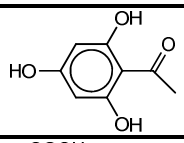
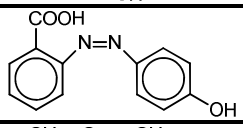
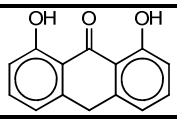
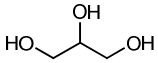
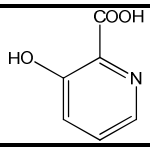
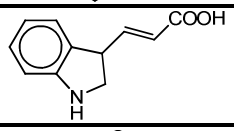
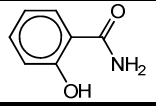
Matrices	Application	Structure	Mw (u)
HCCA Acide α-cyano-4-hydroxy cinnamique	Peptides/Protéines		189.04
SA Acide sinapinique	Peptides/Protéines		224.07
DHB Acide 2,5-dihydroxy benzoique	Peptides/Protéines Polymères synthétiques polaires Hydrates de carbone		154.03
THAP 2,4,6-trihydroxy acétophénone	Oligonucléotides		168.04
HABA Acide 2-(4-hydroxy phénylazo)benzoïque	Peptides/Protéines Polymères synthétiques polaires ou non.		242.07
DTH Dithranol	Polymères synthétiques non polaires et lipides		226.06
Glycérol 1,2,3-Propanetriol	Peptides/Protéines (matrice liquide)		92.05
3-HPA Acide 3-hydroxypicolinique	Oligonucléotides		139.11
IAA Acide trans-3-indoleacrylique	Polymères synthétiques non polaires		187.06
Salicylamide (2-Hydroxybenzamide)	Oligonucléotides		137.05

Tableau 1.3 : Liste des matrices les plus utilisées pour la technique MALDI et leurs domaines d'application

2.3.2 La préparation de la cible en MALDI

Lors de la préparation de la surface destinée à être irradiée, l'analyte doit être incorporé à l'intérieur des cristaux de matrices. Il est soit à l'état neutre soit à l'état chargé sous forme de molécule protonée ou cationisée, pour ce qui concerne le mode d'ions positifs. Notons que celui-ci est presque exclusivement pris en exemple dans le contexte de la présente description. Celle-ci va d'abord considérer l'analyse de composés présentant des sites protonables, comme les peptides ou les protéines. Durant l'étape de recristallisation de la matrice, le composé se réparti entre la phase constituée du cristal en court de croissance et le cœur de la solution. La tendance de ce composé à se répartir entre le cristal et la solution serait à rapprocher de ses capacités de répartitions entre la

phase stationnaire et la phase mobile que l'on pourrait évoquer dans le cas de chromatographies liquides en phase inverse.[30] C'est cette analogie qui a permis d'interpréter l'influence des conditions de préparation de la cible MALDI sur les discriminations d'ions lors de l'analyse de mélanges de peptides et de protéines.[31] Si, pour des mélanges de peptides, on choisit des conditions d'évaporation de la solution extrêmement lentes (8 à 12 heures), l'absence d'ions de faible masse sur les spectres de masse MALDI peut s'interpréter comme la résultante d'une interaction plus forte des peptides de haute masse et généralement plus hydrophobes, avec la phase cristalline stationnaire. Inversement, dans le cas d'une évaporation sous vide, c'est-à-dire très rapide (12 s), l'équilibre de répartition entre phase stationnaire et phase mobile ne peut être atteint au cours de la cristallisation, ainsi, aussi bien les peptides de basse masse que ceux de haute masse se retrouvent piégés dans la matrice cristallisée. Les spectres de masse obtenus dans ces conditions ont plutôt tendance à favoriser les peptides de basse masse, ce qui est certainement dû à une plus grande sensibilité du maldi pour les espèces de basse masse. L'analogie entre séparation chromatographique et effet de discrimination en MALDI est confirmée puisque ce dernier est augmenté lorsque l'on substitue l'acide formique par l'acide trifluoroacétique (TFA) lors de l'étape de préparation de l'échantillon. Le TFA est connu pour conduire à de meilleurs profils de séparation de mélanges de peptides en chromatographie liquide, parce qu'il conduit à la formation de paires d'ions plus stables. Dans les conditions de préparation de cible généralement adoptées, comme dans le cas de la goutte séchée, par exemple, il faut ajouter à cet équilibre entre phase stationnaire et phase mobile, un effet de solubilisation des peptides et protéines qui diminue avec l'évaporation du solvant organique ajouté (acétonitrile, méthanol, isopropanol). Les gros polypeptides sont supposés être moins solubles dans l'eau pure que les petits et il apparaît nécessaire de maintenir un pH relativement acide pour éviter l'apparition de phénomènes de précipitation avant la cocristallisation. On note également que plus le pH de la solution est faible, plus la réponse des peptides de haut poids moléculaires est favorisée.

De façon analogue, l'influence des méthodes de préparation de la cible sur l'intensité des adduits de cations alcalino-terreux (Na^+, K^+…) observés en MALDI a aussi été étudiée. Dans ce cas, il apparaît que pour certaines des matrices les plus utilisées, le choix de la méthode de la goutte séchée, tend à favoriser les processus d'échange de protons et de cations avec la solution durant la phase d'évaporation/cristallisation. La formation de sels entre les molécules de matrice déprotonées en solution et des cations, limite considérablement la disponibilité de ces cations lors du processus d'attachement cationique en phase gazeuse qui se produit ensuite dans la plume du laser.[32]

2.3.3 Le processus d'ablation/ionisation laser en MALDI

En MALDI, le rayonnement interagit avec des molécules de matrice cristallisées dont les spectres d'absorption en phase solide ont un profil moins résolu qu'en solution.[33] Ce qui permet d'envisager une absorption maximum du support dans une large gamme de longueurs d'onde. Lors de l'impact du laser, la diversité et la complexité des phénomènes qui interviennent dans le processus d'ablation/désorption à différentes échelles de temps et de distance depuis l'impact, rendent difficile une description détaillée de cette étape. La liste des évènements impliqués peut être en effet résumée en mentionnant :

- Des excitations élémentaires primaires des états optiquement actifs du réseau cristallin,
- Une thermalisation de l'énergie laser déposée,
- Le développement de zones à hautes températures et fortes pressions avec le développement d'états de haute énergie,
- L'apparition d'évènements de désintégrations explosives conduisant à des éjections extemporanées de gros volumes de matière à l'avant de la surface.

Une approche globale du processus peut être envisageable si on fait référence aux études expérimentales et aux résultats des calculs théoriques reportés dans la littérature. [34, 35] Dans tous les cas, c'est l'influence des paramètres du laser qui est testée, que ce soit sur l'intensité des ions observés sur les spectres de masse MALDI ou sur les résultats des simulations par dynamiques moléculaires et analyses numériques de modèles cinétiques.

D'un point de vue expérimental, les auteurs des études considèrent généralement que les seuils de fluence qui permettent d'observer les ions sur les spectres de masses sont sensiblement les mêmes pour la matrice et l'analyte (~ 50 $J.m^{-2}$), ce dernier ne devant pas être en trop forte concentration dans le dépôt cocristallisé.[36, 37] Dans la gamme de fluence n'excédant pas l'utilisation conventionnelle du MALDI, c'est à dire de 50 à quelques centaines de $J.m^{-2}$, l'intensité des ions sur le spectre de masse, augmente avec l'énergie. Au-delà, la fragmentation des ions émis conduit à une saturation de l'augmentation du signal en fonction de la fluence H.[36] Dans des conditions usuelles l'énergie déposée aux alentours de la surface est ainsi estimée à une centaine de $kJ.mol^{-1}$. Ce qui est compatible avec l'apparition de phénomènes combinés de fusion et de vaporisation du matériau impliqué. Le groupe de Vertes s'est ainsi beaucoup attaché à décrire le processus de désorption avec une composante thermique prédominante. Cette description a été accompagnée d'une modélisation hydrodynamique.[11, 13] C'est un modèle qui prend en compte un grand nombre de paramètres de l'interaction rayonnement matière (longueur d'onde du laser, irradiance, coefficients d'absorption, seuils de volatilisation…) et permet d'estimer l'effet du tir laser sur la surface. Il présente l'avantage de pouvoir appréhender divers profils tels que l'évolution pour différents délais après le pulse, de la

densité de matière et de la température à partir de la surface (Figure 1.15 : a et b). Il donne aussi accès à des grandeurs mesurables, telles que la profondeur du cratère formé et la distance d'expansion du nuage en fonction du type de laser et de l'intensité utilisée (Figure 1.15 : c, d).[12, 13]

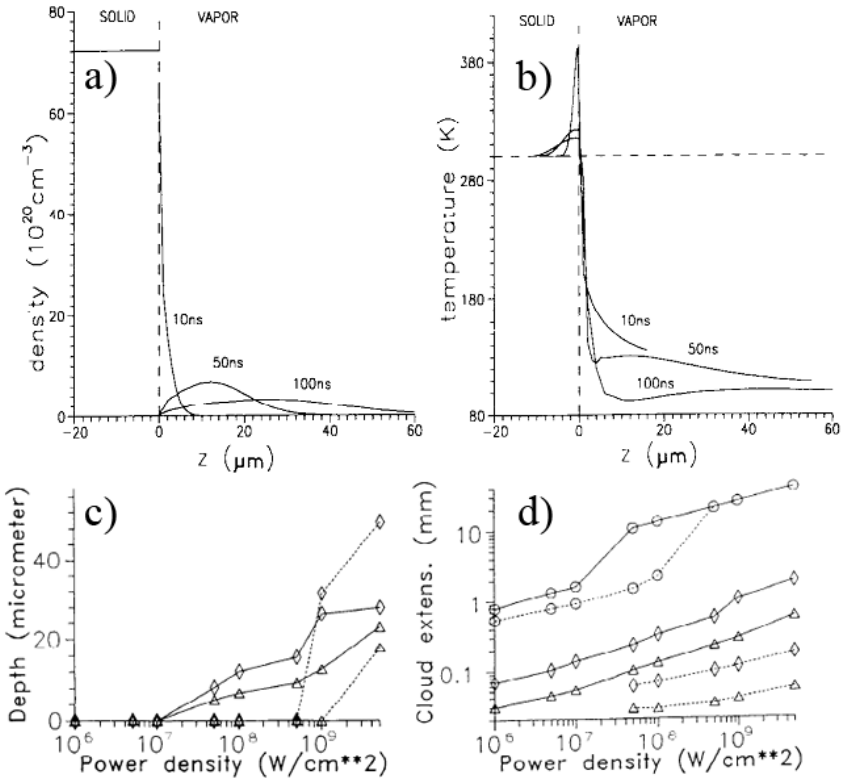


Figure 1.15 : Diagrammes représentant les effets d'un tir de laser Nd:YAG (10^7 W/cm^2) de 10 ns sur une interface acide nicotinique cristallisée/vide en termes de distributions spatiales de la température a) et de la densité d'ions b) sur la surface en fonction de différents délais après l'irradiation (10 ns, 50 ns et 100 ns). La position de la surface est représentée par la ligne pointillée verticale.[38] Courbes représentant l'évolution de la profondeur du cratère après le tir laser c) et de l'expansion de la plume d) en fonction de l'irradiance laser pour un ion m/z 24 et pour différents types de lasers (◊ : rubis, △ : Nd:YAG, ○ : CO_2) et différents échantillons (… transparent, _ opaque).[12]

Si on se réfère à un laser de type Nd:Yag qui est la source de rayonnement commune au sein de la Figure 1.15, il apparaît que la quantité de matière ablatée et la distance d'expansion du nuage créé va dépendre de la valeur de l'irradiance et de la capacité d'absorption du dépôt cristallin. Dans ce dernier cas, on retrouve le comportement mis en évidence dans le cas de l'irradiation des surfaces métalliques ou moléculaires décrits précédemment. Avec ce modèle, la température de la phase solide semble atteindre très rapidement ~400 K. Le phénomène de refroidissement (température < 180 K) se produit très tôt, dès le début de l'expansion de la plume (10 ns) et dans un nuage

suffisamment dense pour conduire à des refroidissements par collisions avant 100 ns. C'est la durée à partir de laquelle la température n'évolue plus du fait de la raréfaction de matière. On se retrouve confronté ainsi à deux phénomènes, l'un, lié à de l'ablation thermiquement induite et l'autre, se rapprochant de l'expulsion de matière par un régime de confinement de stress.[39, 40] Cependant, une des conclusions majeures de cette étude est que les températures calculées grâce à la modélisation hydrodynamique ne sont pas suffisantes pour que l'ionisation thermique soit considérée comme un mécanisme de production adéquat des ions gazeux en MALDI.[38] Ceci a été corrélé par des expériences de post ionisation qui montrèrent qu'un grand nombre de neutres est expulsé lors du processus d'ablation/désorption.[41] Le processus de désorption laser peut être alors compris comme une superposition de deux phénomènes. Le premier serait une transition de phase conduisant à une sublimation de molécules neutres, phénomène qui serait préféré à une succession d'étapes de fusion et de vaporisation de la matrice cristallisée. Le deuxième impliquerait davantage une étape d'ablation de gros volume de matière en profondeur due à une phase d'explosion qui engendrerait l'expulsion de clusters et même littéralement de morceaux de matière dans le nuage en expansion. Le rôle des réactions chimiques et des processus physiques se produisant dans cette plume est donc primordial pour appréhender les mécanismes de formation des ions observés sur les spectres de masse MALDI.

De leurs côtés, les résultats des simulations ont mis en évidence que pour des conditions caractéristiques du MALDI, il est possible de considérer des processus de désorption et d'ionisation purement thermiques. Les effets mécaniques conduisant à l'éjection de matériel sont davantage liés à des très courtes durées d'impulsion laser (~10 ps) ou à des irradiances élevées (> 10^{11} W.cm^{-2}).[42] La désorption thermique qui peut intervenir dans des régimes de faible fluence est une source d'éjection de molécules ou d'ions à l'état moléculaire.[36] La conversion de l'énergie laser absorbée peut ainsi conduire à une augmentation de la température de la surface pouvant atteindre 500 à 750 *K* à une fluence comprise entre 5 et 15 J.m^{-2}.[39, 43] Il s'agit ici de températures caractéristiques d'un mécanisme de sublimation depuis l'état solide. Par contre, quand les fluences laser augmentent, des phénomènes de fusion et d'évaporation se substituent alors à la sublimation. A partir de valeurs de fluence supérieures à 30 J.m^{-2}, c'est alors un ensemble de phénomènes allant de l'éjection de molécules à l'ablation de volumes significatifs de surface, qui prennent place. La profondeur de l'ablation dépend ainsi de l'énergie laser déposée. [44, 45]

In fine, l'émission qui résulte de cette étape d'ablation/désorption est suivie immédiatement de processus intenses dans la plume formée. Parmi ceux-ci citons :

- La recondensation ou la redéposition des particules éjectées que l'on peut comparer à des phénomènes observés lors de dépositions lasers pulsées,[46]

- La propagation d'une onde de pression prenant naissance au cœur du volume de matière de la cible et s'éloignant de la région d'ablation par propagation à travers la plume.[40, 47]

2.3.4 Rôle des processus de plume en MALDI

Dans la hiérarchie des phénomènes mis en œuvre dans l'ionisation MALDI, les processus gazeux liés à la plume créée, constituent la dernière étape conduisant à la formation des ions observés sur les spectres de masse.[48] Cette étape doit être appréhendée non seulement au travers des phénomènes chimiques liés aux mécanismes de production des ions et de leur réactivité, mais aussi selon les processus physiques d'ablation/désorption et d'expansion d'un jet de gaz dans le vide. Après l'irradiation de la surface cristalline, on peut d'abord considérer une voie d'ionisation primaire de la matrice, puis des réactions ions molécules dans la plume, conduisant aux ions de l'analyte observés sur le spectre de masse. Cette deuxième voie est une ionisation secondaire mettant en jeu des clusters comportant des entités neutres (molécules et radicaux) et ioniques (radicaux cations et cations) provenant de la matrice avec des inclusions d'analytes moléculaires et/ou ioniques. En fait, ces deux voies sont souvent liées, car pour un pulse laser d'une durée typique de 3 à 5 ns, capable de libérer des ions préformés ou de générer des ions photochimiquement induits à partir d'états excités, l'expansion de la plume jusqu'à une densité libre de collision, peut durer jusqu'à plusieurs nanosecondes. Dans ces conditions, les différentes simulations ont montré que la densité reste de l'ordre d'au moins 10 % de celle de la phase solide irradiée avec un taux important de neutres par rapport aux ions,[49] c'est à dire de 10^4 à 10^7 pour 1.[50, 51] Il est donc possible d'envisager un mécanisme de formation des ions d'intérêts non seulement à partir de la réactivité des clusters matrice/analyte formés, mais aussi selon l'intervention de réactions ion-molécule en phase gazeuse. De plus, si on prend en compte une température du nuage de 500 K et un faible parcourt moyen des molécules et des ions, alors, on peut envisager une grande vitesse de collision puisque la vitesse de la plume a été calculée comme étant de l'ordre de 500 à 1000 $m.s^{-1}$. L'effet d'entrainement par jet moléculaire et l'influence de la vitesse initiale des ions en fonction de la matrice peut être aussi un paramètre à prendre en compte.

2.3.4.1 L'ionisation primaire

D'après les valeurs typiques des paramètres lasers utilisés en MALDI (voir Tableau 1.2) et les caractéristiques physico-chimiques d'une des matrices les plus étudiées, la DHB (voir Tableau 1.4), l'ionisation primaire doit être appréhendée selon un processus impliquant plusieurs molécules de matrice au sein de la plume en expansion. Les interactions peuvent être intermoléculaires si on considère des collisions d'espèces excitées au sein du nuage gazeux dense. Elles sont intramoléculaires, si on prend en compte la réactivité d'un agrégat de matrices éjecté en phase gaz. En fait, pour un processus d'absorption à deux photons, plus probable que l'intervention d'un

mécanisme à trois photons,[52] l'énergie des photons ne permet pas une ionisation directe d'une molécule de matrice libre. Il est préférable d'envisager un processus de mise en commun d'énergie, appelé "energy pooling", grâce à l'interaction entre deux états excités S_1 conduisant au peuplement d'un état excité supérieur S_n, puis à la formation d'un état ionisé par interconversion de cet état S_n avec une autre molécule dans un premier état excité S_1. L'ensemble des paramètres énergétiques reportés dans le Tableau 1.4, confirme l'adéquation entre les valeurs énergétiques obtenues à partir des données de la littérature et les processus envisagés. On notera également que dans le cas de l'ionisation d'une entité à l'intérieur d'un agrégat, l'énergie nécessaire à la production du radical cation au sein du cluster semble diminuer fortement avec la taille de celui-ci. Que ce soit au sein du cluster ou dans le contexte de collisions dans une plume dense, il est alors tout à fait envisageable de concevoir la formation d'une molécule d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque protonée par l'intermédiaire d'une réaction ion/molécule entre le radical cation et une molécule tel que décrit dans le Schéma 1.1.

$$DHB^{+\cdot} \rightarrow [DHB\text{-}H]^{\cdot} + H^{+} \qquad \Delta_r G(1) = + 8{,}90 \text{ eV}$$

$$DHB + H^{+} \rightarrow [DHB+H]^{+} \qquad \Delta_r G(2) = - 8{,}53 \text{ eV}$$

$$DHB^{+\cdot} + DHB \rightarrow [DHB\text{-}H]^{\cdot} + [DHB+H]^{+} \qquad \Delta_r G(3) = + 0{,}37 \text{ eV}$$

Schéma 1.1 : Schéma réactionnel et valeurs thermochimiques associées dans le cas de la formation d'une molécule protonée de DHB à partir du radical cation

Paramètres	Processus	Valeurs	Référence
Potentiel d'ionisation d'une molécule libre (IP_1)	$DHB \rightarrow DHB^{+\cdot} + e^-$	8,05 eV	[53]
Potentiel d'ionisation des clusters (IP_n)	$(DHB)_n \rightarrow (DHB)_n^{+\cdot} + e^-$ (n = 10)	7,82 eV	[52, 54]
Différence d'énergie entre le premier état excité S_1 et l'état fondamental S_0	$S_0 \rightarrow S_1$	3,466 eV	[53]
Constante de vitesse de mise en commun d'énergie entre deux premiers états excités S_1	$S_1 + S_1 \rightarrow S_{n+} S_0$	7.10^9 s^{-1}	[55]
Constante de vitesse de mise en commun d'énergie entre un premier état excité S_1et un état excité supérieur S_n.	$S_1 + S_n \rightarrow Ions_+ S_0$	1.10^{11} s^{-1}	[55]
Température de sublimation d'une molécule	$DHB_{Solide} \rightarrow DHB_{gaz}$	450 K	
Température de fusion d'une molécule (à 1 atm)	$DHB_{Solide} \rightarrow DHB_{liquide}$	478 K	
Energie de réaction de dismutation	$2DHB \rightarrow [DHB\text{-}H]^- + [DHB+H]^+$	5,24 eV	
Basicité en phase gazeuse de l'anion	$DHB \rightarrow [DHB\text{-}H]^- + H^+$	13,8 eV	
Basicité en phase gazeuse de la molécule	$[DHB+H]^+ \rightarrow DHB + H^+$	8,54 eV	[56]
Basicité en phase gazeuse du radical	$DHB^{+\cdot} \rightarrow DHB^{\cdot} + H^+$	8,90 eV	[56]
Energie de dissociation d'un sel de sodium	$[(DHB\text{-}H)^-Na^+] \rightarrow [DHB\text{-}H]^- + Na^+$	6,2 eV	[57]
Affinité cationique de la molécule	$[DHB+Na]^+ \rightarrow DHB + Na^+$	1.58 eV	

Tableau 1.4 : Principales caractéristiques physico-chimiques de l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque utilisé comme matrice en MALDI sous le nom de 2,5-DHB ou DHB

Au regard des valeurs reportées dans le Tableau 1.4, il apparaît que la faible endothermicité de cette réaction d'échange de proton entre une molécule neutre et le radical cation ($\Delta_r G(3)$), peut être comblée d'un côté, par les énergies de collisions dues aux vitesses initiales de matrice dans la plume en expansion et d'un autre côté, grâce à l'énergie interne de la matrice accumulée lors de la désorption. Celle-ci serait due à la différence entre la température de la plume de ~550 K et la température de sublimation de la matrice. Le gain de stabilisation de l'espèce protonée formée au sein du cluster de molécules de matrice serait également un facteur favorable.

Enfin, mentionnons qu'un processus de cationisation primaire de la matrice est également envisageable, mais celui-ci se produirait par un phénomène analogue à un attachement de cation en phase gazeuse lié à un processus thermique tel que décrit dans l'introduction du paragraphe 2.2 et dans le sous-paragraphe 2.3.2. Cependant, la cationisation primaire de la matrice est un processus à considérer attentivement, car il peut être assimilé aux modes de production des adduits cationiques d'analytes visibles sur les spectres MALDI/MS. L'ionisation primaire peut donc être utile à la production d'ions à partir de l'échantillon lorsque les ions $[M+Na]^+$ ou $[M+K]^+$, par exemple, sont recherchés. Si on prend le cas de la DHB, l'énergie de dissociation de l'espèce $[(DHB-H)^-Na^+]$ est de 6,2 eV alors que l'affinité cationique de nombreux peptides est de l'ordre de 2 à 3 eV.[57] Un tel transfert ion/molécule en phase gaz n'est pas envisageable. Pas plus d'ailleurs que l'implication d'un processus photochimique activant le transfert de cation à partir de la DHB au travers d'un état excité. En effet, lors de l'analyse MALDI d'un même échantillon de gramicidine S avec la DHB comme matrice, la formation de molécules gazeuses cationisées est favorisée par une irradiation laser de l'arrière de la cible (analogue à un processus thermique) alors que c'est l'irradiation directe de la surface cristalline qui conduit à la formation prédominante de molécules protonées.[58] C'est donc un processus purement thermique d'émission de cation alcalin qui se produit. Il est suivi par leur capture en phase gaz par des composés vaporisés qui possèdent une affinité cationique suffisante pour conserver l'adduit $[M+Na]^+$ ou $[M+K]^+$ intact. Les affinités cationiques des matrices sont faibles, c'est-à-dire de l'ordre de 150 à 170 $kJ.mol^{-1}$.[59] Ainsi, même dans le cas de l'établissement d'un équilibre entre les différentes formes ionisées de la matrice et de l'analyte, il est hautement probable de favoriser la formation d'adduits cationiques à partir d'analytes d'affinité cationique plus élevée comme dans le cas des bases nucléiques ou des polymères non protonables.[60] Ce mode de formation d'ions de l'analyte peut donc être assimilable à une capture directe des cations en phase gazeuse, il ne nécessite pas l'intervention de la matrice ionisée comme intermédiaire. Ce dernier cas est typique d'un mode d'ionisation dit secondaire qui est un des processus majeurs considérés en MALDI.

2.3.4.2 L'ionisation secondaire

En se focalisant toujours sur le mode positif, la production des ions de l'analyte par réactions ion/molécule en phase gazeuse peut être appréhendée au travers de deux types d'espèces caractéristiques produites. Il s'agit des ions à nombre impair d'électrons, comme les radicaux cations, et les ions à nombre paire d'électrons, tels que des ions quasi-moléculaires $[M+H]^+$ ou des molécules multiplement protonées.

La formation de radicaux cations est envisageable par réaction de transfert d'électron de l'analyte neutre A vers la matrice ionisée $M^{+\cdot}$ telle que : $M^{+\cdot} + A \rightarrow M + A^{+\cdot}$. Ceci peut se réaliser si le

potentiel d'ionisation de la matrice (IP_M pour Ionization Potential) est supérieur à celui de l'analyte ($IP_M > IP_A$) tel qu'illustré dans la Figure 1.16.

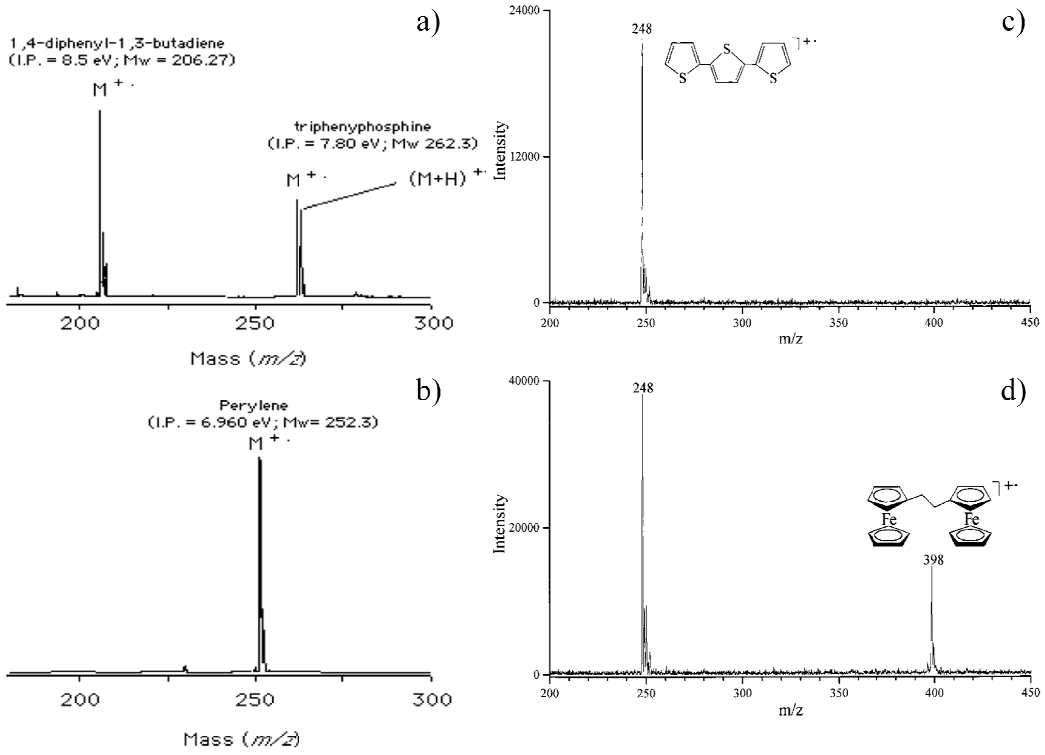


*Figure 1.16 : Spectres de Masse MALDI-TOF **a)** de triphénylphosphine (m/z 206 ; IP = 7,8 eV) obtenu en présence de 1,4-diphényl-1,3-butadiène (m/z 262 ; IP = 8,5 eV) comme matrice ; **b)** de triphénylphosphine obtenu en présence de pérylène (m/z 252 ; IP = 6,96 eV) comme matrice **c)** de terthiophène (m/z 248) seul et **d)** de 1,2-diferrocényléthane obtenu en présence de terthiophène utilisé comme matrice dans un rapport matrice/analyte = 1000/1.*[48, 61]

En mode positif, la réaction de transfert d'électron à partir de la matrice est également possible lors la présence d'adduits de cations multichargés. Si on prend le cas des ions cuivriques, c'est la réaction d'échange de charge avec la matrice M qui est observée, telle que : $Cu^{2+} + M \rightarrow Cu^{+} + M^{+\cdot}$. Le deuxième potentiel d'ionisation du cuivre $IP(Cu^{2+})$ de 20,29 eV est dans tous les cas supérieur à celui de la matrice utilisée. Par exemple, la valeur de l'IP de la DHB, qui est caractéristique des matrices aromatiques utilisées en MALDI (voir Tableau 1.4) conduit à mettre en évidence une réaction d'échange de charge très exothermique entre la matrice et les ions cuivriques avec $\Delta_r G$ = $IP(M) - IP(Cu^{2+})$ = -12,24 eV. En revanche l'état de charge +1 d'un cation monovalent sera stable en MALDI. En effet, si on se réfère toujours au cas du cuivre, la valeur du potentiel de la première ionisation de l'ion cuivreux $IP(Cu^{+})$ = 7,73 eV, peut ne pas être suffisante pour conduire à sa

neutralisation lors de la collision avec une molécule de matrice puisque $\Delta_r G(Cu^+ + DHB \rightarrow Cu + DHB^{+\cdot}) = 0.32$ eV. Une telle réaction impliquant l'ion Cu^+ seul est quand même faiblement endothermique. Différentes situations permettent de compenser cette faible exothermicité. D'un côté il faut citer l'occurrence des processus de collision dans la plume, et d'un autre côté, la présence de ligands, qui contribuent à abaisser la valeur de chaque IP par leur effet donneur d'électron. Ce qui permet d'anticiper une stabilité accrue de l'ion Cu^+ en MALDI. Cette tendance est d'ailleurs confirmée dans le cas de l'analyse d'adduits avec des cations de l'élément chrome. L'observation d'espèces organométalliques de type Cr^{3+} et Cr^{2+} n'est pas seulement favorisée par la valeur des trois IP,[62] mais elle est surtout liée à la présence de ligands volumineux dans la sphère de coordination du métal, ceux-ci limitant même la vitesse de transfert des électrons qui devraient former les cations monovalents correspondants.[63] Remarquons qu'un phénomène de capture d'électrons libres qui seraient présents dans la plume MALDI a aussi été évoqué pour rendre compte de la tendance à la neutralisation des adduits cationiques.[64] Ce processus direct peut être envisageable, mais il faut bien préciser qu'en MALDI les électrons ne peuvent jouer un rôle vis-à-vis de l'analyte que pour une épaisseur de dépôt de l'échantillon organique sur la surface métallique inférieure à 1 mm.[65] Il s'agit en fait davantage d'une émission directe à partir d'une plaque métallique polluée par un contaminant organique. Le fin dépôt de contaminant changerait la structure électronique de l'interface et diminuerait le travail d'extraction des électrons qui ne peuvent être émis directement par le métal avec l'énergie des photons lasers.[64, 66]

Pour rendre compte de la formation des ions quasi-moléculaires et des molécules multiplement protonées, plusieurs voies mécanistiques ont été proposées. Le modèle de Russel *et al*, basé sur la déconvolution des profils des signaux des adduits ioniques de l'insuline bovine observés en MALDI, prend en compte deux sources de production d'ions.[67] La première implique une formation dite "prompte". Elle serait issue de la libération extemporanée d'espèces pré-ionisées en phase condensée, lors de l'étape d'ablation/désorption. Dans le cas de la formation des molécules simplement ou multiplement protonées à partir de peptides et de protéines, cette approche apparaît être cohérente avec une description thermodynamique d'un processus à l'équilibre au sein de la plume (*vide supra*). En effet, les valeurs d'affinité protonique des matrices les plus souvent utilisées sont comprises entre 850 et 900 $kJ.mol^{-1}$, tel que résumé dans le Tableau 1.5. Or, les affinités protoniques des biomolécules de nature protéique et de leurs ions quasi-moléculaires $[M+H]^+$ sont systématiquement plus élevées. Les affinités protoniques des peptides et des protéines ont toujours été évaluées avec des valeurs supérieures à 900 $kJ.mol^{-1}$.[68-70] Les espèces protonées de la Gramicidine S et de la substance P ont conduit à des mesures de PA, respectivement de 917,6 $kJ.mol^{-1}$ et 947,5 $kJ.mol^{-1}$.[71, 72] L'autre source est dite "retardée" et serait liée à des réactions ion/molécule en phase gazeuse impliquant la matrice et le matériau en mouvement dans la plume en

expansion. Cette étape qui se réalise après un certain délai peut suggérer l'existence d'agrégats ionisés de matrice et d'analyte pour rendre compte de la formation des ions observés sur les spectres de masse MALDI. Cependant, il faut noter que dans ce cas, l'affinité protonique des structures multimériques est sensée être augmentée par rapport au monomère de matrice, étant donné l'effet de délocalisation au sein du cluster de la charge amenée par le proton.

Composé	Affinité protonique ($kcal.mol^{-1}$)	Affinité protonique ($kJ.mol^{-1}$)	Affinité protonique (eV)
HCCA	202,5	847	8,78
DHB	204	854	8,85
DTH	209	874	9,06
SA	210	879	9,11
3-HPA	214	895	9,28

Tableau 1.5 : Affinités protoniques de matrices utilisées en MALDI, d'après Zenobi et al (les structures et noms systématiques des matrices sont reportées dans le Tableau 1.3 [73]

La formation de tels clusters est aussi à la base des deux autres modèles proposés par les équipes de Karas et de Tabet. Ces deux approches ont en commun d'être basées sur une émission d'espèces ioniques solvatées en phase gazeuse. Ce qui serait, en première approximation, assimilable à un processus proposé en electrospray (ESI). Elles sont à considérer dans la mesure où même si le rapport entre les clusters et les molécules libres dans la plume MALDI est faible (de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-4})[44], celui-ci reste comparable au rapport entre les ions et les neutres formés en MALDI (de l'ordre de 10^{-4}).[74, 75]

Le modèle des "lucky survivors" considère que l'existence de biopolymères à l'état multiplement protoné est favorisée par l'environnement acide de la phase solide du dépôt MALDI.[76] Ces précurseurs multichargés sont ensuite libérés avec le volume de matrice ablatée lors de l'irradiation. Puis, l'émission d'électrons par photoionisation à partir de l'agrégat réduit l'état de charge des clusters par capture d'électrons. Cette neutralisation est plus efficace pour les clusters à haut état de charges, réduisant ainsi la proportion d'ions multichargés observés sur les spectres MALDI par rapport aux spectres ESI. La capture d'électrons favoriserait d'un côté, les dissociations promptes des clusters conduisant à l'observation des ions désolvatés. D'un autre côté, les fragmentations métastables, moins rapides, participeraient au bruit de fond des spectres de masse MALDI. A l'image de ce qui a été décrit plus haut concernant le mécanisme des réactions de neutralisation de cations métalliques en MALDI, l'émission d'électrons ne proviendrait pas de la surface irradiée. Elle serait plutôt à mettre en relation avec l'abaissement du potentiel d'ionisation d'un multimère de matrice par rapport à celui d'une molécule seule en phase gaz (voir le cas de la DHB dans le Tableau 1.4). Il faut d'ailleurs noter que l'introduction d'une espèce riche en électrons (comme une

base) au sein de l'édifice non-covalent, contribue aussi à diminuer le potentiel d'ionisation du cluster matrice/analyte. Il a été par exemple montré qu'un complexe de DHB avec quatre molécules avait un potentiel d'ionisation de l'ordre de 7 eV, ce qui est encore très inférieur à celui de la DHB seule, reporté dans le Tableau 1.4, ou à ceux des états multimériques.[77]

Dans le modèle proposé par l'équipe de Tabet, la taille et la réactivité des agrégats émis dans la plume dépendent de la nature de la matrice.[78, 79] Ce modèle a pour but de rendre compte de la différence observée entre des spectres de masse d'une même protéine obtenus avec des matrices de basicités différentes. D'après les spectres de masse MALDI-TOF obtenus à partir de l'apomyoglobine et reportés dans la Figure 1.17, les matrices les plus basiques conduisent à obtenir une meilleure résolution des spectres de masse de protéines et à observer moins d'états de charge que dans le cas de l'utilisation d'une matrice de faible affinité protonique.

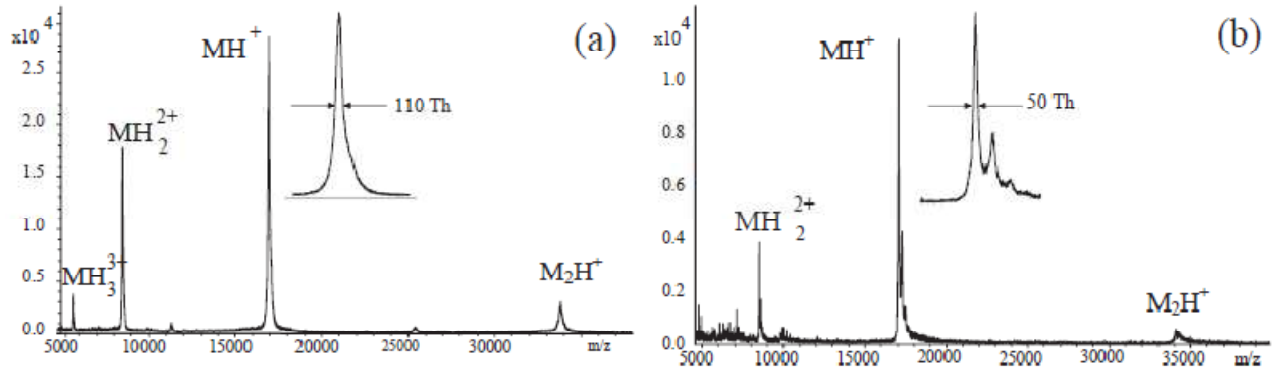


Figure 1.17 : Spectres de masse MALDI de l'apomyoglobine (MW = 16952 u) obtenus pour une même irradiance laser avec A) l'HCCA et B) la SA comme matrice.

Les matrices de plus forte PA comme la SA formeraient des agrégats plus petits et moins stables que dans le cas de l'utilisation de l'HCCA (Tableau 1.5). Les clusters SA/protéines subiraient des dissociations "promptes" dans la source et conduiraient à la libération rapide des ions désolvatés avant la fin du délai d'extraction. Ce qui permettrait d'obtenir des spectres mieux résolus que dans le cas de l'utilisation de l'HCCA (voir Figure 1.17). Pour cette matrice, les clusters qui sont plus gros et plus stables, induiraient des fragmentations métastables affectant la résolution des pics observés sur les spectres. L'observation d'ions multichargés plus abondants dans le cas de l'HCCA serait à interpréter au travers du modèle d'énergie potentielle à double puits proposé par Brauman *et al* pour décrire les aspects thermocinétiques d'une réaction bimoléculaire en phase gazeuse.[80] Cette approche applicable aux réactions de protonation en spectrométrie de masse,[81] peut être appliquée au modèle d'un hétérodimère protoné matrice/analyte tel que décrit dans Schéma 1.2. Elle permet d'apporter une interprétation concernant l'observation préférentielle d'espèces multichargées AH_2^{2+} lors de l'utilisation de conditions de désolvatation endothermique douces (faible fluence).

$$AH^+ + mH^+ \longleftarrow \left(AH^+, mH^+\right) \rightleftharpoons \left(AH_2^{2+}, m\right) \longrightarrow AH_2^{2+} + m$$

Schéma 1.2 : Description d'une réaction bimoléculaire d'échange de proton entre deux états initiaux (AH^+,mH^+) et ($AH_2{}^{2+}$,m) où A est l'analyte et m la matrice, conduisant à la formation d'espèces simplement chargées AH^+ ou doublement chargées AH^{2+}.

Si la séparation des charges produisant les ions monochargés AH^+ et mH^+ est une voie réactionnelle dont l'énergie d'activation est supérieure à celle qui permet d'obtenir l'espèce dichargée, une faible énergie interne de l'agrégat protoné matrice/analyte favorisera la voie d'obtention de produits $AH_2{}^{2+}$ et m. Par contre, dans des conditions dites "dures", on peut considérer un processus à l'équilibre seulement au travers de la réaction liée au transfert d'un proton dans l'hétérodimer. Dans ce cas, plus la basicité de la matrice (m) sera importante plus la formation des espèces simplement chargées sera énergétiquement favorisée. En fait, il faut bien prendre en compte que le phénomène déterminant dans le modèle de Brauman est le passage de la barrière centrale. Celui-ci est cinétiquement défavorable dans un sens comme dans un autre par rapport aux voies de sorties. Si l'état (AH^+,mH^+) est plus stable que l'état ($AH_2{}^{2+}$,m), l'équilibre sera déplacé vers la formation des deux entités monochargées. Ceci se produira d'autant mieux que la matrice sera basique et que l'énergie d'activation nécessaire pour passer la barrière centrale dans les ions multichargés sera élevée.

2.4 Les méthodes de désorption ionisation laser sans matrice post-MALDI

A cause des interférences spectrales dues à la présence des ions de matrice dans les faibles gammes de rapports *m/z*, il est apparu que la méthode MALDI n'était pas adaptée à l'analyse de composés de faibles poids moléculaires, typiquement inférieurs à 700 u. Dans ce contexte, des méthodes d'ionisations laser dites libres de matrices ont été développées après l'avènement des sources MALDI.[82] D'une manière générale, ces méthodes utilisent différents matériaux ou différentes modifications de la surface de dépôt.[82, 83] Le but est de reproduire les avantages apportés par l'utilisation de la matrice en MALDI tout en minimisant la présence de bruit de fond dans les bas rapports *m/z* et en évitant une étape de préparation d'un mélange matrice/analyte avant le dépôt. Dans cette optique, la méthode de désorption/ionisation laser sans matrice doit permettre d'augmenter le rendement du processus de désorption/ionisation tout en limitant la décomposition des analytes et l'apparition d'ions parasites. On peut alors considérer que les mécanismes impliqués dans ces nouvelles méthodes sans matrice "post-MALDI" sont comparables à ceux évoqués précédemment concernant l'irradiation laser de surfaces recouvertes de molécules organiques. La différence ici, est que le support doit être un milieu possédant des propriétés d'incorporation

d'analytes et d'absorption du rayonnement laser à l'image des cristaux de matrice. Dans ce but, les méthodes de LDI strictement sans matrice, c'est-à-dire sans apports de molécules ayant un rôle d'intermédiaire entre le rayonnement et le processus d'ionisation/désorption d'un analyte, ont été développées au travers de l'utilisation de surfaces photosensibles incluant des nanostructures telles que des nanopores, des nanotubes, des nanofils ou des nanoparticules.[84]

2.4.1 Désorption/ionisation sur silicium poreux (DIOS)

La technique DIOS a vu le jour en 1999,[85] elle utilise des surfaces de dépôt en silicium poreux et permet de s'affranchir de toute utilisation de molécule de matrice. Cette nouvelle approche n'est pas seulement séduisante parce qu'elle ne produit pas d'interférences dans la région des basses masses, mais aussi parce qu'elle peut être adaptée sur n'importe quel appareil de type MALDI. Elle permet l'étude d'une large gamme de composés, entre autre celle de peptides et de petites molécules organiques comme le montre la Figure 1.18.

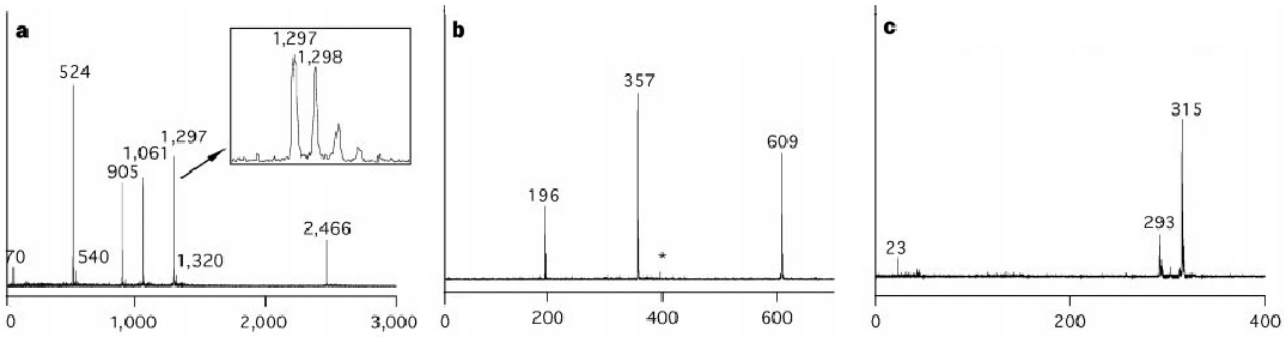


Figure 1.18 : Exemples de spectres de masse obtenus en DIOS: a, Spectre de masse DIOS d'un mélange de cinq peptides; b, Spectre de masse DIOS d'un mélange de trois petites molécules : la caféine (m/z 196), un antiviral (m/z 357) et la réserpine (m/z 609); c, Spectre de masse DIOS de N-octyl b-D-glucopyrano.[85]

La structure nano-poreuse de la surface de silicium (Figure 1.18) est obtenue par un procédé de gravure photo-électrochimique de silicium cristallin. Typiquement, les pores d'une surface DIOS possèdent un diamètre pouvant aller de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres et peuvent être longs de plusieurs micromètres. Ils sont, en majorité, perpendiculaires à la surface et non interconnectés. Les propriétés physiques de cette surface de silicium poreux sont déterminantes pour l'utilisation en spectrométrie de masse : grande aire spécifique, absorption optique élevée, inertie chimique…

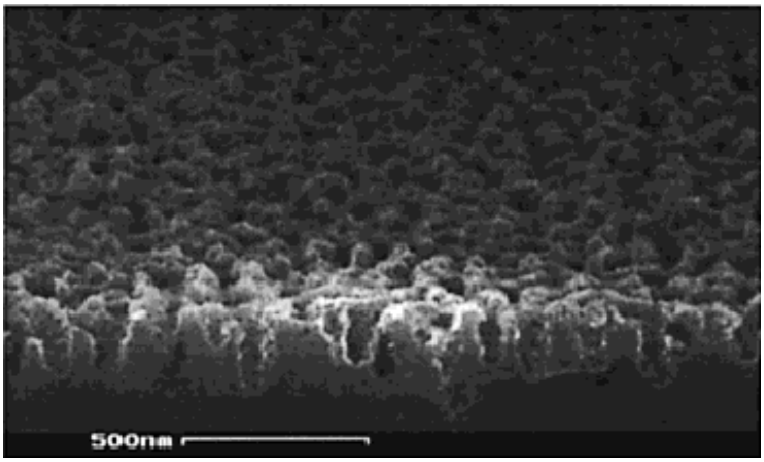


Figure 1.19 : Image MEB d'une surface de silicium poreux.[86]

Dans un premier temps, la porosité de la surface, de 30 à 40%,[86] et son aire spécifique importante, de plusieurs centaines de $m^2.cm^{-3}$, permettent l'adsorption et le stockage d'une grande quantité de molécules d'analytes et de solvant.

Ensuite, le coefficient d'absorption optique élevé, jusqu'à 10^5 cm^{-1},[87] du silicium poreux pour la longueur d'onde du laser à azote (337nm), permet une absorption très efficace de l'énergie laser.

Le rôle de la matrice est donc directement joué par la surface de dépôt en silicium poreux qui piège la molécule d'analyte et absorbe l'irradiation laser. La formation des ions en DIOS est supposée se faire en deux étapes: la désorption et l'ionisation. A la base, le substrat de silicium poreux absorbe l'énergie laser et sa température augmente. Cependant, la dissipation de la chaleur est limitée puisque cantonnée à un transport quasi-unidimensionnel dans les parois des pores et la température de la surface de silicium poreux augmente plus rapidement et à de plus hautes températures que l'aurait fait une surface de silicium classique.

La Figure 1.20 dépeint deux scénarios possibles en fonction de la présence ou non de solvant dans les pores.[88] Le pore de gauche montre un environnement "sec", les molécules de solvant et d'adsorbat se répartissent sur les sites d'adsorption. Le pore de droite est dit "humide" à cause de la présence de solvant liquide (aire grise) due soit à un phénomène de condensation capillaire, soit à un pompage moins efficace à travers le nano-pore.

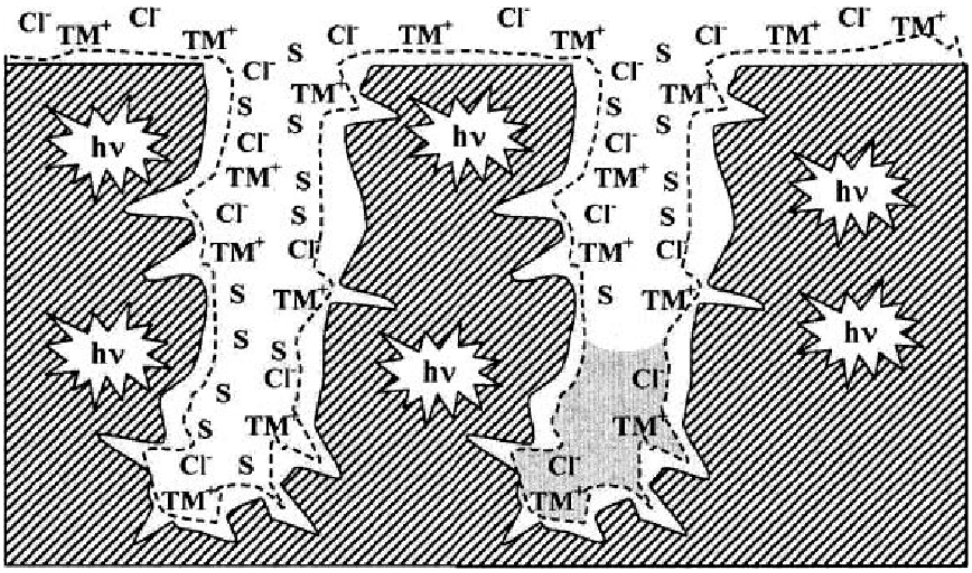


Figure 1.20 : Adsorption d'ion "thermomètres" (TM^+ et Cl^-) et de molécules de solvant (S) dans la surface de silicium nano-poreux. Les parois des pores sont suffisamment fines pour induire un confinement thermique et monter ainsi rapidement en température lors de l'irradiation. Le pore de gauche ne contient que divers adsorbats (désorption dite "sèche"), alors que le pore de droite présente du solvant piégé (aire grise) formé par condensation capillaire ou retenu à cause d'un pompage insuffisant à travers du nano-pore (désorption dite "humide").[88]

- Le dépôt d'énergie par le pulse laser dans les pores secs provoque un échauffement rapide des parois, ce qui entraine la désorption des adsorbats et donne naissance à une plume de faible densité à travers l'ouverture du pore, la pression restant relativement élevée à cause du confinement.
- Dans les pores humides, la présence de solvant à l'état liquide combinée à l'échauffement rapide des parois entraine une surchauffe du liquide et une explosion de phase. Une plume dense de solvant se développe entrainant avec elle les molécules d'adsorbat désorbées.

Dans les deux cas, à cause de la silhouette allongée des pores (~1µm de longueur pour 10 nm de diamètre), l'expansion de la plume est quasi unidimensionnelle contrairement au MALDI où elle est tridimensionnelle. De plus le confinement imposé par la structure poreuse conserve la densité de la plume plus longtemps que si l'expansion avait été libre.

Le mécanisme d'ionisation DIOS est relativement flou. Parmi les voies qui mènent à l'ionisation, on relèvera la possibilité de réactions ion-molécule au sein de la plume, surtout dans les cas de désorption humide où le solvant peut fournir des protons, ou de réactions chimiques entre le substrat de silicium et l'analyte.

2.4.2 Désorption/ionisation assistée par surface de carbone (GPLDI)

Cette méthode a été mise au point par le groupe de Sunner en 2000. Dans un premier temps, celui-ci créé une méthode appelée SALDI,[89] en partie inspirée de la méthode de "Soft Laser Desorption" proposée par Koichi Tanaka.[90] Cette dernière utilise une suspension de particules de Cobalt dans du glycérol pour aider à la désorption/ionisation de l'analyte, alors que dans le cas du SALDI, la poudre de cobalt est replacée par de la poudre de Carbonne graphite. L'inconvénient de cette méthode reste la contamination du bloc source par les particules de Carbonne.

C'est pour remédier à cet inconvénient que Sunner propose cette autre méthode.[91] La GPLDI, pour désorption/ionisation sur plaque de graphite, utilise une surface recouverte d'une fine couche de Carbonne graphite sur laquelle la solution d'analyte est directement déposée, séchée et analysée.

2.4.3 "Surface Enhanced Neat Desorption" (SEND)

La technique SEND introduite par Hutchens et coll.,[92] utilise un polymère dont les motifs de répétition adoptent une structure semblable à celles des molécules de matrice employées en MALDI, comme illustré dans la Figure 1.18 dans le cas d'un motif similaire à l'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA). Ce polymère, immobilisé sur la cible, est utilisé comme surface de dépôt et joue le rôle de matrice.

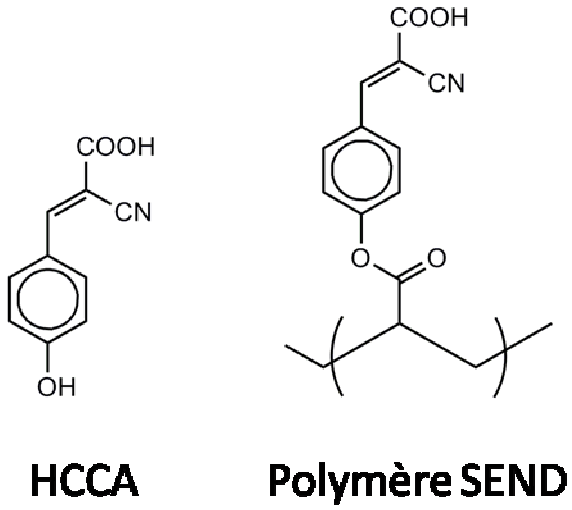


Figure 1.21 : Structure de la matrice HCCA et d'un polymère type SEND utilisé en SEND.

Dans cette méthode, l'utilisation d'un polymère apporte une certaine flexibilité et permet une optimisation de la surface en vue d'utilisations spécifiques. Par exemple, en jouant avec des fonctions de reconnaissance spécifique ou sur la conformation du polymère, il est possible de retenir sélectivement certains composés et de réaliser des purifications directement sur la surface.[93, 94]

Même si certaines méthodes se détachent, elles restent limitées et restent éloignées des performances obtenues en MALDI en termes de diversité des familles de composés analysables et de sensibilité. Or de nombreux champs, comme la recherche pharmaceutique, la métabolomique, les contrôles anti-dopage, … sont limités dans leur utilisation de la technique MALDI à cause du faible poids moléculaires des molécules étudiées. Ils sont donc à la recherche d'une méthode d'analyse efficace qui permette de travailler dans les faibles rapports m/z. Ainsi, d'autres approches ont été tentées, utilisant par exemple des sol-gels contenant des molécules de matrice,[95] ou divers autres techniques dérivées du DIOS[96] ou de la LDI sur or.[97, 98] La technique DIAMS s'inscrit dans la même lignée que ces travaux et utilise une surface recouverte d'une monocouche auto-organisée pensée pour satisfaire aux exigences de la désorption/ionisation laser.

Chaque méthode de désorption/ionisation laser sans matrice se veut utiliser une technique d'ionisation différente, mais que ce soit une irradiation directe de l'échantillon étudié ou en passant par une matrice ou une surface modifiée, l'étape de base reste l'irradiation laser et son absorption, bien souvent suivie de l'analyse des ions par un analyseur à temps de vol.

3 L’analyseur à temps de vol pour la détection d’ions gazeux produits par les processus LDI

Les sources d'ionisation par désorption/ionisation laser sont de type pulsé et nécessitent un analyseur adapté, historiquement et classiquement, elles sont couplées à un analyseur à temps de vol. Le principe est d'accélérer les ions par un champ électrique puis de les laisser évoluer sur une longue distance dans une zone libre de champ avant de les détecter. La vitesse atteinte par les ions lors de l'accélération dépend de leur masse et de leur charge. Les ions vont donc être spatialement séparés pendant leur vol dans la zone libre de champ et être détectés par paquets d'espèces de même rapport *m/z* au niveau du détecteur. Les équations qui gèrent le déplacement de molécules chargées dans les champs électriques permettent ensuite de retrouver les rapports masse sur charge des paquets d'ions détectés à partir de leurs temps de vol.

3.1 Les bases de l'analyseur à temps de vol

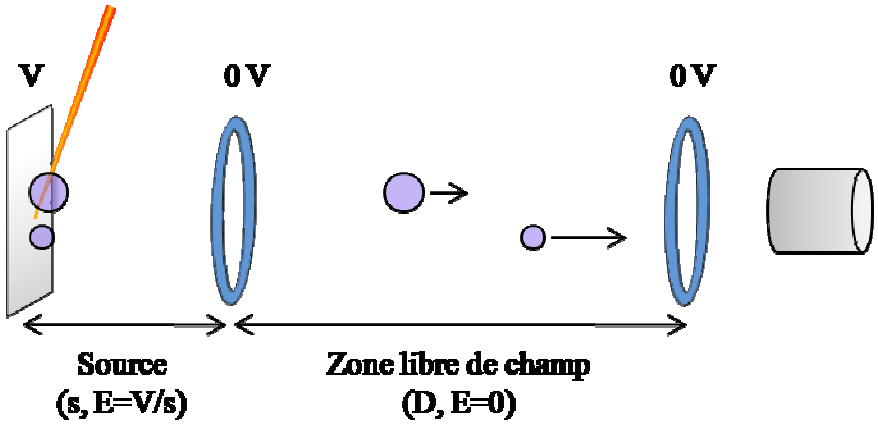


Figure 1.22 : Représentation schématique d'un analyseur à temps de vol linéaire présentant une source d'ion à un étage.

Le spectromètre à temps de vol le plus simple se composerait de :

- Une source munie d'un dispositif d'extraction d'ions.

La tâche principale du bloc source est l'ionisation de l'échantillon. Historiquement, les spectromètres à temps de vol sont couplés à une source par désorption/ionisation laser et le bloc source comprend également un dispositif d'extraction des ions.
Les ions formés sont extraits et accélérés par application d'une différence de potentiel entre la cible et une plaque d'extraction. Le champ électrique généré entraine les ions vers le tube de vol et leur confère à tous la même énergie cinétique.

- Un tube de vol.

Le tube de vol est une zone libre de champ, garantie par l'application d'un même potentiel sur deux plaques, respectivement situées à l'entrée (plaque d'extraction des ions de la source) et à la sortie du tube de vol (au niveau du détecteur). Grâce à l'énergie cinétique reçue lors de leur extraction, les ions traversent le tube de vol avec une vitesse inversement proportionnelle à la racine carré de leur rapport masse sur charge (*m/z*). Ainsi, les ions les plus légers ont une plus grande vitesse et mettent un temps plus court pour arriver au détecteur.

- Un détecteur.

Après cette séparation, les ions arrivent simplement du plus léger au plus lourd sur le détecteur situé au bout de tube de vol. Les rapports *m/z* des ions sont alors retrouvés grâce aux équations de leur mouvement dans l'appareil.

3.1.1 Equation du temps de vol

Les équations qui gèrent le mouvement des ions dans le spectromètre à temps de vol sont simples,[99, 100] elles se basent sur les fondements de la mécanique classique.

La localisation de l'ionisation varie en fonction de la technique d'ionisation, elle peut se faire au centre de la source, comme en impact électronique et en ionisation laser en phase gazeuse, ou plus localement comme dans le cas d'une source par désorption/ionisation ou les ions sont formés sur une surface.

Les ions sont ensuite accélérés à travers la source par un champ électrique *E*. Pendant leur trajet, ils acquièrent tous la même énergie cinétique et sortent de la source avec une vitesse v qui dépend de leur rapport *m/z* :

$$\frac{1}{2}mv^2 - \frac{1}{2}mv_0^2 = zeEs \qquad (1.1)$$

or

$$v_0 = 0\ m.s^{-1} \qquad (1.2)$$

$$\frac{1}{2}mv^2 = zeEs \qquad (1.3)$$

$$v = \left(\frac{2zeEs}{m}\right)^{1/2} \qquad (1.4)$$

Avec *m* : la masse exacte de l'ion
v_0 et *v*: respectivement la vitesse de l'ion à t_0 et à la sortie de la source.
z : état de charge de l'ion.
e : la charge élémentaire ($1{,}6\cdot10^{-19}$C).
E et *V* : champ électrique et potentiel d'extraction.
s : longueur de la source soit la distance entre la cible et la plaque d'extraction.

Le temps t_D mis par les ions pour traverser le tube de vol de longueur *D* est exprimé par :

$$t_D = \left(\frac{m}{2zeEs}\right)^{\frac{1}{2}} D \qquad (1.5)$$

Il est proportionnel à la racine carré de leur rapport *m/z*. Le temps t_s passé dans la source contribue aussi au temps de vol total t_{vol} des ions :

$$v = \frac{ds}{dt} = \left(\frac{2zeEs}{m}\right)^{\frac{1}{2}} \qquad (1.6)$$

$$\int_0^{t_s} dt = \int_0^{s} \left(\frac{m}{2zeE}\right)^{\frac{1}{2}} \frac{ds}{s^{\frac{1}{2}}} \qquad (1.7)$$

$$t_s = \left(\frac{m}{2zeE}\right)^{\frac{1}{2}} 2s^{\frac{1}{2}} = \left(\frac{m}{2zeEs}\right)^{\frac{1}{2}} 2s \qquad (1.8)$$

Soit $$t_{vol} = t_s + t_D = \left(\frac{m}{2zeEs}\right)^{\frac{1}{2}} (2s + D) \qquad (1.9)$$

3.1.2 Détermination du rapport masse sur charge et calibration du spectre de masse

Dans un premier temps, le détecteur enregistre un spectre du flux d'ions en fonction de leur temps de vol. Le logiciel utilise ensuite l'équation du temps de vol pour transposer les temps enregistrés en rapports masse sur charge :

$$\frac{m}{z} = 2eEs\left(\frac{t_{vol}}{2s + D}\right)^2 \qquad (1.10)$$

Une calibration linéaire du spectre de masse peut être réalisée en mesurant les temps de vol de deux masses connues afin d'ajuster la conversion en déterminant les constante *a* et *b* dans l'équation du type :

$$\frac{m}{z} = \frac{(t_{vol} - b)^2}{a} \qquad (1.11)$$

Le terme *b* permet de corriger tout décalage en temps, induit par la durée du tir laser, par la vitesse de réaction de l'électronique…

Un autre type de calibration plus performant, appelé calibration quadratique, se base sur plus de deux masses connues.

3.1.3 La résolution en masse :

En spectrométrie de masse, la résolution est définie comme étant le rapport de la masse (du rapport *m/z* pour être exacte) sur la largeur à mi-hauteur du pic : $\frac{m/z}{\Delta(m/z)}$.

Théoriquement, dans l'appareil à temps de vol, les ions de même masse ont un unique temps de vol. En réalité, les ions ne se forment pas tous au même endroit, au même moment ou avec la même énergie cinétique, ils acquièrent alors différentes vitesses de vol et, à l'arrivée, les temps de vol apparaissent sous forme d'une distribution.

D'après l'équation (1.10) :

$$\frac{m}{z} = \frac{2eEs}{(2s + D)^2} {t_{vol}}^2 \qquad (1.12)$$

$$d\left(\frac{m}{z}\right)=\frac{2eEs}{(2s+D)^2}2tdt \qquad (1.13)$$

Donc pour un analyseur à temps de vol, la résolution s'écrit :

$$\frac{m/z}{\Delta(m/z)}=\frac{t}{2\Delta t} \qquad (1.14)$$

Δt : largeur à mi-hauteur de la distribution de temps de vol de l'ion.

Elle dépend ainsi beaucoup de la largeur de distribution du temps de vol des ions et donc de tous les paramètres qui peuvent influer dessus tels que les dispersions temporelle, spatiale et cinétique du phénomène d'ionisation.

3.2 Distributions temporelle, spatiale et cinétique.

A l'origine, les spectromètres de masse affichaient une mauvaise résolution qui était le reflet des imprécisions sur le moment et l'endroit de formation des ions, ainsi que sur l'énergie cinétique initiale qu'ils ont pu acquérir.

3.2.1 Distribution Temporelle :

L'ionisation est un phénomène continu. C'est-à-dire que tous les ions ne sont pas formés au même moment et ne vont donc pas arriver en même temps dans le tube de vol et sur le détecteur.

La largeur de la distribution de la formation des ions dans le temps (*Δt*) influence directement la résolution puisque $\frac{m/z}{\Delta(m/z)}=\frac{t}{2\Delta t}$, une solution serait d'utiliser un tube de vol plus long, ce qui aurait pour effet d'augmenter le temps de vol *t*, ou d'introduire une extraction retardée. Celle-ci permet de laisser le temps aux ions de se former ou même de se fragmenter avant de les extraire.

3.2.2 Distribution spatiale :

Les ions peuvent se former en différents endroits de la source. Par exemple, dans les sources de désorption/ionisation, la majorité des ions est formée directement à proximité de la cible. Une plus petite quantité est créée à une certaine distance de celle-ci après avoir été désorbée. Ces derniers ions sont produits près de la sortie de la source lorsqu'ils subissent le champ d'extraction. Ils sont accélérés sur une distance plus courte et acquièrent moins d'énergie cinétique. Plus les ions se forment proche de la sortie de source, plus ils auront un déficit en énergie cinétique et plus ils arriveront tard au détecteur. Une telle distribution spatiale de l'ionisation a donc pour effet d'élargir le pic vers les hautes masses. La meilleure solution pour corriger la perte de résolution due à la distribution spatiale de la formation des ions est la modification du système d'extraction pour repousser le plan de focalisation spatial sur le détecteur.

3.2.3 Distribution d'énergie cinétique :

Lors de leur formation, les ions possèdent une énergie cinétique initiale qui va donc modifier les termes de l'équation (1.5). Leur temps de vol dans la zone libre de champs devient alors:

$$t_D = \left(\frac{m}{2\left(zeEs + E_{c_0} \right)} \right)^{\frac{1}{2}} D \qquad (1.15)$$

Ainsi les ions avec une vitesse initiale non nulle arrivent sur le détecteur avant. Une trainée est observée vers les bas rapports *m/z*. Il est intéressant de noter que deux ions avec des vitesses initiales égales mais avec des directions opposées se retrouvent en sortie de source avec des énergies cinétiques et donc des vitesses identiques. A l'arrivé, l'écart de temps entre les deux ions correspond uniquement au temps qui a été nécessaire à l'un des ions pour faire demi-tour.

Le moyen le plus simple de limiter l'impacte d'une distribution large d'énergie cinétique initiale est d'augmenter le potentiel d'extraction *V* pour que le produit *z.e.E.s* (*V* = *E.s*) soit prépondérant devant E_{C0}, le gain en résolution restant dépendant de la masse.

3.2.4 Fragmentation

La fragmentation des ions moléculaires peut apporter de riches informations structurelles. Elle provient d'un excès d'énergie interne emmagasiné lors de l'ionisation et dépend :

- de la quantité d'énergie interne
- du nombre de degrés de liberté de la molécule
- de la force des liaisons

Les ions produits peuvent se fragmenter à tout moment depuis leur formation dans la source jusqu'à leur arrivée au détecteur. L'effet sur le spectre de masse dépend alors du moment où intervient cette fragmentation. On définit ainsi plusieurs types de dissociation, tels que :

- La fragmentation prompte qui intervient en même temps que l'ionisation.
- La fragmentation métastable qui se produit pendant l'accélération de l'ion. Ce type de fragmentation dégrade la résolution du spectre de masse, les ions subissent une accélération différente avant et après la fragmentation et arrivent au détecteur entre les ions parents et les ions fragments prompts.
- La fragmentation "post source" qui est caractéristique d’une décomposition dans le tube de vol. dans ce cas, les fragments ont la même vitesse que leurs précurseurs et donc le même temps de vol.

L'inconvénient reste que les fragmentations métastables et "post source" entrainent une diminution de la résolution. L'extraction retardée permet entre autre de minimiser cet effet en laissant le temps aux fragmentations de se faire en source.

3.2.5 Améliorations du système d'extraction :

3.2.5.1 Plan de focalisation spatial

C'est un plan virtuel situé à une distance d de la source qui correspond à l'endroit où les ions ont passé autant de temps dans le tube de vol que dans la source. Soit, d'après les équations (1.5) et (1.8) :

$$\left(\frac{m}{2zeEs}\right)^{\frac{1}{2}} 2s_0 = \left(\frac{m}{2zeEs}\right)^{\frac{1}{2}} D \qquad (1.16)$$

lorsque : $$2s_0 = D \qquad (1.17)$$

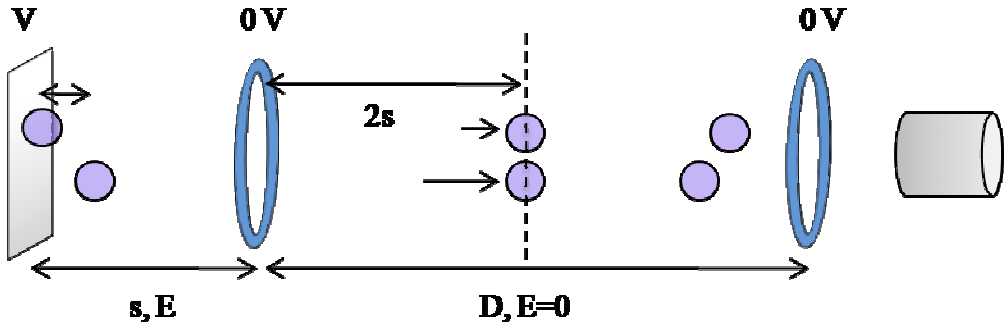


Figure 1.23 : Représentation schématique d'un analyseur à temps de vol linéaire présentant une source d'ion à un étage et positionnement du plan de focalisation des ions.

L'avantage de ce plan est que tous les ions formés à des endroits différents de la source y sont refocalisés. En effet, d'après les équations du temps de vol, si $d = 2.s_0$, les différences de temps passés dans la source et dans le tube de vol pour deux ions formés à s_0 et $s_0 + \Delta s_0$ se compensent au niveau du plan focal. C'est-à-dire que les ions formés plus proches de la sortie de source y passent moins de temps et sortent avec une vitesse inférieur de telle sorte que les ions formés plus loin mettent plus de temps à quitter la source, mais y ont acquis une vitesse supérieure et rejoignent les premiers au niveau du plan focal.

3.2.5.2 Extraction à deux étages:

La position du plan focal est indépendante de la masse. Cependant, la séparation des ions en fonction de leur masse à une distance $d = 2s$ est insuffisante pour y placer le détecteur. La solution consiste à déplacer le plan focal plus loin par un système d'extraction en deux temps.

Ce dispositif consiste à intercaler un plaque d'accélération intermédiaire et créer deux champs d'accélération distincts E_0 et E_1, avec $E_1 >> E_0$. Plus le rapport E_1/E_0 est élevé, plus le plan focal est situé loin de la source. Ce dispositif permet notamment de placer le détecteur du mode linéaire au niveau du plan de focalisation des ions.

3.2.5.3 L'extraction retardée

L'extraction pulsée des ions est un moyen d'obtenir des paquets d'ions avec une distribution temporelle initiale moindre. Cette focalisation est améliorée par l'ajout d'une extraction retardée; inspirée de la méthode de "time lag focusing" introduite par Wiley et Mclaren en 1955.[101, 102]

Elle consiste à laisser évoluer le système dans une zone libre de champ pendant un temps τ de quelques nanosecondes après l'ionisation et avant l'extraction des ions.

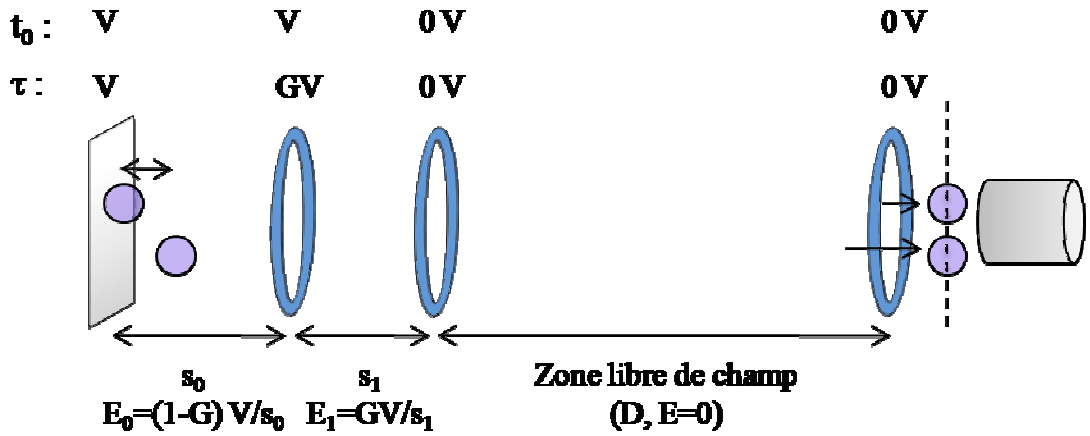


Figure 1.24 : Représentation schématique d'un analyseur à temps de vol linéaire présentant une source d'ion à deux étages et extraction retardée.

En pratique, cela consiste à appliquer un même potentiel sur la cible et sur la première plaque d'extraction pendant un court lapse de temps, appelé délais d'extraction, puis à basculer le potentiel de la première plaque à une fraction GV du potentiel d'extraction V de façon à créer le premier champ d'extraction.

L'extraction retardée apporte deux améliorations majeures :

- Elle focalise les paquets d'ions en réduisant la fenêtre temporelle de formation des ions par le pulse d'ionisation laser suivi des réactions d'ionisation chimique et en phase gaz à la largeur d'une simple pulsation de champ d'extraction.
- Elle permet de laisser le temps aux espèces désorbées d'interagir dans la plume et aux ions métastables de se fragmenter avant l'extraction.

Elle diminue aussi l'effet de la dispersion en énergie cinétique pour des ions formés sur une même surface, mais présentant une distribution d'énergie cinétique pendant le délai d'extraction. En effet, ces ions évoluent avec différentes vitesses initiales dans la région libre de champs et la distribution en énergie cinétique se convertit en distribution spatiale (même si cela ne supprime pas la distribution en énergie cinétique), cette dispersion spatiale est alors corrigée sur le plan focal. Une source à extraction retardée à deux étages permet donc de compenser l'effet des distributions temporelles et spatiales sur la résolution et de diminuer celui de la dispersion en énergie cinétique.

3.2.6 Le réflecteur électrostatique :

Introduit par Mamyrin dans les années 70, le réflectron, ou miroir électrostatique,[103] est un dispositif qui permet d'achever la refocalisation temporelle des ions dont l'éparpillement serait dû aux dispersions en énergie cinétique.

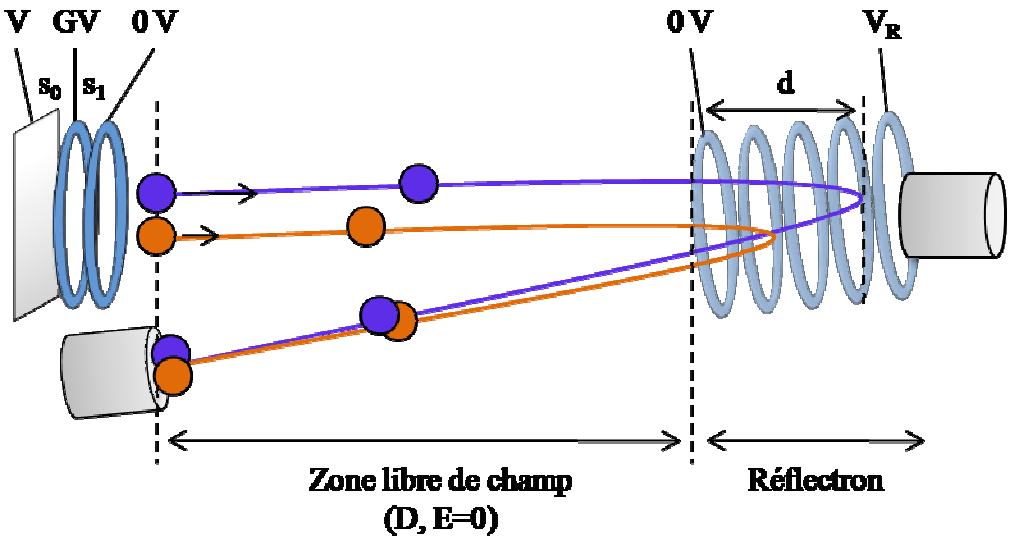


Figure 1.25 : Représentation schématique d'un analyseur à temps de vol présentant une source d'ion à deux étages et un miroir électrostatique.

Le réflectron, installé en bout de tube de vol, consiste en un jeu de lentilles qui génère un champ électrique opposé au champ d'extraction et qui permet de réfléchir le faisceau d'ions. Ainsi, la dispersion des ions provoquée lors de l'aller et du retour dans le tube de vol par les différences de vitesses est annulée lors du demi-retour dans le miroir. Dans le cas d'espèces ioniques de même masse, mais présentant des vitesses différentes, les ions d'énergie cinétique plus élevée vont arriver en premier au réflectron. Mais, ils pénétreront plus profondément dans le champ de réflexion. Le temps supplémentaire passé dans le réflectron compense l'avance prise dans le tube de vol de telle sorte que tous les ions arrivent en même temps sur le détecteur. De plus, cette technique améliore le pouvoir de résolution car elle permet la défocalisation des ions issus de décompositions métastables.

3.3 Le Biflex III

Le spectromètre de masse qui a principalement été utilisé est un MALDI-TOF Biflex III de la société Bruker. Il est équipé des principales améliorations présentées précédemment comme le montre le schéma de fonctionnement (Figure 1.26).

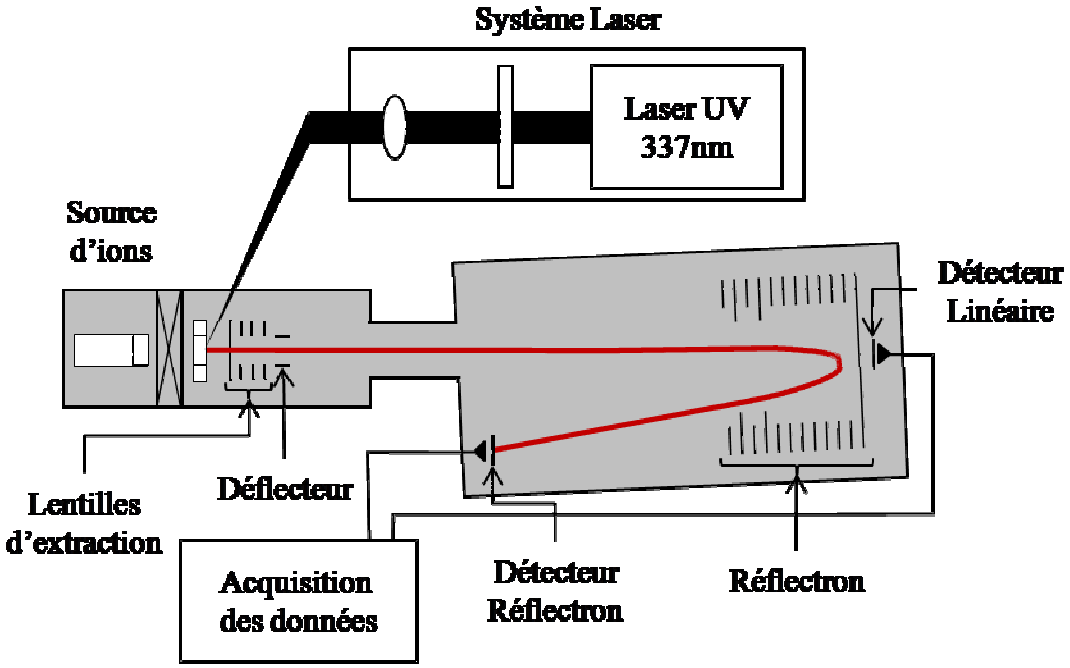


Figure 1.26 : Représentation schématique du spectromètre de masse MALDI-TOF Bruker Biflex III

3.3.1.1 Le bloc source:

Le laser utilisé est un laser à azote qui émet dans l'UV à la longueur d'onde de 337nm, il délivre des pulsations de 3 ns avec une fréquence de tir ajustable jusqu'à 10 Hz. La puissance délivrée est modulée grâce à un filtre atténuateur, c'est un disque graduellement teinté qui tourne pour ajuster l'intensité du rayonnement transmis, lors de l'enregistrement des spectres de masse les puissances laser sont enregistrées sous forme d'un pourcentage, une courbe de calibration, présentée dans la Figure 1.27, a été réalisée pour ramener ces valeurs à des irradiances.

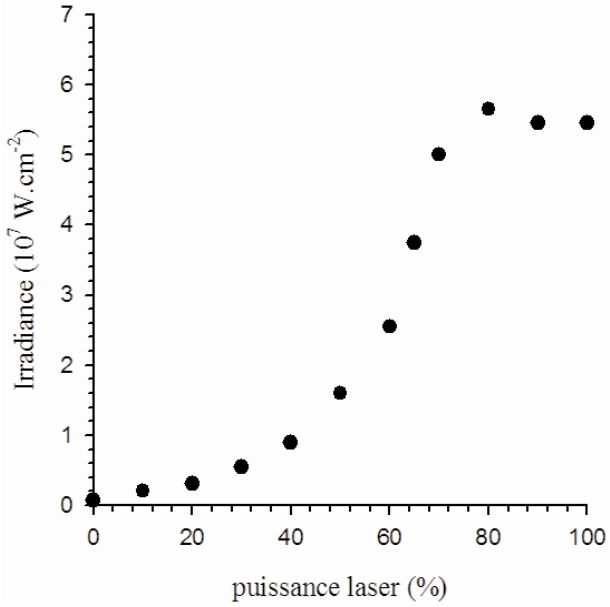


Figure 1.27 : Courbe détalonnage de l'irradiance délivrée par le laser en fonction de la valeur entrée lors de l'acquisition.

On remarquera que les puissances délivrées restent toujours de l'ordre de l'irradiance moyenne telle que définie en partie 2.1.2 et que malheureusement le pourcentage de puissance demandé ne varie pas linéairement avec l'irradiance délivrée.

Le rayon laser est focalisé par un système de lentilles et dirigé par réflexions sur un jeu de miroirs sur la cible, on estime le diamètre de l'impacte laser à 100 µm. Une lame semi-réfléchissante est intercalée au cours du chemin optique afin de refléter une fraction du rayon vers une photodiode qui enregistre le début de la mesure du temps de vol des ions.

La source par désorption ionisation laser se résume à une plaque, appelée cible, sur laquelle les échantillons sont déposés puis irradiés par le laser. La cible peut être entrée et sortie de l'appareil par un système de sas et de bras articulé. Dans le cas présent, la plaque de dépôt est en acier inoxydable et permet de déposer jusqu'à 384 échantillons.

Dans l'appareil, la plaque est chargée sur un "chariot" fixé à une table XY pilotée par l'ordinateur, ce qui permet à l'utilisateur de choisir la zone à irradier, mais permet aussi de faire des séries d'analyses entièrement automatisées (logiciel AutoXecute). La visualisation de la zone irradiée passe par l'utilisation d'une caméra CCD et l'image est affichée en temps réel dans le logiciel d'acquisition.

3.3.1.2 L'extraction et la déflexion des ions:

L'extraction des ions est pulsée et constituée de deux zones d'accélération. Elle est obtenue par application de différences de potentiel entre la cible, la première lentille d'extraction et la seconde lentille qui sont en général et respectivement à 19 kV, à 17.3 kV et à la masse. Les valeurs du délai d'extraction τ appliqué entre l'impacte laser et l'application du champ d'extraction sont fixées à 200, 400 ou 600 ns.

A la sortie de la source, l'appareil est muni d'un déflecteur d'ions qui permet de supprimer les ions de bas rapports *m/z*. Ces ions, souvent non significatifs ou provenant de matrice, sont parfois très abondants et peuvent entrainer une réduction de la sensibilité par saturation du détecteur. Il se présente sous la forme d'une paire de plaques, disposées de part et d'autre de la trajectoire des ions. Elles génèrent un champ électrique perpendiculaire au faisceau d'ion sur une courte durée après l'impulsion laser afin de dévier les premiers ions de l'axe et qu'ils n'atteignent pas le détecteur.

3.3.1.3 L'analyseur de masse TOF

Le Biflex III propose les deux modes de vol : linéaire et réflectron. Il est possible d'activer ou non la tension appliquée au miroir électrostatique et donc de détecter les ions après un aller simple ou un aller-retour.

Il existe cependant une différence entre le miroir électrostatique présenté précédemment et celui qui équipe le Biflex. Ce miroir est équipé de 2 étages, il présente une première zone à fort champ électrique dans laquelle les ions sont fortement décélérés à l'aller et fortement accélérés sur le retour, puis une zone de réflexion où le champ est plus faible. Cette technique avec deux étages permet encore d'améliorer la résolution en apportant une correction au second ordre de l'énergie cinétique.

3.3.1.4 La detection des ions

Le spectromètre possède deux détecteurs, un pour le mode linéaire et un pour le mode réflectron. Ce sont des détecteurs à galettes de micro-canaux[104] dont le principe est de convertir le nombre d'impactes d'ion qu'ils reçoivent en un courant électrique.

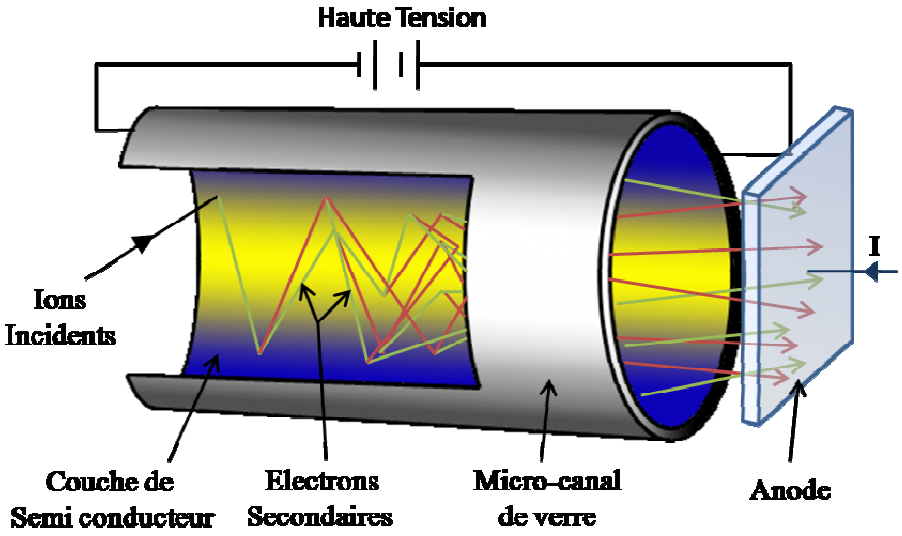


Figure 1.28 : Schéma d'un micro-canal

Les micro-canaux jouent un double rôle puisqu'ils convertissent le flux d'ions en flux d'électrons et amplifient le signal à la même façon qu'un photomultiplicateur.

Un micro-canal est un tube de verre de quelques dizaines de micromètres de diamètre dont la surface intérieure est recouverte d'un matériau semi-conducteur auquel est appliquée une haute tension de l'ordre du kilovolt.

Lorsqu'une molécule chargée percute la paroi intérieure d'un micro-canal, elle provoque l'émission d'électrons secondaires. Ces électrons sont accélérés, vont à leur tour frapper la paroi et provoquer l'émission d'électrons secondaires, ce qui engendre un effet d'avalanche. Les électrons sont au final collectés sur une anode qui produit un courant *I* dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'ions incidents. La tension appliquée sur les micro-canaux permet non-seulement de ré-accélérer les électrons secondaires mais aussi de réapprovisionner en permanence la surface en électrons, ce qui est nécessaire pour la continuité du phénomène d'amplification par émission secondaire.

Le signal électrique est transformé par un convertisseur analogique-numérique puis envoyé vers la station de travail qui enregistre et affiche les spectres de masse.

4 Bibliographie

(1) Maiman T.H. *British Communications and Electronics* **1960**, *7*, 674-675.

(2) Maiman T.H.; Hughes Aircraft Co.: US, 1967, pp 10.

(3) Einstein A. *Physikalische Zeitschrift* **1917**, *18*, 121-128.

(4) Vertes A.; Juhasz P.; Balazs L.; Gijbels R. *Microbeam Analysis* **1989**, 273-276.

(5) Hercules D.M.; Day R.J.; Balasanmugam K.; Dang T.A.; Li C.P. *Analytical Chemistry* **1982**, *54*, 280-305.

(6) Lazare S.; Granier V. *Laser Chem.* **1989**, *10*, 25-40.

(7) Simpson C.J.S.M.; Hardy J.P. *Chemical Physics Letters* **1986**, *130*, 175-180.

(8) Viswanadham S.K.; Hercules D.M.; Schreiber E.M.; Weller R.R.; Giam C.S. *Analytical Chemistry* **1988**, *60*, 2346-2353.

(9) Vertes A.; Juhasz P.; Gijbels R. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1989**, *334*, 682.

(10) van der Peyl G.J.Q.; Haverkamp J.; Kistemaker P.G. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics* **1982**, *42*, 125-141.

(11) Vertes A.; De Wolf M.; Juhasz P.; Gijbels R. *Analytical Chemistry* **1989**, *61*, 1029-1035.

(12) Vertes A.; Juhasz P.; De Wolf M.; Gijbels R. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1989**, *94*, 63-85.

(13) Vertes A.; Juhasz P.; Wolf M.D.; Gijbels R. *Scanning Microscopy* **1988**, 1853-1877.

(14) Deckert A.A.; George S.M. *Surface Science* **1987**, *182*.

(15) Philippoz J.M.; Zenobi R.; Zare R.N. *Chemical Physics Letters* **1989**, *158*, 12-17.

(16) Sherman M.G.; Kingsley J.R.; Dahlgren D.A.; Hemminger J.C.; McIver Jr R.T. *Surface Science Letters* **1985**, *149*.

(17) Hall R.B.; DeSantolo A.M. *Surface Science* **1984**, *137*, 421-441.

(18) Vertes A. *Microbeam Analysis* **1991**, 25-30.

(19) Tabet J.C.; Cotter R.J. *Analytical Chemistry* **1984**, *56*, 1662-1667.

(20) Posthumus M.A.; Kistemaker P.G.; Meuzelaar H.L.C.; Ten Noever de Brauw M.C. *Analytical Chemistry* **1978**, *50*, 985-991.

(21) Wahl M.C.; Kim H.S.; Wood T.D.; Guan S.; Marshall A.G. *Analytical Chemistry* **1993**, *65*, 3669-3676.

(22) Cotter R.J.; Honovich J.P.; Olthoff J.K.; Lattimer R.P. *Macromolecules* **1986**, *19*, 2996-3001.

(23) Zare R.N.; Hahn J.H.; Zenobi R. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, *61*, 87-92.

(24) Garrison B.J.; Srinivasan R. *Journal of Applied Physics* **1985**, *57*, 2909-2914.

(25) Sanguinet L.; Alévèque O.; Blanchard P.; Dias M.; Levillain E.; Rondeau D. *Journal of Mass Spectrometry* **2006**, *41*, 830-833.

(26) Mouradian S.; Nelson C.M.; Smith L.M. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 8639-8645.

(27) Han S.Y.; Lee T.G.; D.W. *Moon. International Patent WO 209/131403 A1 (date de priorité 24 avril 2008).* **2008**.

(28) Karas M.; Hillenkamp F. *Analytical Chemistry* **1988**, *60*, 2299-2301.

(29) Tanaka K.; Waki H.; Ido Y.; Akita S.; Yoshida Y.; Yoshida T. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1988**, *2*, 151-153.

(30) Beavis R.C.; Bridson J.N. *Journal of Physics D: Applied Physics* **1993**, *26*, 442-447.

(31) Cohen S.L.; Chait B.T. *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 31-37.

(32) Zhang J.; Zenobi R. *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, *39*, 808-816.

(33) Horneffer V.; Dreisewerd K.; Ludemann H.C.; Hillenkamp F.; Lage M.; Strupat K. *Int. J. Mass Spectrom.* **1999**, *185-187*, 859-870.

(34) Zhigilei L.V.; Leveugle E.; Garrison B.J.; Yingling Y.G.; Zeifman M.I. *Chemical Reviews* **2003**, *103*, 321-347.

(35) Dreisewerd K. *Chemical Reviews* **2003**, *103*, 395-425.

(36) Dreisewerd K.; Scherenberg M.; Karas M.; Hillenkamp F. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1995**, *141*, 127-148.

(37) Ingendoh A.; Karas M.; Hillenkamp F.; Giessmann U. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1994**, *131*, 345-354.

(38) Vertes A.; Gijbels R. *Laser Ionization Mass Analysis* **1993**, 127-175.

(39) Menzel C.; Dreisewerd K.; Berkenkamp S.; Hillenkamp F. *International Journal of Mass Spectrometry* **2001**, *207*, 73-96.

(40) Esenaliev R.O.; Oraevsky A.A.; Letokhov V.S.; Karabutov A.A.; Malinsky T.V. *Lasers in Surgery and Medicine* **1993**, *13*, 470-484.

(41) Spengler B.; Bahr U.; Karas M.; Hillenkamp F. *Instrumentation Science & Technology* **1988**, *17*, 173 - 193.

(42) Lindner B.; Seydel U. *Analytical Chemistry* **1985**, *57*, 895-899.

(43) Zhigilei L.V.; Garrison B.J. *Applied Physics Letters* **1999**, *74*, 1341-1343.

(44) Zhigilei L.V.; Garrison B.J. *Journal of Applied Physics* **2000**, *88*, 1281-1298.

(45) Zhigilei L.V.; Garrison B.J. *Applied Physics A: Materials Science and Processing* **1999**, *69*.

(46) Fournier I.; Tabet J.C.; Bolbach G. *International Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *219*, 515-523.

(47) Zhigilei L.V.; Kodali P.B.S.; Garrison B.J. *Chemical Physics Letters* **1997**, *276*, 269-273.

(48) Knochenmuss R.; Zenobi R. *Chemical Reviews* **2003**, *103*, 441-452.

(49) Vertes A.; Irinyi G.; Gijbels R. *Analytical Chemistry* **1993**, *65*, 2389-2393.

(50) Quist A.P.; Huth-Fehre T.; Sundqvist B.U.R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, *8*, 149-154.

(51) Mowry C.D.; Johnston M.V. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, *7*, 569-575.

(52) Karbach V.; Knochenmuss R. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1998**, *12*, 968-974.

(53) Ehring H.; Karas M.; Hillenkamp F. *Org. Mass Spectrom.* **1992**, *27*, 472-480.

(54) Lin Q.; Knochenmuss R. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2001**, *15*, 1422-1426.

(55) Knochenmuss R. *Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *37*, 867-877.

(56) Steenvoorden R.J.J.M.; Breuker K.; Zenobi R. *European Journal of Mass Spectrometry* **1997**, *3*, 339-346.

(57) Knochenmuss R.; Stortelder A.; Breuker K.; Zenobi R. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *35*, 1237-1245.

(58) Ehring H.; Costa C.; Demirev P.A.; Sundqvist B.U.R. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1996**, *10*, 821-824.

(59) Zhang J.; Knochenmuss R.; Stevenson E.; Zenobi R. *International Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *213*, 237-250.

(60) Klassen J.S.; Anderson S.G.; Blades A.T.; Kebarle P. *Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100*, 14218-14227.

(61) McCarley T.D.; McCarley R.L.; Limbach P.A. *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 4376-4379.

(62) *Handbook of Chemistry and Physics, Editeur D.R. Lide, CRC Press : Boca Raton* **1992**.

(63) Knochenmuss R.; Lehmann E.; Zenobi R. *European Journal of Mass Spectrometry* **1998**, *4*, 421-427.

(64) Gorshkov M.V.; Frankevich V.E.; Zenobi R. *European Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *8*, 67-69.

(65) Frankevich V.; Knochenmuss R.; Zenobi R. *International Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *220*, 11-19.

(66) Seki K.; Hayashi N.; Oji H.; Ito E.; Ouchi Y.; Ishii H. *Thin Solid Films* **2001**, *393*, 298-303.

(67) Kinsel G.R.; Edmondson R.D.; Russell D.H. *Journal of Mass Spectrometry* **1997**, *32*, 714-722.

(68) Carr S.R.; Cassady C.J. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1996**, *7*, 1203-1210.

(69) Zhang X.; Cassady C.J. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1996**, *7*, 1211-1218.

(70) Harrison A.G. *Mass Spectrometry Reviews* **1997**, *16*, 201-217.

(71) Gross D.S.; Williams E.R. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 202-204.

(72) Carr S.R.; Cassady C.J. *Journal of Mass Spectrometry* **1997**, *32*, 959-967.

(73) Zenobi R.; Knochenmuss R. *Mass Spectrometry Reviews* **1998**, *17*, 337-366.

(74) Mowry C.D.; Johnston M.V. *Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98*, 1904-1909.

(75) Puretzky A.A.; Geohegan D.B. *Chemical Physics Letters* **1998**, *286*, 425-432.

(76) Karas M.; Gluckmann M.; Schafer J. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *35*, 1-12.

(77) Kinsel G.R.; Knochenmuss R.; Setz P.; Land C.M.; Goh S.K.; Archibong E.F.; Hardesty J.H.; Marynick D.S. *Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *37*, 1131-1140.

(78) Alves S.; Fournier F.; Afonso C.; Wind F.; Tabet J.C. *European Journal of Mass Spectrometry* **2006**, *12*, 369-383.

(79) Alves S. *Thèse de l'Université de Paris VI* **2002**.

(80) Olmstead W.N.; Brauman J.I. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99*, 4219-4228.

(81) Rondeau D.; Vogel R.; Tabet J.C. *Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *38*, 931-940.

(82) Peterson D.S. *Mass Spectrometry Reviews* **2007**, *26*, 19-34.

(83) Afonso C.; Budimir N.; Fournier F.; Tabet J.C. *Current Pharmaceutical Design* **2005**, *11*, 2559-2576.

(84) Vertes A. *"Soft Laser Desorption Ionization - MALDI, DIOS and Nanostructures", Laser Ablation and its Applications, C. R. Phipps (ed), Springer* **2007**, 505-528.

(85) Wei J.; Buriak J.M.; Siuzdak G. *Nature* **1999**, *399*, 243-246.

(86) Shen Z.; Thomas J.J.; Averbuj C.; Broo K.M.; Engelhard M.; Crowell J.E.; Finn M.G.; Siuzdak G. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 612-619.

(87) Kovalev D.; Polisski G.; Ben-Chorin M.; Diener J.; Koch F. *Journal of Applied Physics* **1996**, *80*, 5978-5983.

(88) Luo G.; Chen Y.; Siuzdak G.; Vertes A. *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 24450-24456.

(89) Sunner J.; Dratz E.; Chen Y.-C. *Analytical Chemistry* **2002**, *67*, 4335-4342.

(90) T. Koichi; Hiroaki W.; Yutaka I.; Satoshi A.; Yoshikazu Y.; Tamio Y.; Matsuo T. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1988**, *2*, 151-153.

(91) Han M.; Sunner J. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2000**, *11*, 644-649.

(92) Hutchens T.W.; Yip T.T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, *7*, 576-580.

(93) Lin S.; Viner R.; Kitagawa N.; Weinberger S. *Proceedings of the 51th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics* **2003**.

(94) Lin S.; Viner R.; Kitagawa N.; Chang D.; Tang N.; Weinberger S. *Proceedings of the 51th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics* **2003**.

(95) Lin Y.S.; Chen Y.C. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 5793-5798.

(96) Go E.P.; Apon J.V.; Luo G.; Saghatelian A.; Daniels R.H.; Sahi V.; Dubrow R.; Cravatt B.F.; Vertes A.; Siuzdak G. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 1641-1646.

(97) Chen L.C.; Yonehama J.; Ueda T.; Hori H.; Hiraoka K. *Journal of Mass Spectrometry* **2007**, *42*, 346-353.

(98) Nagahori N.; Nishimura S.I. *Chemistry-a European Journal* **2006**, *12*, 6478-6485.

(99) Guilhaus M. *Journal of Mass Spectrometry* **1995**, *30*, 1519-1532.

(100) Cotter R.J. *Analytical Chemistry* **1992**, *64*, 1027A-1039A.

(101) Cotter R.J. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 445A-451A.

(102) Wiley W.C.; McLaren I.H. *Review of Scientific Instruments* **1955**, *26*, 1150-1157.

(103) Mamyrin B.A.; Karataev V.I.; Shmikk D.V.; Zagulin V.A. *Sov. Phys. JETP* **1973**, *37*, 3745-3748.

(104) Ladislas Wiza J. *Nuclear Instruments and Methods* **1979**, *162*, 587-601.

Chapitre II :

Principe, élaboration et faisabilité de la méthode DIAMS

La méthode DIAMS[1], pour Desorption/Ionisation on self-Assembled Monolayer Surface, appartient à la famille des techniques de désorption/ionisation laser sans matrice qui utilisent des surfaces modifiées. Dans ce cas, la modification de surface est effectuée par recouvrement de celle-ci par une monocouche organique auto-assemblée (SAM).

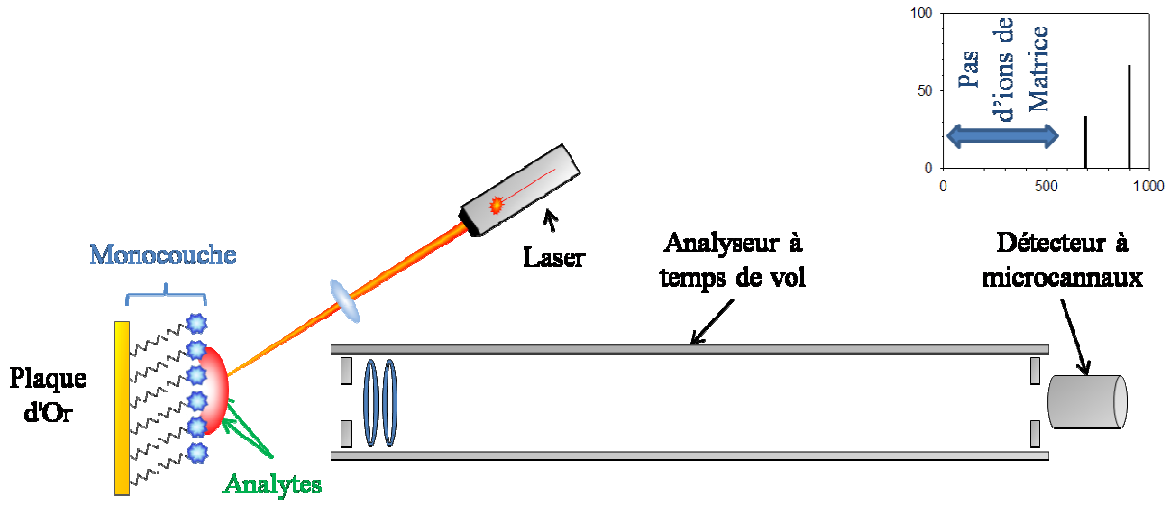


Figure 2.1 : Schéma de fonctionnement de la technique spectrométrie de masse DIAMS.

L'idée est de s'affranchir de l'utilisation de molécules de matrice et d'utiliser à la place une monocouche qui absorbe à la longueur d'onde du laser. Ainsi, lors de l'irradiation par le laser, cette monocouche doit absorber l'énergie photonique et aider à la désorption/ionisation de l'échantillon déposé à sa surface.

1 Les monocouches organiques auto-assemblées

1.1 Définition et caractéristiques d'une SAM

Les monocouches auto-assemblées, (SAMs pour Self-Assembled Monolayers en anglais), apportent un moyen efficace, flexible et simple de donner des propriétés spécifiques à une surface métallique. Ce sont des édifices organiques formés par adsorption de molécules en solution, ou parfois en phase gazeuse, sur une surface appelée substrat. Les molécules fixées sur le substrat, appelées molécules précurseur ou adsorbats, s'organisent spontanément en structures semi-cristallines et forment une monocouche homogène qui recouvre l'intégralité de la surface métallique.

Typiquement, les molécules précurseur se composent de trois parties qui ont chacune un rôle à jouer. (Figure 2.2)

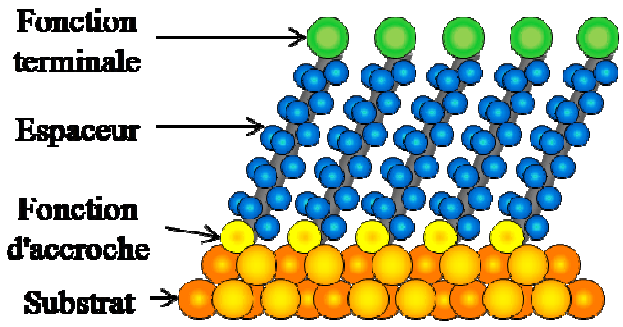


Figure 2.2 : Représentation schématique d'une SAM monocristalline idéale d'alcane -thiols sur un substrat métallique.

La fonction d'accroche : c'est une fonction chimique qui présente une forte affinité pour le substrat, cette affinité est telle, que la molécule peut parfois déplacer d'autres particules organiques adsorbés sur la surface pour se fixer à la place. Il existe de nombreux couples fonction d'accroche/surface métallique, mais le type de SAM le plus communément utilisé se forme par adsorption d'alcane-thiols sur une surface d'or[2-10] ou d'autre métal noble (argent,[6, 11, 12] cuivre,[6] palladium,[13, 14] platine,[15] et mercure.[16]).

L'espaceur : c'est la partie de la SAM qui sépare la fonction d'accroche de la fonction terminale, dans les cas les plus simples, il se présente sous la forme d'une chaine alkyle. Il joue un rôle important dans l'organisation et la stabilité de la SAM à travers les interactions qu'il développe avec les espaceurs voisins.

La fonction terminale : c'est la deuxième extrémité de la molécule, celle qui se retrouvera à la surface de la SAM, elle détermine en grande partie les propriétés de la surface et peut influer sur l'organisation et le taux de recouvrement en fonction de son encombrement stérique.

De part leurs propriétés, les SAMs sont particulièrement adaptées aux expériences qui requièrent une modification de surface :

- elles se préparent facilement par immersion du substrat dans une solution des molécules destinées à former la monocouche.
- ces molécules sont très modulables et peuvent être façonnées pour satisfaire aux besoins de l'expérience.
- les propriétés de la surface à l'échelle macroscopique (mouillabilité, …), qui dépendent des caractéristiques des molécules déposées, peuvent alors elles même être adaptées en fonction des besoins.

Les monocouches auto-assemblées sont donc de parfaites candidates pour la modification de surface destinée à supporter la désorption/ionisation laser sans matrice.

1.2 Les monocouches auto-assemblées en Spectrométrie de Masse

A notre connaissance, en spectrométrie de masse, les SAMs ont principalement été utilisées dans deux situations différentes, en désorption/ionisation laser[17-25] et dans des dispositifs de collision sur surface (SID).[26-34] Ce travail développe uniquement l'utilisation en désorption/ionisation laser.

Les travaux qui lient les spectrométries des masse par désorption/ionisation laser simple (LDI)[17, 18, 25] ou assistée par matrice (MALDI)[19, 20] et les SAMs ont généralement pour but de caractériser les SAMs, ce qui a permis d'observer les thiols adsorbés, les produits d'éventuelles réactions comme l'oxydation et d'évaluer la stabilité des monocouches.

Dans une approche plus originale, le groupe de Mrksich, qui a beaucoup exploité la combinaison SAM/MALDI, a proposé une méthode appelée SAMDI-MS (Self-Assembled Monolayer for matrix assisted laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry). Elle consiste à modifier la surface de dépôt par une SAM spécifique, qui lui permette de jouer un rôle actif de purification ou d'extraction grâce à des procédés similaires à ceux utilisés en extraction sur phase solide. Ainsi lors du dépôt d'un mélange complexe, la monocouche fixe les molécules d'intérêt par le biais d'interactions spécifiques et le reste de l'échantillon est retiré par rinçage du dépôt. La détection et la caractérisation par spectrométrie de masse MALDI des composés retenus impliquent ensuite le dépôt de la matrice.[21-24, 35]

Cette méthode est à double usage. En effet, son utilisation classique permet la détection des analytes liés aux molécules de la monocouche, alors que des études plus poussées en font un outil puissant pour l'étude de phénomènes d'interactions et de réactions chimiques ou biochimiques sur une surface organique.

Les travaux précédents sont surtout dédiés à la caractérisation des SAMs, mais la flexibilité des monocouches doit permettre d'en faire des outils pour la spectrométrie de masse. La méthode de DIAMS-MS s'inscrit justement dans ce contexte. La monocouche a été modifiée et optimisée de façon à lui donner des caractéristiques qui la rendent apte à servir de support pour produire des ions en phase gazeuse par désorption/ionisation laser.

2 Les précurseurs de matériaux moléculaires pour le processus LDI sans matrice

Comme dit précédemment, les propriétés des monocouches organiques auto-assemblées dépendent des molécules qui les composent. La molécule destinée à former la monocouche organique auto-assemblée utilisée dans la méthode de DIAMS-MS doit répondre à un cahier des charges précis et être synthétisée en conséquent.

2.1 Propriétés requises

L'objectif premier est que la monocouche résiste aux contraintes de la LDI et assiste les phénomènes de désorption/ionisation. Pour cela, elle doit :

- absorber le rayonnement laser
- restituer de l'énergie à l'analyte
- ne pas se dégrader sous l'effet de l'irradiation
- ne pas entraver le fonctionnement du spectromètre de masse
- être inerte chimiquement vis-à-vis des molécules d'analyte déposées

En plus de ces besoins primaires indispensables au bon fonctionnement de la méthode, vient s'ajouter la nécessité de caractériser la monocouche. Les techniques spectroscopiques de caractérisation des monocouches sont souvent lourdes à mettre en œuvre.[36] En revanche, les techniques électrochimiques présentent un moyen simple et fiable de caractériser une monocouche électroactive. Ces techniques apportent des informations en termes de stabilité, d'organisation et de taux de recouvrement. Pour accéder à ce type de mesure, la molécule de la monocouche doit être pourvue d'un système redox réversible.

2.2 Molécule précurseur utilisée en DAIMS-MS :

Afin de répondre au critère d'absorption optique, l'adsorbat utilisé se compose de quatre parties, les trois parties élémentaires d'une molécule précurseur classique (une fonction d'accroche, un espaceur et une fonction terminale) plus un chromophore (Figure 2.3). Ensuite la structure de chacun des blocs est choisie pour répondre à une utilisation en DIAMS-MS.

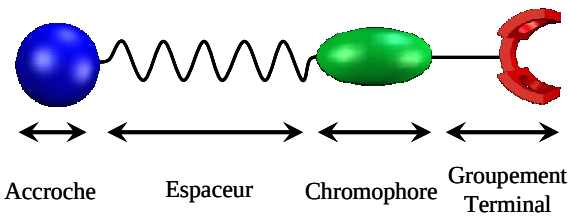


Figure 2.3 : Représentation schématique de la molécule cible et de ses 4 briques moléculaires.

Choix de la fonction d'accroche :

Une des contraintes principales est la résistance à l'irradiation pour que la monocouche ne se décroche pas lorsque la molécule est excitée par le laser.

Le choix de la fonction d'accroche est fortement lié à la nature du substrat sur lequel la monocouche est immobilisée. Dans la littérature, les substrats usuels sont des métaux (ou alliages),

des oxydes métalliques ou des semi-conducteurs.[37] Si les différentes possibilités sont à considérer, l'utilisation d'un métal peut se révéler un avantage car le processus LDI de même que l'électrochimie imposent l'application d'un potentiel sur la plaque, que ce soit la plaque de dépôt ou l'électrode de travail.

La fonction d'accroche doit également répondre à d'autres critères importants comme une facilité de mise en œuvre, mais surtout une inertie chimique et photochimique.

Parmi les nombreux couples "fonction d'accroche/or" étudiés dans la littérature,[2, 38-40] le choix s'est porté sur le couple thiol/or car il reste l'un des plus utilisés et des plus faciles à mettre en œuvre.

Choix de l'espaceur :

Pour assurer la stabilité des monocouches (notamment à l'oxydation[41]), il est nécessaire d'insérer une chaîne espaceur qui forme une couche protectrice.[42-44] L'organisation et la flexibilité de la monocouche dépendront notamment de sa nature. En effet, plus les interactions entre les espaceurs seront fortes et nombreuses, plus la monocouche sera compacte, organisée et rigide.[45-47]

L'espaceur utilisé est une chaîne alkyle linéaire comportant dix carbones, ce qui correspond aux longueurs connues pour fournir des monocouches stables et bien organisées.[37, 48]

Choix du chromophore :

Le chromophore est l'élément clé du dispositif : sa fonction principale est d'absorber l'énergie lumineuse émise par le laser (au laboratoire, un laser à azote émettant à 337 nm est utilisé).

L'encombrement stérique du chromophore est le second critère à considérer car il a une influence importante sur l'organisation globale de la monocouche. Pour ces raisons, le chromophore utilisé sera un système plan π-conjugué qui présente généralement une absorption dans la région spectrale considérée.

Le choix d'un dérivé du bithiophène comme chromophore a permis de satisfaire à plusieurs besoins en même temps, il absorbe à 337nm, la longueur d'onde du laser et est électroactif. Il permet d'absorber l'énergie laser et de doter la monocouche du système redox réversible nécessaire à sa caractérisation.

Choix du groupement terminal :

L'incorporation d'un groupement terminal peut servir plusieurs objectifs. Etant donné sa position au sein de la molécule, le groupement terminal va définir les propriétés de surface et régir les interactions entre l'analyte et la monocouche.

Dans ce travail, afin de se focaliser sur l'étude de la méthode et des phénomènes mis en jeu, il faut se placer dans un cas simple, c'est pourquoi le groupement terminal utilisé est un méthyle.

En choisissant un groupement terminal spécifique, il devient possible de jouer sur les propriétés de surface dans le but de :

- Optimiser le caractère hydrophile/hydrophobe en fonction des analytes à étudier.
- Favoriser les processus d'ionisation par insertion de groupement donneur ou accepteur de protons par exemple.
- Permettre une purification grâce à des interactions spécifiques avec une classe de molécules présente dans un échantillon complexe déposé puis rincé.

La molécule utilisée :

La molécule **1** créée en tenant compte de tous les choix précédemment énoncés est représentée Figure 2.4, elle permet d'élaborer des monocouches constituées de chromophores organiques bithiophéniques électroactifs reliés par une chaîne "thioalkyle" linéaire sur le support d'or.

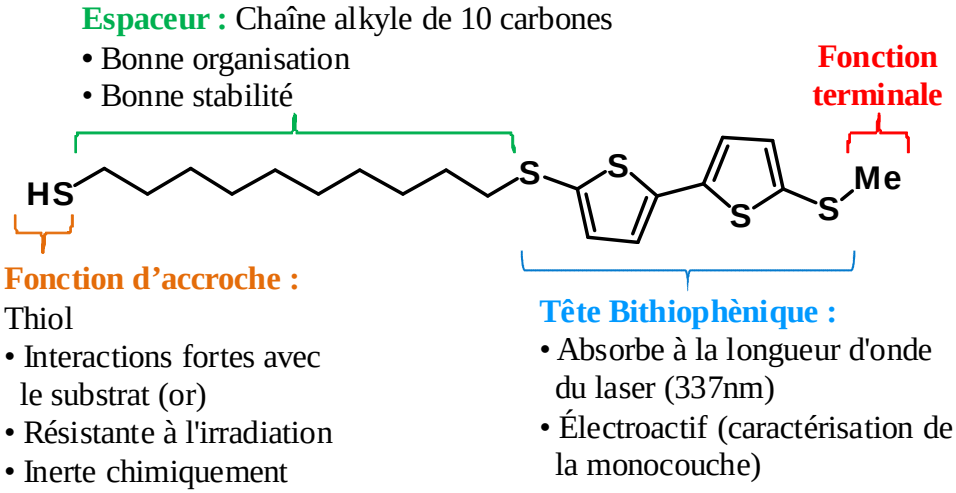


Figure 2.4 : Structure de la molécule précurseur utilisée.

2.3 Synthèse dirigée

La synthèse de cette molécule utilise le 2,2'-bithiophène ***2*** comme précurseur synthétisé précédemment au laboratoire à partir du 2-bromothiophène.[49] L'introduction du groupement méthyle d'une part, et de la chaîne alkyle thioacétylée d'autre part, est réalisée au laboratoire[50] par libération des thiolates en conditions douces.[51]

2.3.1 Synthèse du 5,5'-bis(3-cyanoéthylsulfanyl)-2,2'-bithiophène

La synthèse du 5,5'-bis(3-cyanoéthylsulfanyl)-2,2'-bithiophène ***3*** est réalisée à partir du bithiophène ***2*** avec des rendements supérieurs à 80 %. La première étape consiste en un échange hydrogène-métal par addition de n-butyllithium à basse température. Ensuite, l'ajout de soufre conduit à un dérivé dithiolate, qui réagit avec du 3-bromopropionitrile pour former le produit dicyanoéthyle ***3*** (Schéma 2.1).

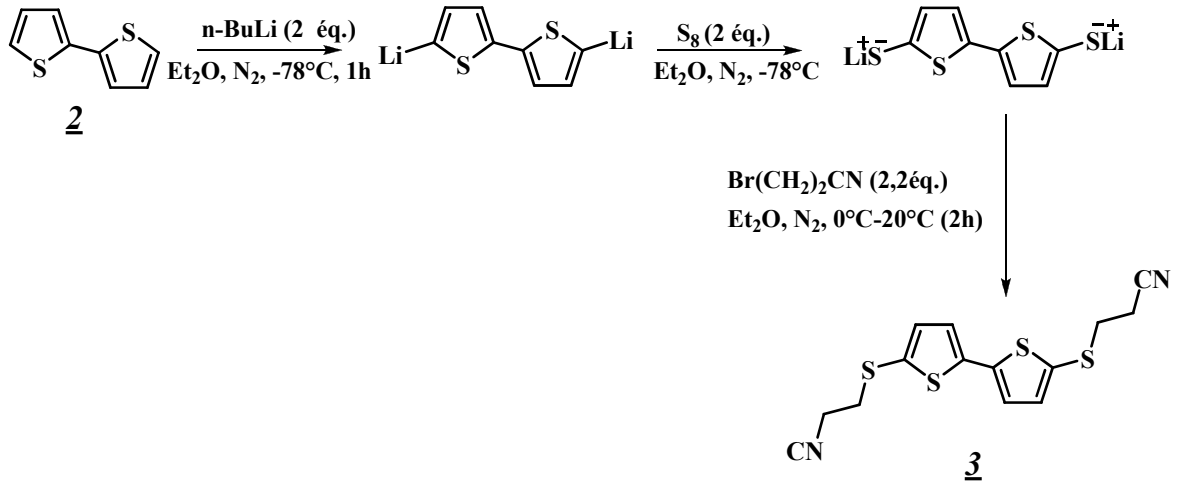


Schéma 2.1 : Synthèse du 5,5'-bis(3-cyanoéthylsulfanyl)-2,2'-bithiophène

2.3.2 Déprotection du groupement cyanoéthyle

L'action d'un seul équivalent d'hydroxyde de sodium sur le composé ***3*** permet de libérer un seul des deux groupes thiolates protégés par le groupe cyanoéthyle. La méthylation du thiolate à l'aide d'iodométhane conduit majoritairement au produit monométhylé ***4***, mélangé au produit diméthylé ***4'***. Ces deux produits, facilement séparables par chromatographie sur gel de silice, sont obtenus avec des rendements respectifs de 78 % et 11 % (Schéma 2.2).

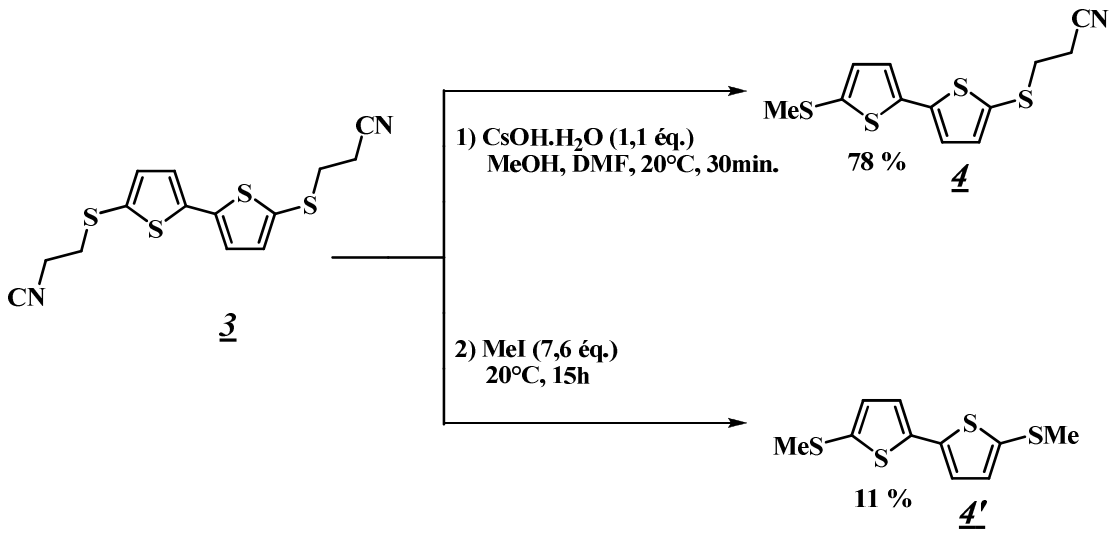


Schéma 2.2 : Déprotection du groupement cyanoéthyle

2.3.3 Préparation de la chaîne alkyle thioacétylée

Le thioacétate de S-(10-bromodécyle) ***5*** est obtenu par substitution du brome par l'anion thioacétate. La monosubstitution est réalisée avec de bons rendements si on utilise un large excès de dibromoalcane (Schéma 2.3).

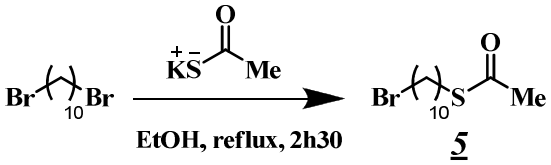


Schéma 2.3 : Préparation de la chaîne alkyle thioacétylée

2.3.4 Introduction de la chaîne alkyle thioacétylée

La fonctionnalisation du composé ***4*** est réalisée, via une substitution nucléophile du groupement thiolate généré à l'issue de la déprotection avec CsOH, sur la chaîne alkyle thioacétylée. Ainsi, la déprotection du groupe cyanoéthyle dans le composé ***4*** avec l'hydroxyde de césium, suivie d'une réaction d'alkylation avec le thioacétate de S-(10-bromodécyle) ***5*** fournit le thioester ***6*** avec un rendement de 89 %. (Schéma 2.4)

2.3.5 Déprotection du thioester

La transformation de la fonction thioester en thiol peut être réalisée selon deux méthodes de déprotection différentes.

- La première utilise l'hydroxyde de césium, comme dans le cas des dérivés du ferrocène mais le mélange réactionnel, après évaporation des solvants, est traité, avant extraction, par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (1 M). Dans ce cas, le rendement de la déprotection est de 51 %.
- L'autre méthode, décrite par Yang,[52] est une réduction par l'aluminohydrure de lithium. Cette méthode est avantageuse puisqu'elle permet d'accéder très rapidement au thiol ***1*** à partir du composé protégé ***6*** avec un rendement de 70 % et ne nécessite aucune purification après traitement. (Schéma 2.4).

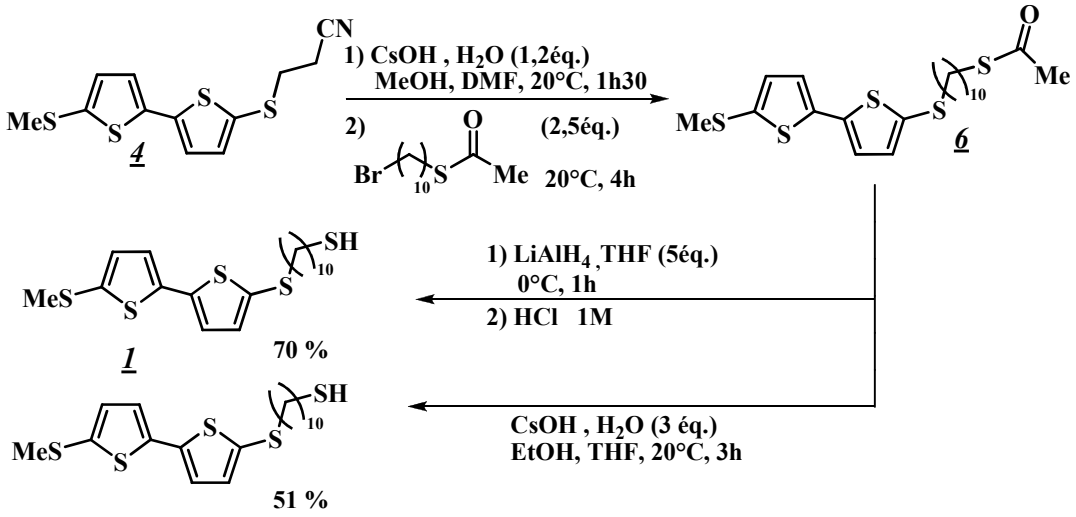


Schéma 2.4 : Introduction de la chaîne alkyle thioacétylée et déprotection du thioester

2.4 Caractérisation des molécules cibles en solution

Les caractéristiques attendues sont confirmées par le spectre d'absorption UV-visible de la molécule en solution pour l'absorption à 337 nm et par la caractérisation électrochimique par voltampérométrie cyclique (cf. 3.3.1) pour ses propriétés électroactives.

2.4.1 Etude par spectrophotométrie UV-visible

Le but est d'estimer l'aptitude de la molécule d'adsorbat à absorber le rayonnement laser en déterminant le coefficient d'absorption molaire de celle-ci à 337 nm, longueur d'onde du laser utilisé. Le spectre optique est obtenu avec un spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda 950 et la solution est préparée dans le dichlorométhane à une concentration de l'ordre de 0.1 mM.

La Figure 2.5 présente la caractéristique optique du dérivé bithiophénique. La transition électronique caractéristique du chromophore bithiophénique, observée à 340 nm, est en accord avec les résultats de la littérature.[53]

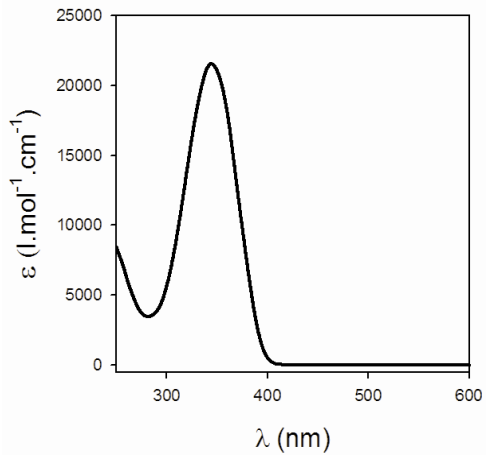


Figure 2.5 : Spectre d'absorption UV-visible de la molécule précurseur en solution.

Le coefficient d'extinction molaire ε à 337 nm est estimé à 20 000 $M^{-1}.cm^{-1}$.

2.4.2 Etude par voltampérométrie cyclique

L'étude électrochimique des molécules cibles a permis de caractériser la stabilité redox des transferts électroniques mis en jeu et d'estimer le(s) potentiel(s) redox afin de comparer les résultats obtenus avec ceux de la littérature. Le potentiostat utilisé est un potentiostat EGG PAR 273A. La cellule électrochimique comprend trois électrodes. L'électrode de travail est une électrode millimétrique en platine, la contre-électrode, un fil en platine et l'électrode de référence, une quasi-référence calibrée en fonction du couple redox Fc^+/Fc.

Les mesures ont été effectuées dans le dichlorométhane en présence de sel de fond, l'hexafluorophosphate de tétrabutylammonium (Bu_4NPF_6, 0.1M). Le voltampérogramme

caractéristique de la molécule cible est représenté sur la Figure 2.6. En accord avec la littérature,[54] le premier transfert électronique réversible est situé vers 0,49 V vs Fc^+/Fc.

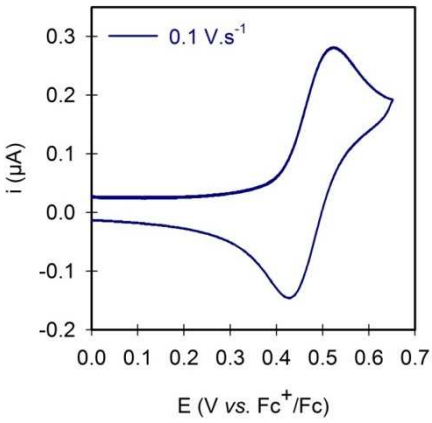


Figure 2.6: Voltampérométrie cyclique de la molécule précurseur en solution.

3 Elaboration et contrôle des surfaces modifiées pour le DIAMS

Lors de la mise au point de la technique de DIAMS-MS, la première étape a été de définir le cahier des charges des surfaces utilisées. L'étape qui vient directement après consiste à faire le point sur le protocole de fabrication et à élaborer les surfaces en question.

3.1 Différents substrats et méthodes de préparation des SAMs

L'élaboration de monocouches organiques auto-assemblées est connue et maîtrisée depuis de nombreuses années. Les SAMs de composés organosulfurés (thiols, disulfures, sulfures) se forment spontanément sur le substrat par adsorption depuis une phase liquide ou vapeur. Les critères importants qui dépendent de l'application pour laquelle la SAM est utilisée restent le type de support et de la méthode de préparation utilisés.

3.1.1 Substrats

La surface sur laquelle une SAM se forme est appelée le "substrat". Les types de substrat vont des surfaces planes (lamelles de verre ou de silicium recouvertes d'une couche mince de métal, feuilles métalliques ou monocristaux) aux nanostructures fortement courbées (colloïdes, nano-cristaux ou des nano-tiges). Dans le cadre de l'application en DIAMS-MS, ce sont les surfaces planes qui nous intéressent.

Le plus commun des substrats plans pour les SAMs d'alkanethiols sont des films minces de métal déposés sur des lamelles de silicium, de verre, de mica, ou de plastique. Ces supports sont faciles à préparer par les méthodes de dépôt physique en phase vapeur (PVD) par évaporation thermique,

bombardement d'électrons, pulvérisation cathodique ou impact de laser pulsé,[55] par électrodéposition,[56] ou par des méthodes de dépôt de métal par voie chimique.[57-61]

Les surfaces utilisées en DIAMS-MS sont des plaques de verres recouvertes d'or par PVD par évaporation thermique.

Dépôt de films minces sur verre ou silicium par PVD.

La méthode de dépôt d'une couche mince par PVD consiste à chauffer le matériau jusqu'à sa sublimation. Le processus d'évaporation d'un matériau dépend de plusieurs facteurs comme la température, la pression et la pression de vapeur du matériau. La sublimation est un passage de l'état solide à l'état gazeux sans passer par une phase liquide, elle intervient lorsqu'à la température de fusion de la matière chauffée, qui dépend notamment de la pression ambiante, cette pression est inférieure à la pression de vapeur du matériau. La sublimation est atteinte en chauffant sous vide le métal à déposer, les atomes qui passent en phase gazeuse atteignent le substrat sur lequel ils se condensent.

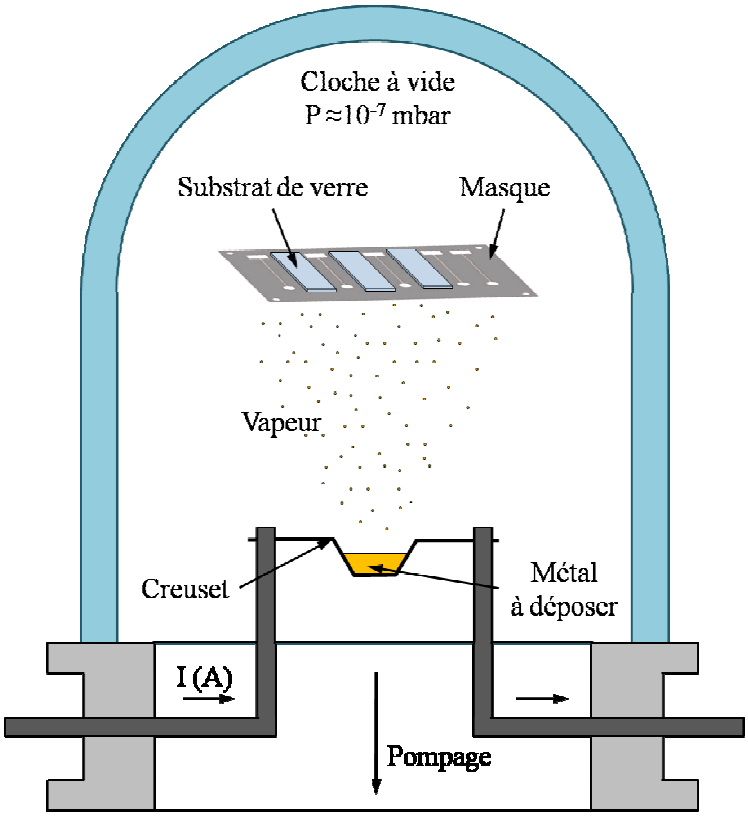


Figure 2.7 : Schéma de fonctionnement d'un thermoévaporateur qui permet de réaliser des dépôts physiques en phase vapeur

La Figure 2.7 décrit le principe d'une installation d'évaporation par sublimation thermique, ou thermoévaporation.

Un vide suffisant dans l'enceinte (10^{-2} à 10^{-5}Pa) garantit un dépôt de bonne qualité car le libre parcours moyen des particules est suffisant pour leur permettre de se déposer sur le substrat. Les particules se lient au substrat par affinité chimique, principalement avec l'oxygène. Les verres et la silice ont beaucoup de sites d'accrochage, c'est pourquoi ils sont préférentiellement utilisés.

Au niveau de l'interface substrat/film mince, les premières couches d'atomes forment un matériau composite : alliage dans le cas du dépôt d'un métal sur un autre métal, ou oxyde dans le cas du dépôt d'un métal sur un substrat verre ou céramique. Ce composite participe grandement à l'adhérence de la couche sur le substrat. Ainsi, déposer un film mince d'un métal qui ne s'oxyde pas facilement, comme l'or, requiert le dépôt d'une première couche mince d'adhésion en titane, chrome ou nickel (1-5 nm) puis de la couche principale (10-200 nm).

Par exemple, un dépôt d'or sera effectué sur verre par l'intermédiaire d'une couche d'accrochage de chrome. Le chrome adhère au verre par l'intermédiaire de la formation d'une couche d'oxyde de chrome, alors que l'or adhère au chrome grâce à la formation d'un alliage chrome-or.

Pourquoi l'or est il le standard?

Principalement pour deux raisons :

- l'or forme de bonnes SAMs
- c'est historiquement le support le plus étudié

En fait, pour de nombreuses applications, l'or pourrait ne pas être le meilleur support, mais il possède cinq caractéristiques qui font que c'est un bon choix de substrat pour l'étude des SAMs :

- l'or est facile à obtenir, à la fois comme un film mince et en tant que colloïde. Il est simple de préparer des films minces d'or par PVD, pulvérisation cathodique, ou par électrodéposition.
- il est facile à déposer sous forme d'un motif voulu par une combinaison d'outils de lithographie ou par gravures chimiques.
- c'est un métal inerte: il ne s'oxyde pas à des températures au-dessous de son point de fusion, il ne réagit pas avec l'oxygène atmosphérique, il ne réagit pas avec la plupart des produits chimiques. Ces propriétés permettent de manipuler dans des conditions atmosphériques. L'or lie les thiols avec une affinité élevée,[2] et puisque les thiols ont une forte affinité pour l'or, ils peuvent également déplacer facilement des matériaux adsorbés sur la surface.
- les films minces d'or sont des substrats utilisés pour un certain nombre de spectroscopies et techniques d'analyse comme la microbalance à cristal de quartz (QCM).

- l'or est compatible avec l'analyse de divers analytes, les molécules peuvent y adhérer sans craindre de toxicité. Les SAMs formées à partir de thiols sur l'or sont stables pour des périodes allant de quelques jours à plusieurs semaines (voir section 8.4).

D'autres matériaux offrent des propriétés similaires, mais les propriétés des SAMs formées sur ces matériaux ont été moins étudiées que sur l'or. Les substrats de SAMs d'alkanethiols les plus étudiés après l'or sont le cuivre et l'argent, mais ils s'oxydent au contact de l'air et l'argent est toxique pour certaines molécules biologiques.[6, 62, 63] Seul le palladium semble pouvoir être une alternative à l'or dans ce domaine, il est biocompatible et s'oxyde difficilement à température ambiante. C'est une bonne alternative pour certaines applications, et il est même meilleur que l'or pour d'autres.

3.1.2 Méthode d'élaboration de la SAM

Le protocole classique de préparation des SAMs sur l'or, l'argent, le palladium, le mercure, ou autre, consiste à immerger un substrat fraîchement préparé ou nettoyé dans une solution de thiols (1-10 mM) à température ambiante. L'immersion peut durer de quelques minutes à quelques heures, un bon recouvrement par l'adsorbat est obtenu rapidement (de quelques millisecondes à quelques minutes) à partir de solutions millimolaires, mais l'influence du temps d'immersion reste encore mal connue. Globalement, cette procédure permet de donner des interfaces organiques bien organisées et reproductibles. Néanmoins, des études ont par la suite permis de l'optimiser afin de minimiser les défauts dans les SAMs et d'optimiser l'ordre dans ces systèmes.[64] Il existe notamment un certain nombre de facteurs expérimentaux qui peuvent affecter la structure de la SAM et sa vitesse de formation:

Le solvant. L'éthanol est le solvant le plus largement utilisé pour la préparation de SAM. Mais le taux de recouvrement maximum et la mouillabilité des SAMs formées à partir de solutions d'alkanethiols dans d'autres solvants (tétrahydrofuranne, le diméthylformamide, l'acétonitrile, cyclooctane, toluène, dichlorométhane…) ne varient pas sensiblement de ceux qui sont formés à partir de solutions éthanoliques.[64]

La température. Les SAMs peuvent parfaitement se former à température ambiante, cependant, utiliser des températures supérieures permet d'améliorer la cinétique de formation et de réduire le nombre de défauts.[65, 66] De plus, des températures élevées peuvent aider à la formation de la monocouche, en aidant par exemple la surface du substrat à désorber les impuretés présentes, ou en apportant de l'énergie au système afin de franchir des barrières d'activation de processus tels que la réorganisation ou le réarrangement des chaînes latérales de l'adsorbat.

La concentration et le temps d'immersion. Ces deux paramètres sont inversement proportionnels: de faibles concentrations de thiols en solution augmentent le temps d'immersion nécessaire.[64, 67] La plupart des études suggèrent que les propriétés moyennes des SAMs formées à partir de solutions

d'alkanethiols milli-molaire (mouillabilité, taux de recouvrement,…) ne changent pas de façon significative au delà de 12-18 h d'immersion. Des études menées au laboratoire tendraient à montrer que plus le temps d'immersion augmente, plus la population de thiols disulfures adsorbés serait importante vis-à-vis des espèces monosulfures.

La teneur en oxygène de la solution. Il y a peu de connaissances sur les effets que l'oxygène présent dans la solution peut avoir sur la vitesse de formation et la structure des SAMs. Des données empiriques indiquent que le dégazage du solvant avec un gaz inerte avant de préparer la solution de thiols et le maintien d'une atmosphère inerte sur la solution d'immersion améliore la reproductibilité des propriétés de la SAM.[6, 13] Toutes les monocouches sont réalisées en boîte à gants afin d'éviter des interférences possibles avec l'oxygène ou l'eau.

La propreté de substrat. Les substrats conservés à l'aire libre adsorbent diverses molécules présentent dans le milieu ambiant. La formation des SAMs sur de tels substrats est essentiellement gouvernée par un processus d'échange: les thiols déplacent du substrat les différents matériaux adsorbés et se fixent à leur place. La fixation des thiols demande donc en premier lieu la désorption des contaminants et des impuretés et leur vitesse de désorption affecte alors la cinétique de la formation de la SAM.

Pour obtenir des SAMs aux propriétés reproductibles, les substrats doivent avoir été préparés moins d'une heure avant l'immersion dans la solution de thiols ou avoir été nettoyés avec des solutions fortement oxydantes (mélange H_2SO_4:H_2O_2).

3.2 Modification de surface

En pratique, la surface de départ est une lamelle de verre qui va être successivement recouverte d'une couche mince d'or puis de la monocouche organique auto-assemblée. En vue de caractériser les monocouches formées par électrochimie, deux types de substrats de formes différentes seront préparés et immergés en parallèle dans la solution de thiols. Des lamelles de verres carrés qui serviront de surfaces de dépôt pour la spectrométrie de masse et des lamelles de verre rectangulaires qui serviront d'électrodes de travail lors de la caractérisation électrochimique de la monocouche.

3.2.1 Préparation du substrat (Dépôt de la couche d'or)

Après avoir successivement étés rincés à l'eau, à l'acétone et à l'éthanol, les substrats sont placés sur un masque qui permet d'obtenir des surfaces d'or de géométrie désirée et adaptée à leur utilisation (Figure 2.8). Par exemple, les surfaces d'or destinées à une utilisation en spectrométrie de masse sont dessinées de façon à correspondre parfaitement aux puits de la plaque MALDI, de même que les surfaces utilisées en voltampérométrie cyclique sont adaptées à une utilisation en cellule électrochimique.

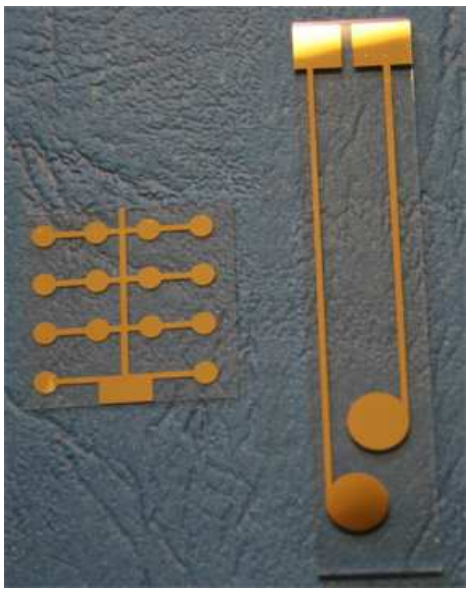


Figure 2.8 : Photo des différentes surfaces d'or utilisées, à gauche, la plaque adaptée à une utilisation en DIAMS-MS et à droite celle prévue pour la voltampérométrie cyclique.

L'ensemble masque plus plaques de verre est installé dans l'appareil de dépôt PVD (Figure 2.7) face aux deux creusets en tungstène contenants l'un du chrome et l'autre de l'or. Ensuite, le chrome puis l'or sont chauffés sous vide et évaporés. La matière évaporée par effet joule est recueilli par condensation sur les surfaces à recouvrir jusqu'à obtenir une épaisseur de 5 nm de chrome puis de 50 nm d'or.

Les substrats sont ramenés à l'atmosphère ambiante, immédiatement réintroduits en boite à gants et manipulés sous atmosphère inerte (Argon, H_2O < 2 ppm et O_2 < 2 ppm).

3.2.2 Elaboration de la SAM

Les substrats fraichement préparés sont immergés pendant 48 heures dans une solution de thiols à déposer dans du dichlorométhane 1 Mm (Figure 2.9). Cette étape permet la fixation des molécules d'adsorbat sur la surface et la formation de la monocouche. L'immersion est réalisée en boite à gants et à température ambiante pour garantir une reproductibilité maximale des expériences ultérieures. Au terme des deux jours d'immersion, les plaques destinées aux expériences de spectrométrie de masse, appelées plaques DIAMS et les électrodes, celles destinées à l'électrochimie, sont sorties de la solution, rincées au dichlorométhane puis sont caractérisées.

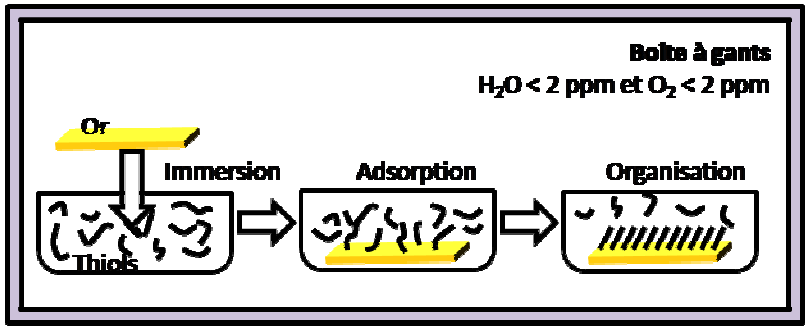


Figure 2.9 : Schéma de principe représentant l'étape de recouvrement de la surface d'or par les molécules d'adsorbat.

3.2.3 Modification de la cible MALDI pour travailler en DIAMS-MS.

Les plaques DIAMS sont sorties de la boite à gants, rincées avec du dichlorométhane propre et directement collées sur une cible MALDI classique, dans notre cas une cible Brucker Scout 384, avec de la colle forte (Figure 2.10). Le fonctionnement de l'appareil prévoit qu'un haut potentiel soit appliqué sur la cible MALDI, pour que la conduction soit assurée entre la cible et l'or de la plaque DIAMS, une pate conductrice de carbone est déposée sur le bord de la plaque DIAMS, à cheval entre la cible et la surface d'or.

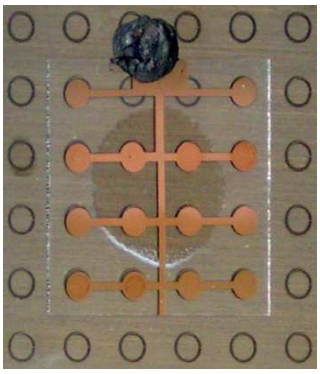


Figure 2.10 : Photo de la plaque DIAMS collée sur la cible MALDI.

La cible avec les plaques DIAMS collées à sa surface est mise sous vide. Ainsi, la colle et la pate conductrice dégazent une première fois, ce qui limitera le temps de pompage supplémentaire qui apparaitrait lors de la première insertion de la cible dans le spectromètre.

3.3 Contrôle de la modification de surface

Pour s'assurer de la qualité des monocouches, elles sont systématiquement caractérisées par voie électrochimique.

3.3.1 Mesures par les méthodes électrochimiques

L'électroactivité des monocouches permet une caractérisation simple du matériau par voltampérométrie cyclique. Cette technique est fiable et très facile à mettre en œuvre.

Dans un premier temps, elle permet de s'assurer que les molécules soient bien fixées sur le substrat, en effet, les comportements électrochimiques d'une molécule en solution et d'une molécule immobilisée ou adsorbée sur une électrode sont très différents. Ensuite elle apporte des informations en termes d'organisation, de stabilité et d'estimation de taux de recouvrement (Γ).

3.3.1.1 La voltampérométrie cyclique :

La voltampérométrie cyclique est une technique électrochimique basée sur l'application d'une rampe de potentiel entre une électrode de travail et une électrode de référence.

Alors que le potentiel appliqué est balayé avec une vitesse constante, en $mV.s^{-1}$, la réponse en courant est mesurée entre l'électrode de référence et une contre-électrode. La courbe intensité-potentiel en résultant est appelée voltampérogramme.

Classiquement, l'enregistrement des voltampérogrammes est réalisé sur un ou plusieurs cycles de potentiel, c'est-à-dire que le potentiel est balayé d'une valeur V_1 à une valeur V_2 puis dans l'autre sens pour revenir à un potentiel V_1. Si au cours de ce cycle, une des espèces en solution atteint son potentiel d'oxydation ou de réduction alors elle subit une réaction d'oxydoréduction :

$$Ox + n\ e^- \rightleftarrows Red \qquad (2.1)$$

De plus si cette réaction est réversible, alors l'espèce revient à son état initial lors du balayage retour.

La voltampérométrie cyclique peut aussi bien être utilisée pour l'étude d'espèces en solutions que d'espèces immobilisées sur surface.

Dans le cas d'une réaction d'oxydoréduction en solution, la réaction est accompagnée d'un déplacement des espèces électroactives qui peut être attribué à trois phénomènes différents :

- la migration : déplacement des ions sous l'effet du champ électrique ;
- la diffusion : déplacement de matière par diffusion des régions les plus concentrées vers les régions les moins concentrées. La réaction électrochimique modifie les concentrations en espèces actives au voisinage de l'électrode et créé donc de la diffusion;
- la convection : déplacement de matière principalement par agitation mécanique de la solution.

En réalité, un électrolyte support est ajouté à la solution et permet d'en augmenter la conductivité, d'y assurer le transport de charges et de minimiser la migration des espèces électroactives. De plus,

si la solution n'est pas agitée, la convection est négligeable et le transport de matière des espèces électroactives se fait uniquement par diffusion. Dans ce cas, la zone autour de l'électrode dans laquelle se sont établis les gradients de concentration et le flux de diffusion, est appelée couche de diffusion.

En voltampérométrie cyclique classique, la distance entre l'électrode de travail et la paroi de la cellule est très supérieure à cette couche de diffusion, le régime de diffusion est donc appelé régime de diffusion semi-infini. Le voltampérogramme observé a une allure semblable à celle présentée sur la Figure 2.11-A, caractéristique d'une réaction d'oxydoréduction réversible en solution et caractérisé par :

- une corrélation linéaire entre les valeurs de courants de pic d'oxydation et de réduction et $v^{1/2}$, la racine carré de la vitesse de balayage du potentiel;
- un potentiel de pic d'oxydation supérieur au potentiel de pic de réduction;
- pour un système rapide, l'écart entre ces deux potentiels est : $E_{pa} - E_{pc} = 56,5/n$ mV à 25°C.

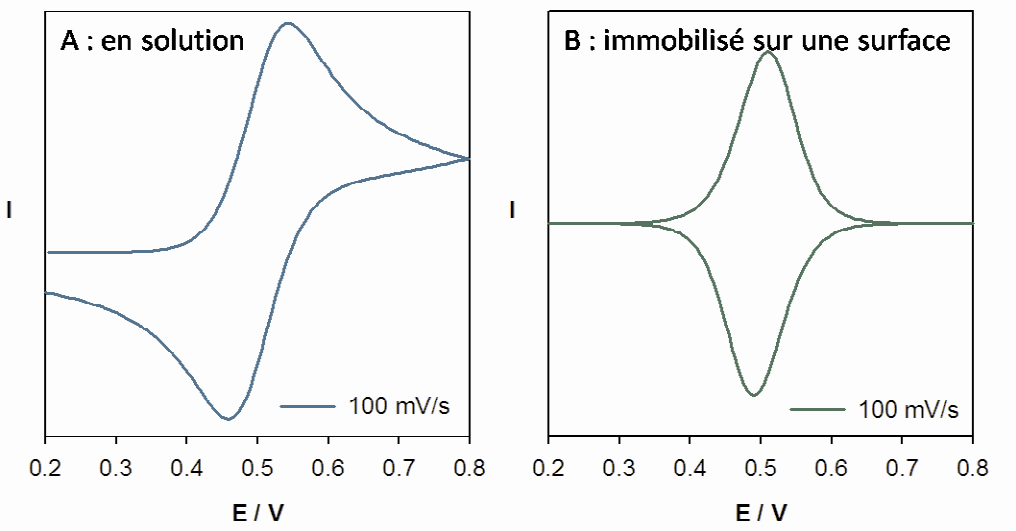


Figure 2.11 : Allures des voltampérogrammes attendues pour une molécule en solution A : soit en conditions de diffusion semi-infinie et pour un système ou les molécules sont soit adsorbées, soit sous forme de couche mince B

Le cas de la réaction d'une molécule immobilisée sur surface est analogue à une réaction en couche mince (lorsque la réaction est confinée dans un petit volume proche de l'électrode de travail). Dans ces conditions, le voltammogramme typiquement obtenu (Figure 2.11-B) est caractérisé par :

- Un courant de pic I_p de la vague voltampérométrique proportionnel à la vitesse de balayage du potentiel;
- Des pics d'oxydation et de réduction symétriques.

D'autre part, un calcul simple permet d'estimer le taux de recouvrement Γ de la surface, ce qui correspond au nombre de molécules électroactives fixées par unité de surface, grâce à la relation :

$$\Gamma = Q/nFS$$

avec :

Q : aire sous le pic anodique ou cathodique ce qui correspond à la quantité de courant échangé pour oxyder ou réduire la totalité des molécules de la monocouche.

n : nombre d'électrons qui interviennent dans la réaction d'oxydoréduction.

F : constante de Faraday (F = 96 484,6 $C.mol^{-1}$)

S : surface de l'électrode

3.3.1.2 Caractérisation des plaques DIAMS.

La sélection d'un dérivé du bithiophène comme chromophore a autant été motivée pour son coefficient d'extinction molaire à 337nm que pour ses propriétés électrochimiques, à savoir, sa première oxydation totalement réversible. Cette dernière propriété permet la caractérisation de la monocouche par voltampérométrie cyclique et de rendre compte de la stabilité et de l'organisation de la SAM ainsi que du taux de recouvrement de la surface.[37] Le motif électroactif soufre-bithiophène-soufre peut s'oxyder deux fois (Figure 2.12). Le potentiel de demi-vague de la première oxydation, parfaitement réversible, se situe à $E_{1/2}$ = + 0.49V par rapport au couple Fc/Fc^+ du ferrocène.[54]

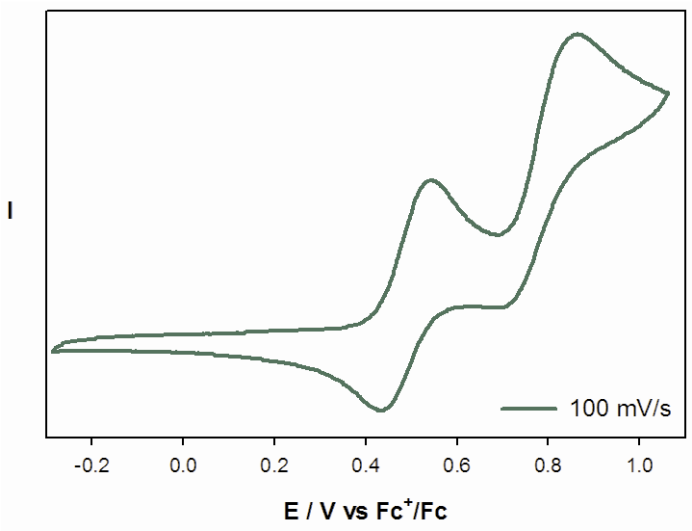


Figure 2.12 : Voltampérogramme cyclique des deux vagues d'oxydation de la molécule d'adsorbat en solution.

La vérification par voltampérométrie cyclique des monocouches formées lors l'immersion dans la solution de thiols est réalisée en boite à gants immédiatement après avoir sorti les plaques DIAMS et les électrodes. Les mesures sont réalisées avec un potentiostat EGG PAR 273A, en immergeant

les électrodes dans une solution 0,1 molaire d'électrolyte support de tetrabutylammonium hexafluorophosphate (Bu_4NPF_6) dans le dichlorométhane. La mesure requiert l'utilisation de trois électrodes différentes :

- une contre-électrode plate en acier inoxydable
- un fil d'argent comme électrode de référence
- une électrode de travail en or pour le blanc et les électrodes recouvertes de la monocouche et préparées en même temps que les plaques DIAMS lorsqu'il s'agit de contrôler la monocouche formée.

Les monocouches sont systématiquement caractérisées avant d'utiliser les plaques DIAMS.
Les voltampérogrammes de la première oxydation sont enregistrés pour plusieurs vitesses de balayage du potentiel (Figure 2.13).

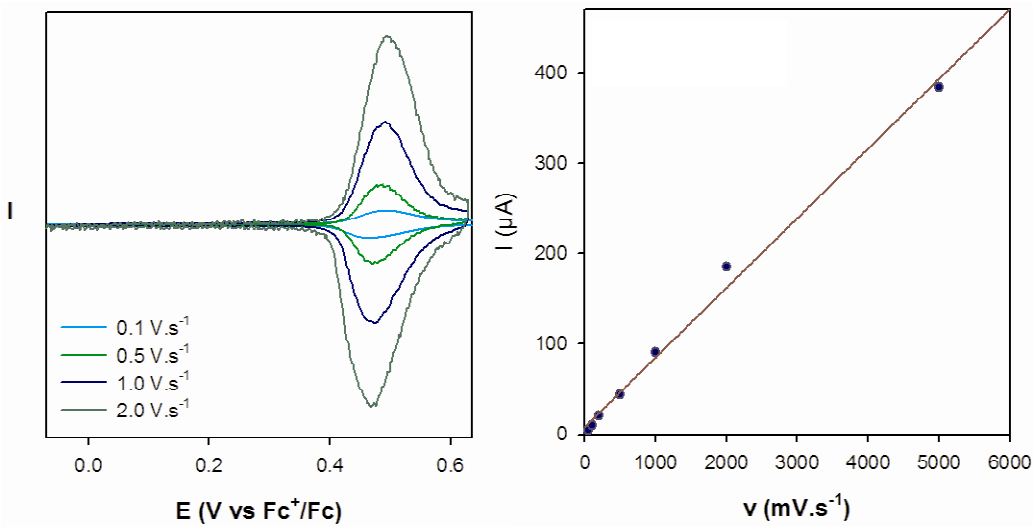


Figure 2.13 : Voltampérogramme cyclique de la monocouche adsorbée sur une électrode d'or pour plusieurs vitesses de balayage et évolution linéaire de l'intensité du pic d'oxydation en fonction de ces vitesses.

La réponse électrochimique de la SAM atteste de l'immobilisation du système redox à la surface de l'électrode d'or :

- L'intensité de pic évolue linéairement avec la vitesse de balayage du potentiel.
- Les potentiels de pic sont égaux en oxydation et en réduction.

D'autre part, il est possible de calculer le taux de recouvrement et d'évaluer la stabilité de la monocouche à faible vitesse de balayage.

La surface sur laquelle est déposée la monocouche est de 0.2 cm^2 et la réaction d'oxydoréduction utilisée est mono-électronique, il a donc été possible, à partir de l'aire sous les pics d'oxydoréduction, de calculer les taux de recouvrement, classiquement de l'ordre de 2.10^{-10} $mol.cm^{-2}$.

3.3.2 Imagerie de surface par Microscopie à Force Atomique (AFM)

La microscopie à force atomique (AFM) est une technique qui permet de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon, elle est basée sur la mesure de l'interaction entre la surface à étudier et une pointe très fine fixée à l'extrémité d'un ressort-lame. Au fur et à mesure que la pointe balaie l'échantillon, le relief de la surface induit une flexion plus ou moins importante de la lame. La mesure de cette déformation permet de tracer le profil de la surface, cette mesure s'effectue le plus souvent à partir de la déviation d'un faisceau lumineux réfléchi sur la lame. Ensuite, la juxtaposition de plusieurs profils permet de reconstituer une image de la surface.

Pour avoir une idée de la topographie de la surface des plaques DIAMS, l'évolution de l'état de surface des plaques au cours de leur élaboration est suivie par AFM en réalisant des images d'une plaque DIAMS, mais aussi de la lamelle de verre nue puis recouverte d'or (Figure 2.14).

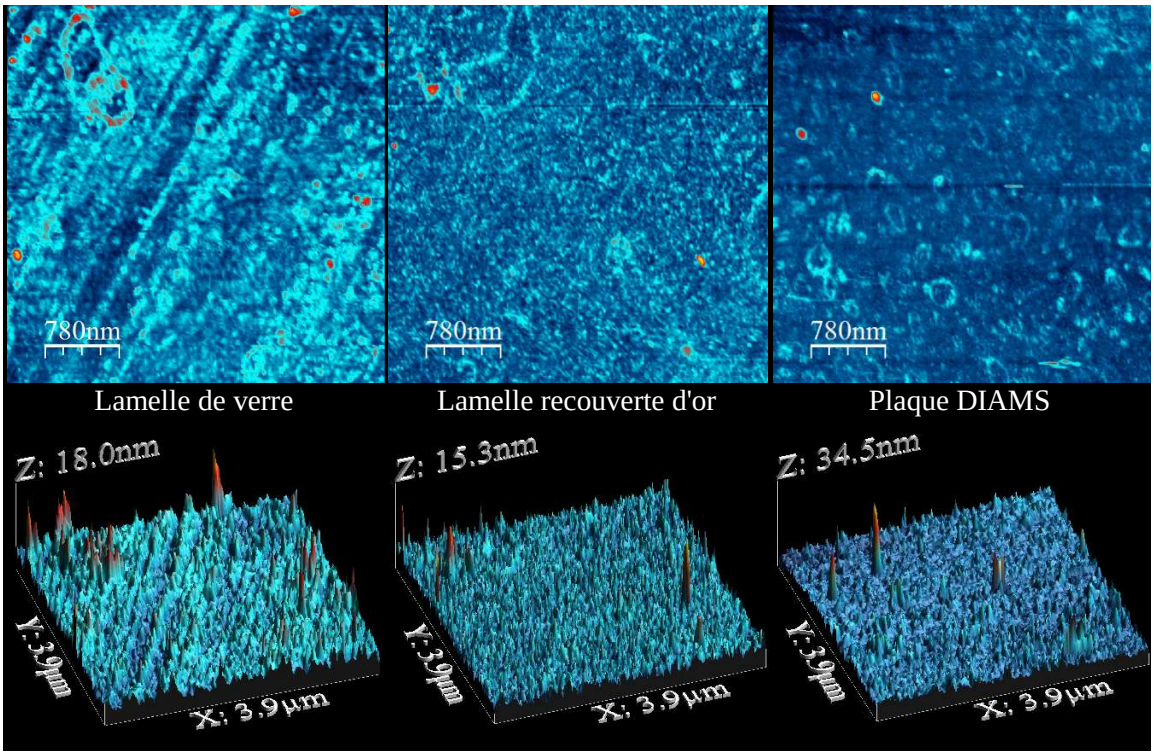


Figure 2.14 : Topographie de la lamelle de verre nue, recouverte d'or et de la plaque DIAMS par microscopie à force atomique.

Ces images ainsi que l'étude des trois profils (Figure 2.15) montrent que la surface de la lamelle de verre, rugueuse, est lissée lors du dépôt de la couche d'or. Ainsi la surface sur laquelle sera fixée la

monocouche est homogène et il apparait d'ailleurs qu'après recouvrement par la SAM, cette homogénéité de surface est conservée.

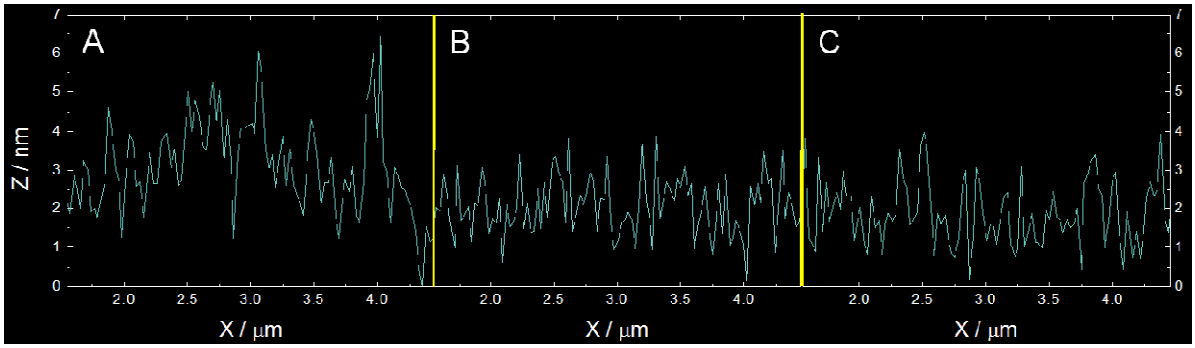


Figure 2.15 : profils de la surface de la lamelle de verre nue (A), recouverte d'or (B) et de la plaque DIAMS (C) par AFM.

4 Etudes de Faisabilité de la méthode DIAMS/TOF

Il a été montré par la voltampérométrie et la microscopie à force atomique que les monocouches formées sont stables et homogènes. La plaque DIAMS remplie toutes les caractéristiques requises pour être utilisée comme support à la désorption ionisation laser.

4.1 Exemples de composés étudiés en DIAMS-MS.

4.1.1 Dépôt des échantillons sur les plaques DIAMS

La méthode de dépôt avec la technique DIAMS est similaire à la méthode de la goutte séchée utilisée en MALDI. L'échantillon en solution, classiquement une goutte de la solution d'échantillon (sans matrice) de 0,5 à 1 µL, est déposé sur la surface modifiée au niveau d'une position choisie. Le solvant est évaporé à l'air libre et les molécules dissoutes forment un dépôt solide à la surface de la plaque DIAMS.

4.1.2 Exemple de composés étudiés en DIAMS-MS

Afin de mettre en évidence le potentiel de la technique, un large panel d'échantillons a été étudié en DIAMS, comprenant des composés aussi différents que des peptides, des petits polymères, des acides gras, des alcaloïdes mais aussi des sels, utilisés plus loin pour des études énergétiques.[68-70]

4.1.2.1 PEG

Dans un premier temps, l'étude de polyéthylènes glycols permet d'obtenir un spectre de masse quasiment vierge d'ions parasites dans les bas m/z (Figure 2.16). Dans ce cas, la cationisation par les ions sodium et potassium est largement majoritaire.

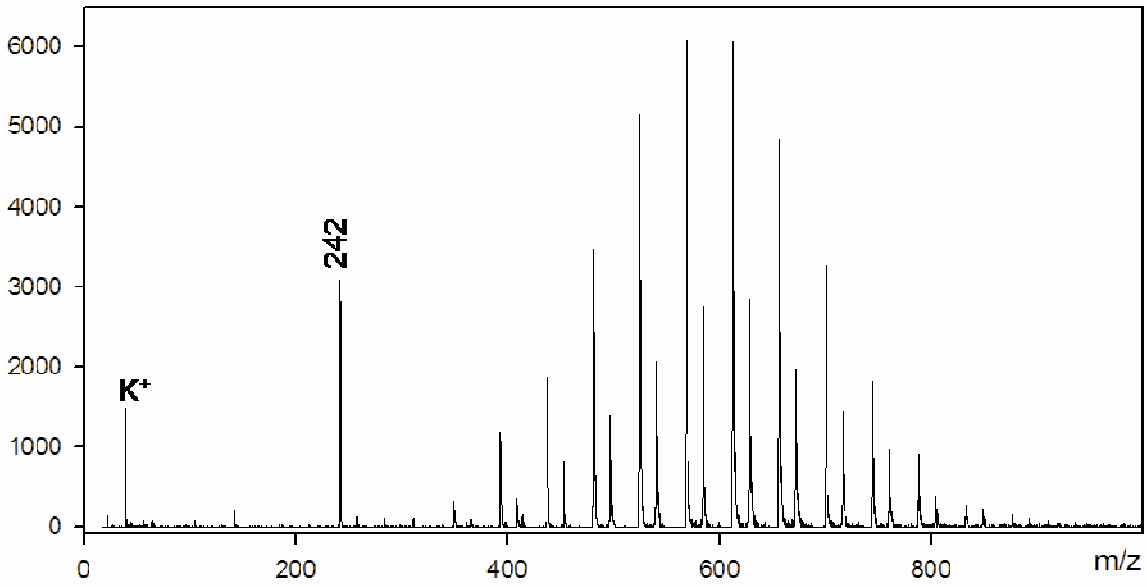


Figure 2.16 : Spectre de masse DIAMS-MS d'un polyéthylène glycol 600, les deux distributions correspondent aux cationisations par les ions sodium et potassium. [mode réflecteur positif; laser 65%; 100 accumulations]

La présence d'un ion parasite m/z 242 est remarquable, cet ion est très souvent présent sur les spectres de masse DIAMS et il a été attribué à l'utilisation abondante de tetrabutylammonium hexafluorophosphate (Figure 2.17) dans la boite à gants où sont fabriquées les SAMs et comme sel de fond en voltampérométrie qui donne l'ion tetrabutylammonium de masse 242.

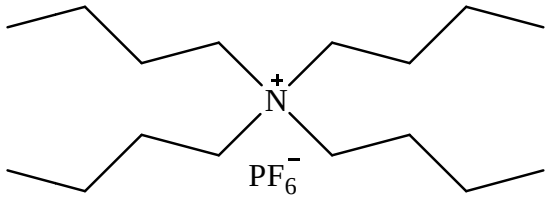


Figure 2.17 : Structure du tetrabutylammonium hexafluorophosphate

4.1.2.2 Peptides

Plusieurs peptides ont été étudiés par la technique DIAMS. Notamment un mélange de petits peptides (Figure 2.18) qui apparaissent sous leurs formes cationisées, excepté pour le peptide C qui est uniquement présent sous sa forme protonée.

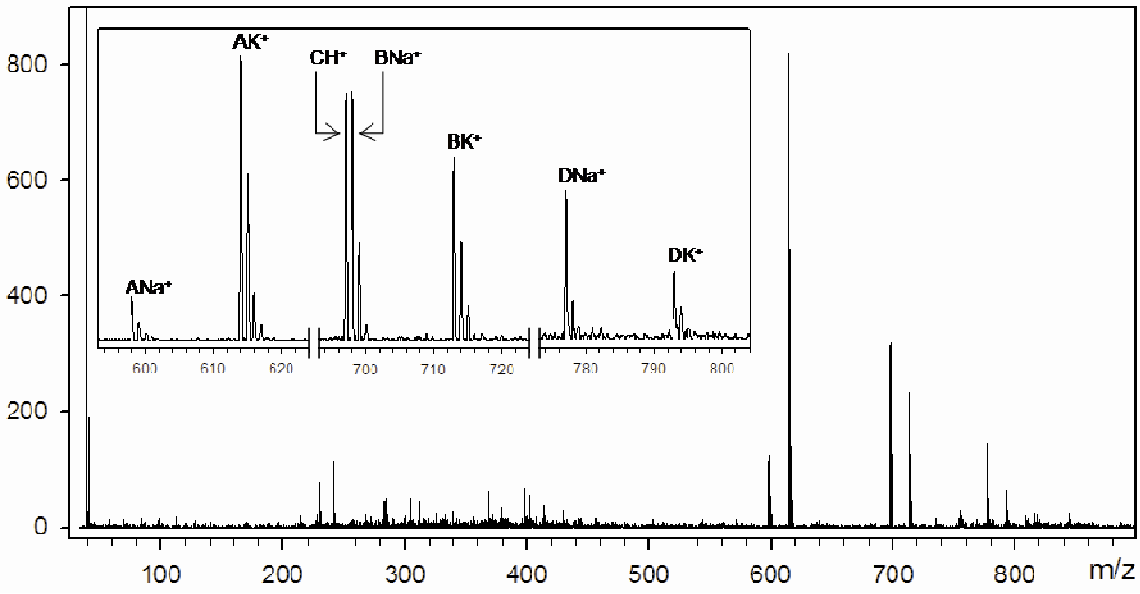


Figure 2.18 : Spectre de masse DIAMS-MS d'un mélange de quatre peptides dans eau/acétonitrile : A: AFALVG-NH_2, B: GVLFAVA-NH_2, C: LAVGIAR-NH_2 et D: FPALVPI-NH_2 (1 pmol de chaque déposée). [mode réflecteur positif; laser 50%; 100 accumulations]

Ce comportement est très certainement dû à la présence d'un acide aminé basique, l'arginine, en N-terminal du peptide C, qui favoriserait sa protonation.

D'autres peptides plus classiques ont aussi été étudiés comme l'angiotensine II, la gramicidine A, la leucine enképhaline et la substance P (Figure 2.19). Ce spectre met en évidence la présence de deux nouveaux ions parasites m/z 397 et m/z 413, certainement des espèces cationisées au sodium et au potassium du même contaminant.

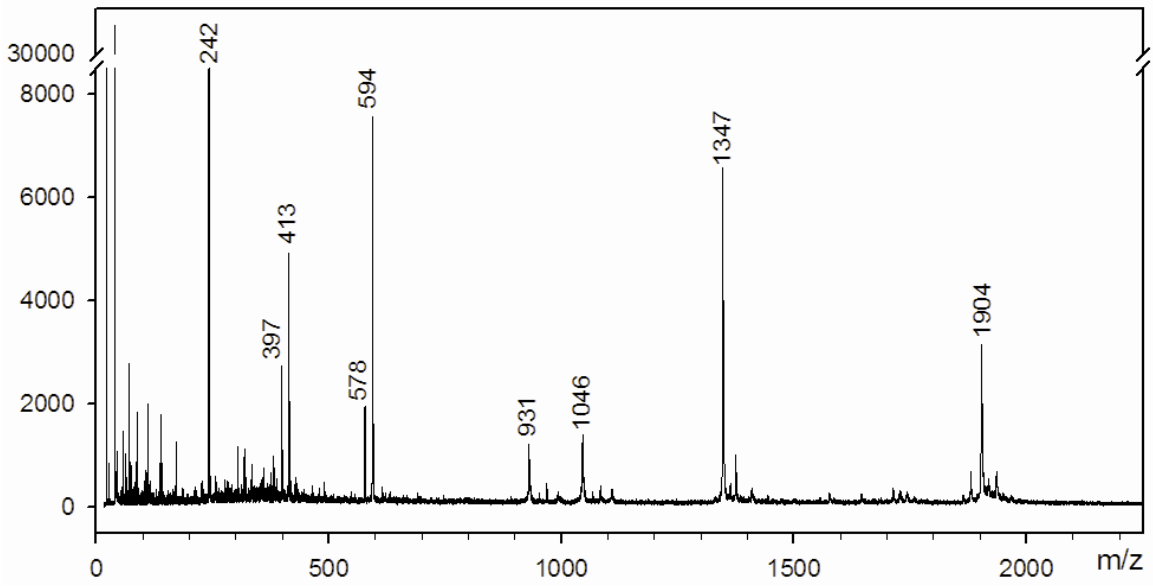


Figure 2.19 : Spectre de masse DIAMS-MS d'un mélange de quatre peptides : les pics à m/z 1046 et m/z 1347 sont respectivement les formes protonées de l'angiotensine II et de la substance P, m/z

578 et m/z 1904 sont des adduits au sodium de la leucine enképhaline et de la gramicidine, enfin m/z 594 correspond à la forme adduite au potassium de la leucine enképhaline. [mode linéaire positif; laser 45%; 500 accumulations]

L'hypothèse précédente qui suggère que la protonation des peptides est favorisée lorsque ceux-ci possèdent des acides aminés basiques se vérifie ici. En effet les peptides comme l'angiotensine II et la substance P, qui contiennent tous deux des acides aminés basiques comme l'arginine ou la lysine, apparaissent sous forme protonée. En revanche, la leucine enképhaline et la gramicidine A, qui ne présentent pas ce type d'acide aminé, figurent sur le spectre de masse sous forme d'adduits au sodium et au potassium.

L'ordre des acides aminés qui composent l'angiotensine II (voir Schéma 5) a la particularité de favoriser une fragmentation du peptide en y_7 (voir Schéma 6). Cette fragmentation appelée, fragmentation sélective, est initiée par la présence d'un acide aminé acide dans une position N-terminale qui n'est pas protonée étant donnée la présence de résidus basiques au sein de la séquence. La présence d'acides aminés basiques comme l'arginine et l'histidine tendent en effet à retenir le proton au niveau des chaînes latérales de la séquence peptidique et les fragments chargés observés sont liés à la perte de la partie N-terminale du peptide. Dans le cas de l'angiotensine II (DRVYIHPF), la présence d'aspartate, d'arginine et d'histidine, favorisent la perte de l'acide aspartique et donc l'apparition de l'ion fragment à *m/z* 931.

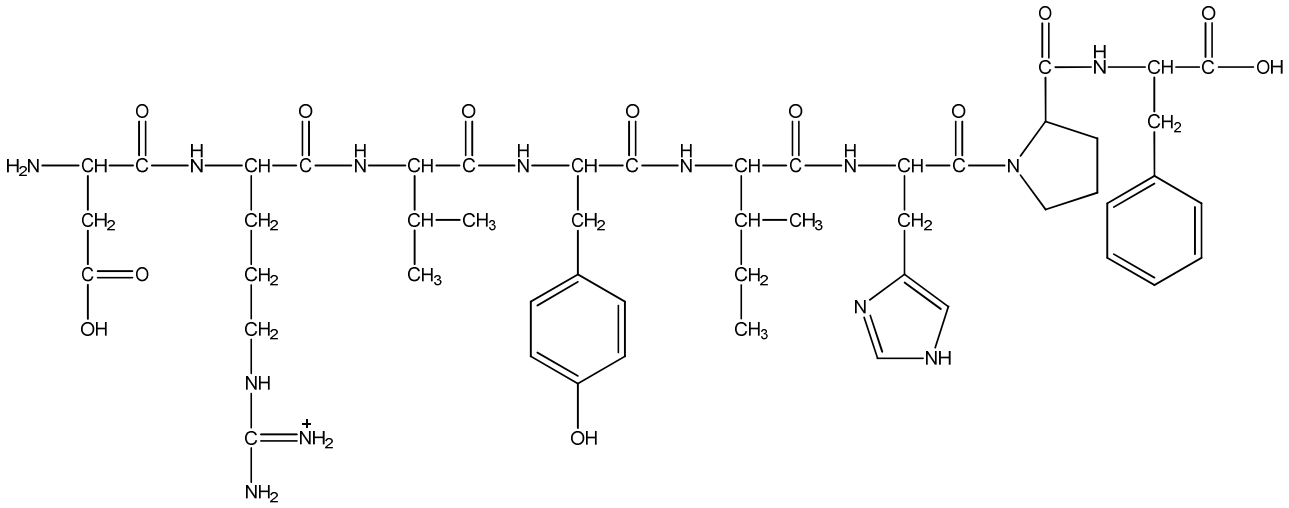


Schéma 5 : Formule développée de l'angiotensine II protonée (m/z 1046)

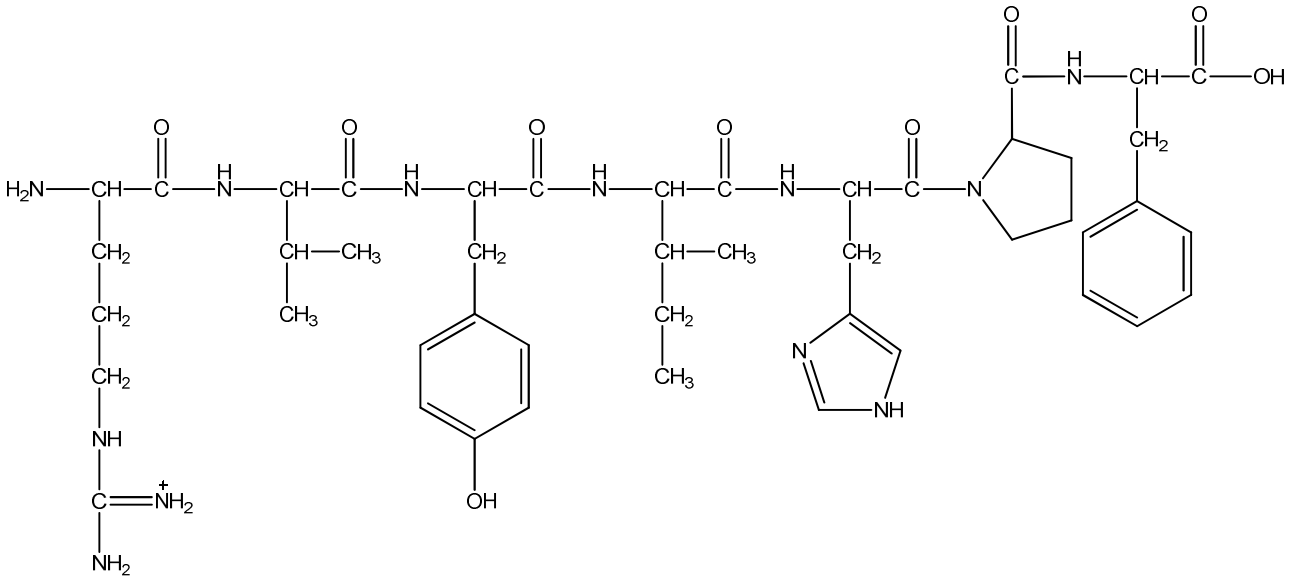


Schéma 6 : Formule développée de l'ion Y_7 (m/z 931) issu de la fragmentation de l'angiotensine protonée.

Une étude comparative a d'ailleurs été réalisée à ce sujet. Les spectres de masse de l'angiotensine II ont été obtenus par DIAMS et LDI sur or pour des mêmes conditions d'échantillonnage et d'énergie laser. Une différence de comportement a été observée. Elle est illustrée par la Figure 2.20. Un taux de fragmentation plus important apparaît lors de l'analyse par LDI sur or. Les résolutions des pics sont également différentes si on compare les deux spectres. Les fragmentations semblent métastables en DIAMS et prompt en LDI sur or. Cette différence de comportement est à relier à l'énergie interne des ions émis. Le taux de fragmentation plus faible et la présence d'ions métastables est forcément une conséquence de la présence de la monocouche puisque c'est le seul paramètre qui différencie les deux méthodes. Il semblerait alors que l'énergie transmise à l'échantillon lors de la désorption/ionisation soit plus faible en DIAMS qu'en LDI. Cette observation suscite d'elle-même une interrogation quant à la quantité d'énergie transmise à l'échantillon pour ces deux méthodes.

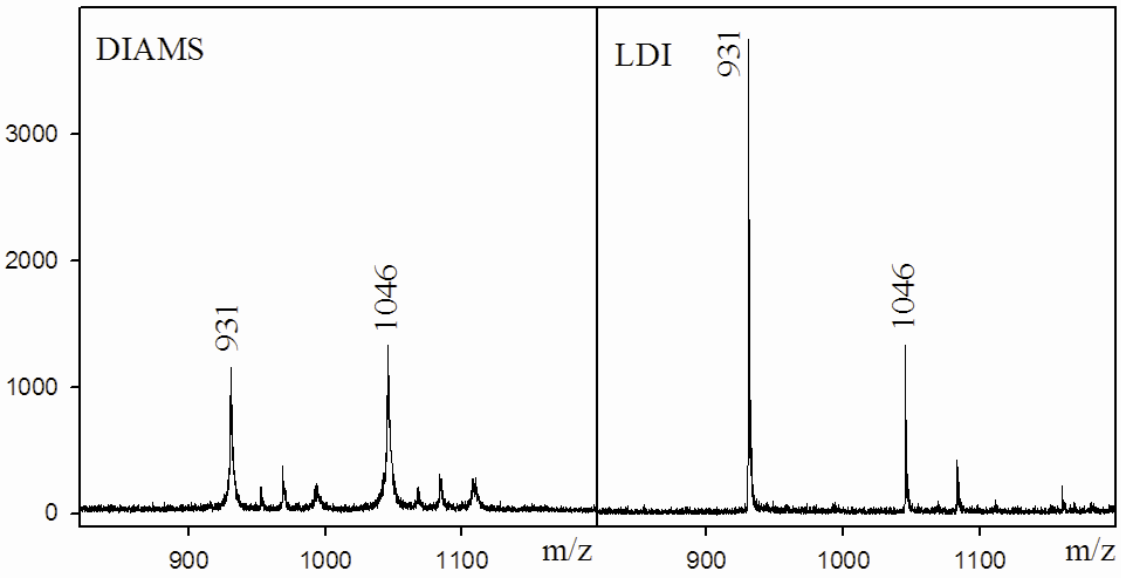


Figure 2.20 : Spectres de masse DIAMS et LDI de l'angiotensine II obtenus dans les même conditions. [mode linéaire positif; laser 40%; 200 accumulations]

4.1.2.3 Alcaloïdes

Une des applications potentielles de la méthode DIAMS, serait l'analyse d'extraits végétaux, dans ce cas son avantage est qu'elle permettrait d'analyser directement une fraction extraite sans passer par des techniques de séparation chromatographique.

Entre autre, l'étude d'un extrait végétal reconstitué montre que la méthode permet la détection des alcaloïdes.

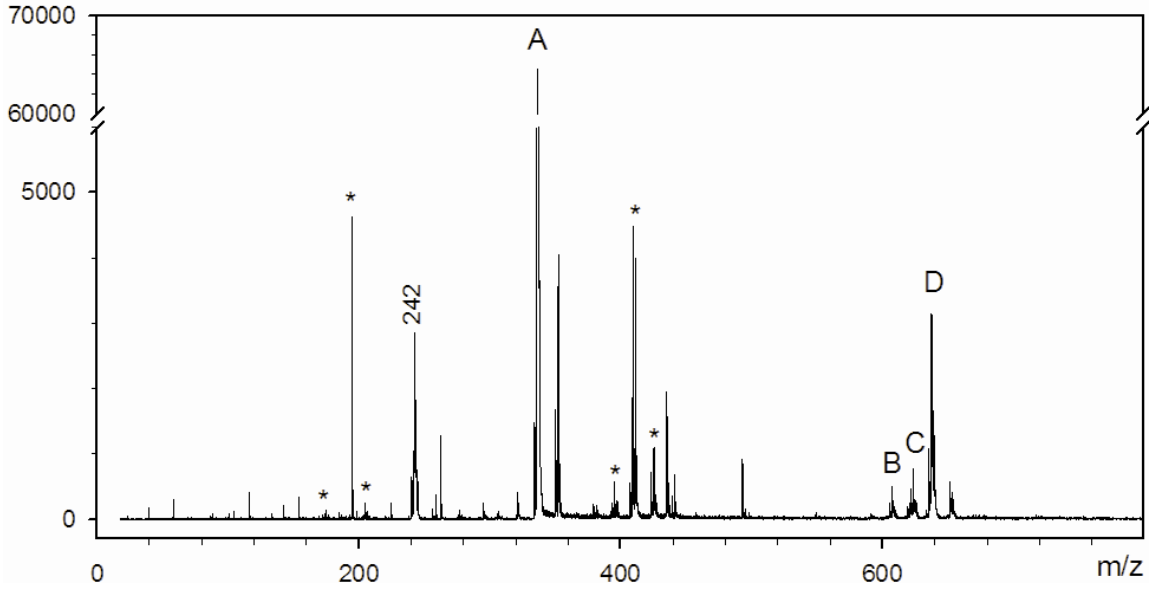


Figure 2.20 : Spectre de masse DIAMS-MS d'un mélange d'alcaloïdes, reconstitution d'une fraction extraite de Thalictrum flavum. Les pics B, C et D correspondent respectivement aux $[M+H]^+$ de la thalicbérine, thaligosidine et thalfoetidine, le pic A correspond à un ion préformé de la berbérine [mode linéaire positif; laser 50%; 500 accumulations]

Hormis, la berbérine, qui est un ion préformé, les autres alcaloïdes apparaissent sous forme protonée. Le spectre présente de nombreux autres pics, certains sont identifiés comme issus de la fragmentation (identifiés par un * sur la Figure 2.20) des ions parents B, C et D dont la structure est présentée ci-dessous et qui présentent classiquement une première fragmentation en a), éventuellement suivie d'une rupture simple en b).[71]

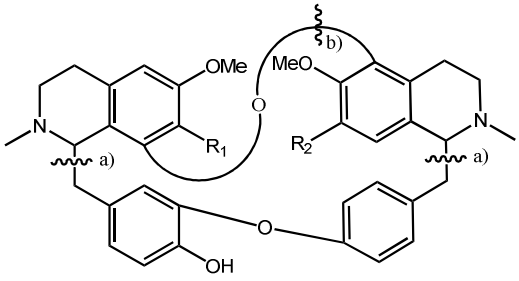


Figure 2.21 : Structure des alcaloïdes : B : thalicbérine (R1 = OMe, R2 = H), C : thaligosidine (R1 = OH, R = OMe) et D : thalfoetidine (R1 = R2 = OMe).

4.1.2.4 Acides gras

L'étude d'un mélange d'acides gras a permis l'observation des espèces déprotonées $[M-H]^-$ et de montre la compatibilité de la méthode avec le mode de détection des ions négatifs.

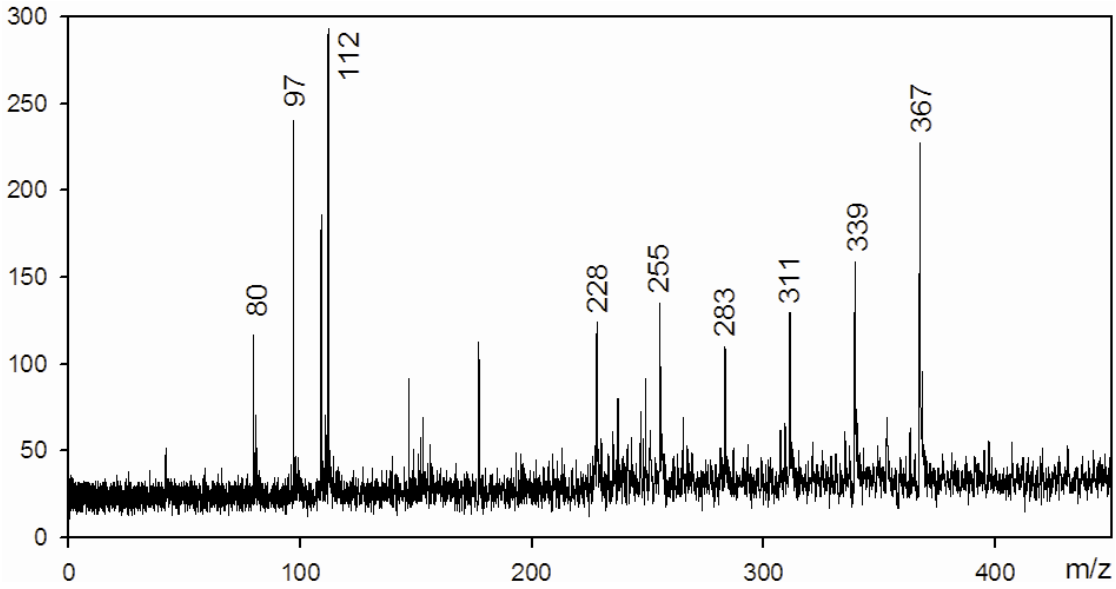


Figure 2.22 : Spectre de masse DIAMS-MS en mode négatif d'un mélange d'acides gras, les pics à m/z 227, m/z 255, m/z 283, m/z 311, m/z 339 et m/z 367 correspondent respectivement aux $[M - H]^-$ des acides tetradécanoïque, hexadécanoïque, octadécanoïque, eicosanoïque, docosanoïque and tetracosanoïque (5 pmol déposé par analyte).

Cet ensemble d'analyses préliminaires confirme les aptitudes de la méthode DIAMS, cette dernière permet en effet l'analyse d'une grande variété de molécules, tout en montrant une quantité limitée d'ions parasites dans les bas rapports m/z, ce qui présente un réel avantage par rapport au MALDI.

5 Etude statistique pour évaluer la répétabilité et la reproductibilité de la méthode DIAMS/TOF

L'efficacité de la méthode DIAMS a été montrée dans le cadre de différentes analyses, le but est maintenant d'étudier sa robustesse.

La robustesse d'une méthode se définie comme son aptitude à donner des résultats constants malgré les variations qui peuvent intervenir dans les différents paramètres expérimentaux (températures, pressions, humidité, échantillons, appareillage...).

Ce type d'étude se base sur l'observation et l'interprétation de la dispersion des résultats lors de la répétition d'une expérience. Elle permet de déterminer la variance de la méthode et d'adjoindre un intervalle de confiance aux résultats que celle-ci fournira. D'autre part, dans des conditions données, une même étude appliquée à différentes méthodes doit permettre de comparer leur fiabilité.

Classiquement, une étude de robustesse comporte deux séries d'analyses menées :

- en condition de répétabilité : les mesures sont réalisées en utilisant la même méthode, sur des échantillons identiques, dans le même laboratoire, par le même opérateur et avec le même matériel;
- en condition de reproductibilité : les mesures sont réalisées en utilisant la même méthode, sur des échantillons identiques mais dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et un matériel différent.

Ces deux situations représentent les cas extrêmes puisque pour la répétabilité tous les paramètres sont constants, alors que pour la reproductibilité, ils varient tous, excepté le protocole utilisé et les échantillons de référence.

5.1 Méthode et Expérience

Dans le cas présent, l'étude vise à évaluer la robustesse de la technique DIAMS, pour cela, la marche à suivre consiste à répéter plusieurs fois une même analyse et à comparer les spectres de masse obtenus.

Pour permettre une analyse statistique des résultats, il faut identifier une grandeur mesurable qui traduise la morphologie du spectre, deux principaux candidats se présentent : l'intensité des pics d'intérêt ou leur aire. Le choix s'est porté sur l'intensité des pics en question car le calcul des aires par le logiciel d'acquisition est trop souvent incorrect, de plus, comme c'est l'allure du spectre qui importe, les intensités relevées sont normalisées afin de s'affranchir de l'irrégularité des valeurs brutes.

D'autre part, il est possible de comparer la méthode DIAMS à des méthodes de référence comme le MALDI, puisque c'est la technique phare de la désorption/ionisation laser, ou la LDI classique, qui, en même temps d'être la première technique LDI, est aussi la première technique sans matrice, en effectuant les mêmes séries de mesures avec les différentes méthodes.

La technique DIAMS est destinée à analyser des molécules de rapports m/z variables, son évaluation doit donc porter sur une gamme de masse afin de vérifier que la fidélité ne dépende pas du rapport m/z. L'échantillon de référence est un panel de 5 glycérides de masses inférieures au kilodalton : un monoglycéride (1-Monopalmitoleoyl-rac-glycerol), deux diglycérides (1,3-dipalmitoyl-glycerol, 1,3-distearate-glycerol) et deux triglycérides (glyceryl tritridecanoate, tripalmitin).

Pour évaluer la méthode DIAMS, nous fixons les conditions suivantes :

- Toutes les plaques utilisées sont préparées en suivant le protocole décrit précédemment et testées par électrochimie.

- Les spectres de masse sont tous enregistrés dans les mêmes conditions en utilisant un programme d'acquisition automatique pour limiter les erreurs systématiques.
- Une normalisation des valeurs mesurées est établie.
- Une solution standard de glycérides est directement déposée sur la plaque DIAMS, sur une plaque d'or ou en MALDI.

Pour les besoins de l'étude de robustesse, le protocole d'obtention des spectres de masse a été rigoureusement défini.

5.1.1 Préparation des dépôts

La solution de référence est préparée de façon à contenir 2.10^{-2} $g.L^{-1}$ de chaque glycérides dissous dans un mélange chloroforme/méthanol : 2/1, ainsi que des solutions de matrice DHB (acide dihydroxybenzoïque) à 20 g.L-1 utilisée en MALDI et d'iodure de sodium (NaI) à 7 $g.L^{-1}$ qui sert d'agent cationisant

Pour les analyses en MALDI, la solution de standards et la solution de DHB sont mélangées en respectant un rapport volume/volume : 1/1, de même, quand cela sera nécessaire, l'iodure de sodium sera ajouté en mélangeant la solution standard à la solution de NaI suivant un rapport volume/volume : 10/1.

Tous les dépôts sont réalisés par la méthode de la goutte séchée, une goutte, de 0.5 µL pour le DIAMS et le LDI et de 1 µL pour le MALDI, est déposée sur le substrat puis évaporée à l'aire libre.

5.1.2 Conditions de l'analyse

Les mesures sont réalisées sur le spectromètre de masse à temps de vol Biflex III qui dispose d'une option d'acquisition automatique de spectres. Son utilisation permet une sélection des spectres enregistrés en fonction de leur résolution et du rapport signal sur bruit dans une gamme de masse définie.

Hormis pour la puissance laser, l'ensemble des spectres est enregistré avec les mêmes paramètres :

- Tensions d'accélération (19 kV et 17.3 kV),
- Délai d'extraction (200 ns),
- Tension d'amplification appliquée au détecteur (1.3 kV),
- Refocalisassion des ions par le miroir électrostatique,
- Pas de déflection des ions de basse masse.

Et subissent le même traitement qui permet d'obtenir les grandeurs évaluées :

- Soustraction de la ligne de base,

- Normalisation des intensités en ne considérant que les pics d'intérêt.

Selon la technique d'ionisation, deux puissances laser ont été utilisées, ~3µJ/pulse (pour 70% d'atténuation laser) et ~9µJ (pour 30% d'atténuation laser).

5.1.3 Spectres de masse de Glycérides typiquement obtenus

Tout comme en MALDI-TOF,[72-76] les glycérides sont facilement détectés en spectrométrie de masse DIAMS. Le spectre type résultant de l'analyse DIAMS-MS du mélange standard utilisé dans cette étude est reporté dans la Figure 2.23. Les cinq glycérides apparaissent uniquement sous forme d'adduits sodium et potassium.

L'intensité de chacun des dix pics correspondant est relevée et normalisée en fonction de leur somme, c'est cette intensité normalisée qui sert de mesurande pour l'étude de robustesse de la méthode.

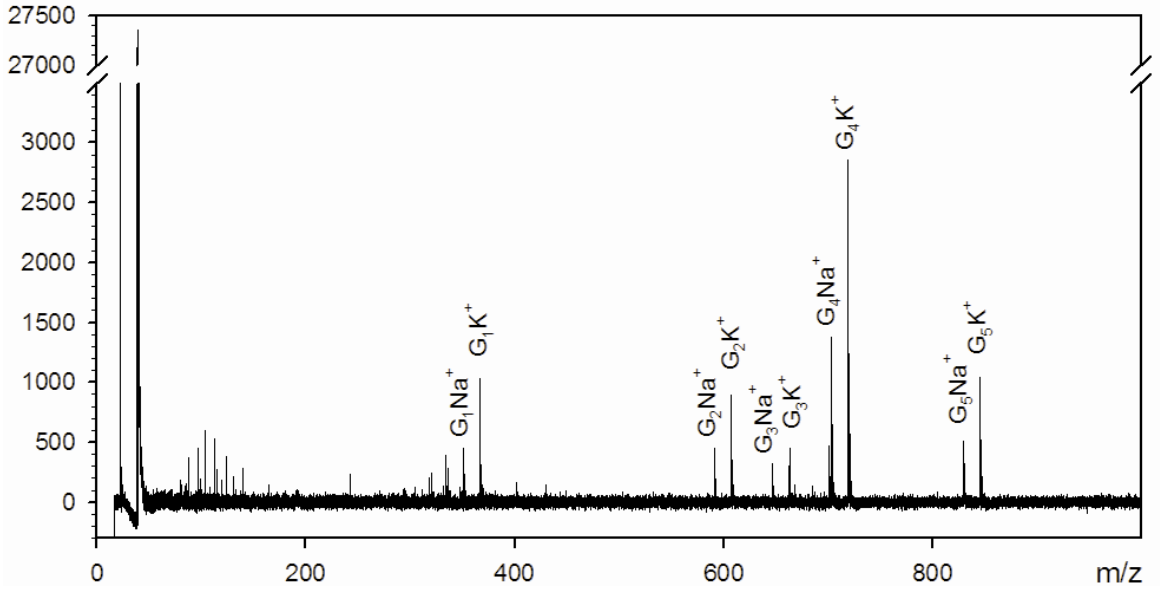


Figure 2.23 : Spectre de masse DIAMS-MS du mélange de glycérides : 1-Monopalmitoleoyl-rac-glycerol (G_1, Mw = g.mol^{-})[1], 1,3-dipalmitoyl-glycerol (G_2, Mw = 568.93 g.mol^{-1}), 1,3-distearate-glycerol (G_3, Mw = 625.02 g.mol^{-1}), glyceryl tritridecanoate (G_4, Mw = 681.08 g.mol^{-1}) et tripalmitin(G_5, Mw = 807.32 g.mol^{-1}) [mode linéaire positif; laser 30%; 200 accumulations]

La comparaison des spectres obtenus en DIAMS, en MALDI et en LDI (Figure 2.24), montre que le DIAMS permet de minimiser la présence d'ions parasites dans la gamme des bas rapports m/z. En MALDI, les ions qui apparaissent en dessous de m/z 400 sont généralement associés à des ions provenant de la matrice utilisée.[77] En LDI, ils correspondent plutôt à des ions formés suite à la pyrolyse des analytes lors de l'irradiation laser.

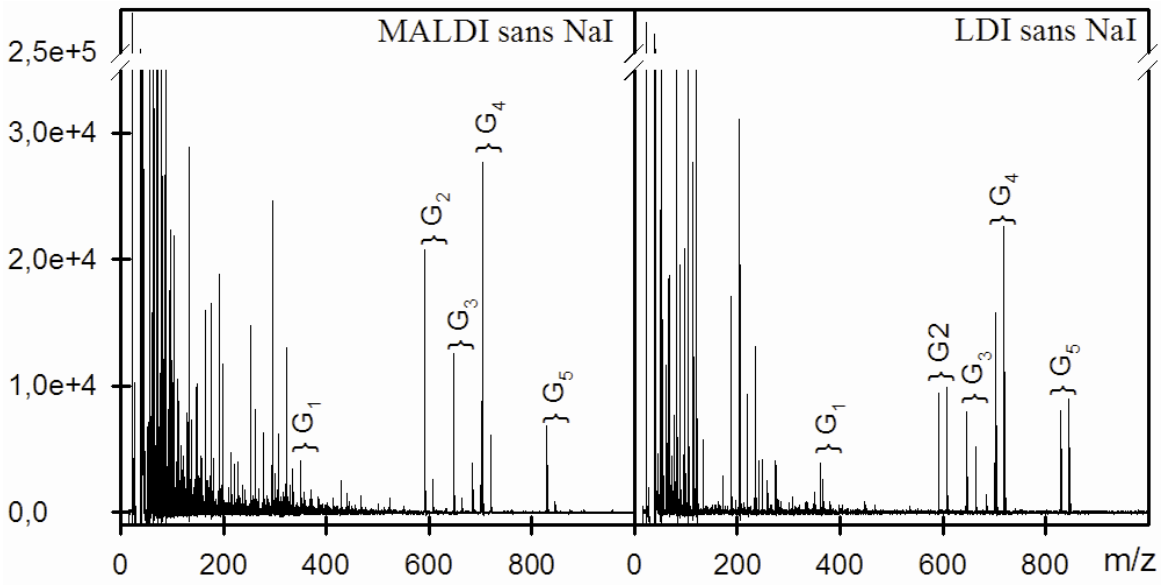


Figure 2.24 : Spectres de masse MALDI et LDI du mélange de glycérides : 1-Monopalmitoleoyl-rac-glycerol (G_1, Mw = g.mol^{-})[1], 1,3-dipalmitoyl-glycerol (G_2, Mw = 568.93 g.mol^{-1}), 1,3-distearate-glycerol (G_3, Mw = 625.02 g.mol^{-1}), glyceryl tritridecanoate (G_4, Mw = 681.08 g.mol^{-1}) et tripalmitin(G_5, Mw = 807.32 g.mol^{-1})

5.1.4 Effet de la puissance laser :

Pour étudier l'influence de la puissance laser en DIAMS, les spectres de masse du mélange de glycérides ont été enregistrés en mode positif avec différentes valeurs d'atténuation.

Au dessus de 70% d'atténuation, très peu d'ions sont produits et le spectre de masse est quasiment vierge.

L'atténuation seuil est atteinte autour de 70%. La quantité d'énergie laser déposée est alors assez importante pour générer des ions par désorption/ionisation des molécules d'échantillon. Pour les glycérides, ce sont principalement des adduits sodium (MNa^+) et potassium (MK^+) qui sont observés.

Lorsque l'énergie laser utilisée augmente, des pics caractéristiques de la dégradation de la plaque sont détectés, en effet pour des atténuations inférieures à 30%, des clusters d'or apparaissent sur le spectre aux m/z 197, m/z 394 et m/z 591.

C'est pourquoi l'étude statistique sur le DIAMS est menée avec une atténuation de 70%, ce qui permet d'observer les analytes sans dégrader le substrat.

5.2 La répétabilité

5.2.1 Principe

En général, la répétabilité doit être évaluée sur le domaine d'application de la méthode étudiée. Dans le cas du DIAMS, elle est observée sur une gamme de rapports m/z inférieurs au kilo Dalton, en utilisant cinq analytes de masses différentes.

Douze spectres sont enregistrés à partir de dépôts réalisés sur une même plaque DIAMS, les intensités de chaque pic d'intérêt sont relevées et normalisées de façon à calculer l'intensité normalisée moyenne correspondant à chacune des espèces cationisées et les écarts-types associés.

L'écart type sert à mesurer la dispersion d'un ensemble de données. Dans le cas présent, l'écart type et son carré, la variance, sont les meilleurs indicateurs de la fidélité des résultats.

Les mêmes séries de mesures sont effectuées avec les méthodes de référence MALDI et LDI afin d'en comparer la fidélité, principalement liée aux écarts-types calculés. Ainsi, douze spectres sont enregistrés en LDI sur une même plaque d'or et douze autres sur des dépôts MALDI identiques.

Ces mesures fournissent donc une intensité normalisée moyenne et un écart-type par pic d'intérêt pour chaque méthode. Afin de comparer la fidélité des trois méthodes, il faut calculer un écart type global, appelé écart type de répétabilité, qui, pour une méthode donnée, caractérise l'écart type des résultats sur le domaine observé.

5.2.1.1 Vérification de l'homogénéité des écarts-types par le test de Cochran.

Avant le calcul de l'écart type de répétabilité, une vérification de l'homogénéité des écarts types est imposée, ce qui est classiquement attesté par un test de Cochran.

Par définition, dans une étude où la fiabilité est étudiée en k différents points du domaine d'application par n répétitions d'une même mesure, le test de Cochran consiste à comparer les k écarts types calculés et permet de déterminer s'ils peuvent être considérés comme égaux.

Transposé à cette étude, ce test permet de vérifier si les écarts types sur les intensités moyennes de chacun des pics d'intérêts sont suffisamment proches pour autoriser le calcul de l'écart type de répétabilité.

Le principe est d'utiliser un indicateur C, calculé à partir des écarts types expérimentaux, et de le comparer à une valeur tabulée C(k,n) qui dépend du nombre k de pics d'analyte pris en compte, du nombre n de répétitions de la mesure ainsi que du niveau de confiance accordé au résultat qui est classiquement choisi à 5%.

$$C = \frac{s_{\max}^2}{\sum_{i=1}^{k} s_i^2} \qquad (2.2)$$

Avec s_{max} : l'écart-type le plus élevé,

s_i : l'écart type sur l'intensité normalisée moyenne du $i^{ème}$ pic d'intérêt,

k : le nombre de pics d'intérêt pris en compte dans l'étude.

Pour que l'hypothèse d'homogénéité des écarts types ne soit pas rejetée, il faut que C soit inférieur ou égal à $C_{tabulée}$.

5.2.1.2 Calcul de l'écart-type de répétabilité.

Si l'homogénéité est attestée, alors le calcul de l'écart-type de répétabilité est autorisé :

$$s_r = \sqrt{\frac{1}{k}\sum_{j=1}^{k} s_j^2} \qquad (2.3)$$

Avec s_r : l'écart-type de répétabilité,

s_j : l'écart type sur l'intensité normalisée moyenne du $j^{ème}$ pic d'intérêt,

k : le nombre de pics d'intérêt pris en compte dans l'étude.

Pour l'étude actuelle, trois écarts types de répétabilité, notés respectivement $s_{r\ DIAMS}$, $s_{r\ MALDI}$ et $s_{r\ LDI}$ pour les méthodes DIAMS, MALDI et LDI, seront obtenus et permettrons la comparaison des méthodes.

5.2.1.3 Méthode de comparaison des méthodes étudiées.

Lors de la comparaison de l'écart type s_r d'une méthode à celui $s_{r\ ref}$ d'une méthode de référence, deux cas peuvent se présenter :

- soit $s_r < s_{r\ ref}$, alors la méthode présente une fidélité au moins aussi bonne que la méthode de référence ;
- soit $s_r > s_{r\ ref}$, il faut soumettre les écarts types à un test de Fisher qui permet de déterminer si les fidélités des deux méthodes sont équivalentes ou si la méthode alternative est moins fidèle que la méthode de référence.

  Le test de Fisher permet de tester l'égalité de deux variances en calculant le rapport de ces deux variances $q = s_r^2/s_r^2{}_{ref}$ et en le comparant à une valeur critique issue des tables de Fisher-Snedecor en considérant N-k et N_{ref}-k degrés de liberté, avec k, le nombre d'échantillons, ici le nombre rapports m/z considérés et N, N_{ref}, les nombres totaux de mesures tous rapports m/z confondus pour, respectivement, la méthode étudiée et la méthode de référence.

  - si q est inférieur ou égal à la valeur critique au risque choisi, il est possible de conclure que la méthode alternative présente une fidélité compatible avec la méthode de référence ;

- si q est supérieur à la valeur critique au risque choisi, la fidélité n'est pas satisfaisante.

5.2.2 Résultats :

5.2.2.1 Etude avec les glycérides seuls

Cette première étude de répétabilité, menée tel que décrit en 5.2.1, fournit un ensemble de dix couples intensité normalisée moyenne/écart type pour chaque méthode, regroupés dans le Tableau 2.1.

m/z		351	367	591	607	647	663	703	719	829	845
DIAMS	Intensité normalisée moyenne	10	6	9	1.6	6	0.7	33	13	17	5
	Ecart type	7	4	3	0.7	2	0.2	5	4	5	2
MALDI	Intensité normalisée moyenne	7	4	15	4	11	2.2	27	12	15	4
	Ecart type	2	1	2	2	1	0.9	5	5	2	2
LDI	Intensité normalisée moyenne	11	10	11	5	6.5	2.1	26	14	11	5
	Ecart type	2	2	2	2	0.7	0.7	5	4	2	1

Tableau 2.1 : Intensités moyennes normalisées et écarts types associé, calculés à partir des spectres de masse du mélange des cinq standards glycérides.

Le test de Cochran est appliqué aux trois lots de mesures en utilisant la valeur tabulée C(k,n) avec k = 10 puisqu'il y a dix pics d'intérêt et n = 12 en accord avec le nombre de spectres utilisés pour calculer les moyennes.

$C_{0,05}(10,12)$	0,23
C_{DIAMS}	0,33
C_{MALDI}	0,36
C_{LDI}	0,43

Tableau 2.2 : Résultats du test de Cochran pour les trois méthodes et valeur critique tabulée correspondante.

Or, d'après le Tableau 2.2, $C_{calculé}$ est supérieur à la valeur critique pour les trois méthodes, ce qui montre que les écarts types ne sont pas homogènes.

Malgré la non-homogénéité des dispersions sur le domaine, il est possible d'indiquer une valeur d'écart type de répétabilité en adoptant le plus grand écart-type du domaine. L'autre possibilité reste d'améliorer la méthode, en ajoutant, par exemple, un agent cationisant afin de diminuer les différences d'écarts types.

5.2.2.2 Effet de la quantité d'iodure de sodium ajoutée

Dans la littérature, plusieurs études suggèrent l'utilisation d'un agent cationisant afin d'améliorer la cationisation des analytes, notamment l'iodure de sodium NaI dans le cas des glycérides.[78]

L'addition d'iodure de sodium produit l'effet escompté, l'exaltation du signal par l'agent cationisant est très nettement observée, il suffit de comparer un spectre de masse des glycérides obtenu en présence de NaI, Figure 2.25, et un spectre obtenu dans les mêmes conditions mais sans l'agent cationisant, Figure 2.23.

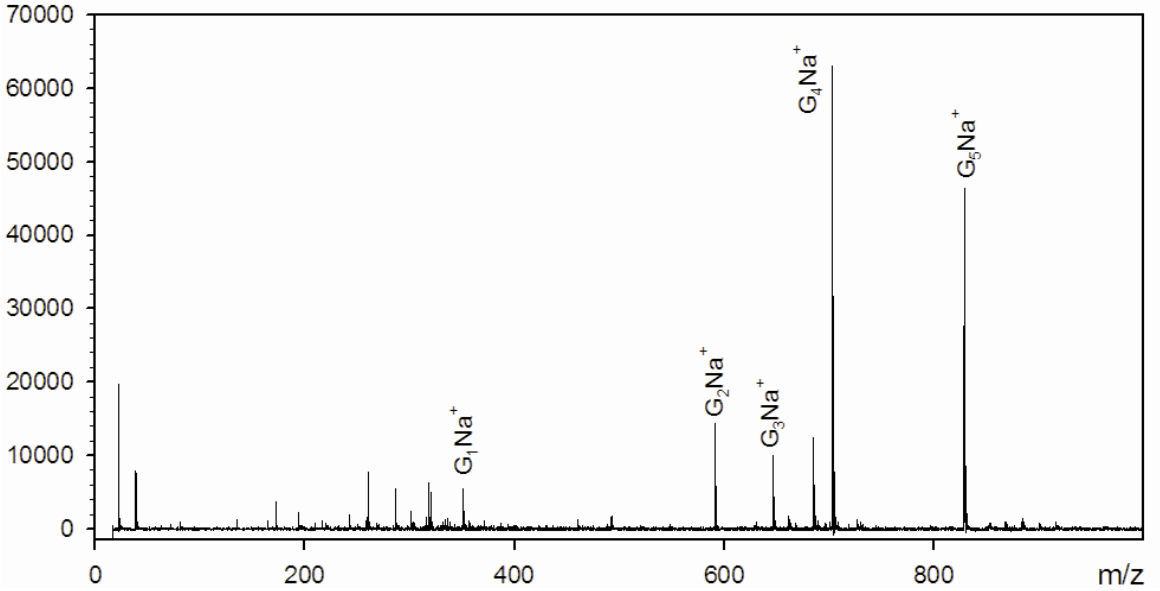


Figure 2.25 : Spectre de masse DIAMS-MS du mélange de glycérides en présence d'iodure de sodium. [mode linéaire positif; laser 30%; 200 accumulations]

Une autre conséquence de la présence de l'agent cationisant se reflète dans le type de cationisation des analytes qui ne sont plus observés que sous forme d'adduits au sodium.

Afin de déterminer la quantité d'agent cationisant optimale, une étude qui considère l'amélioration apportée en fonction de la quantité d'iodure de sodium a été menée.

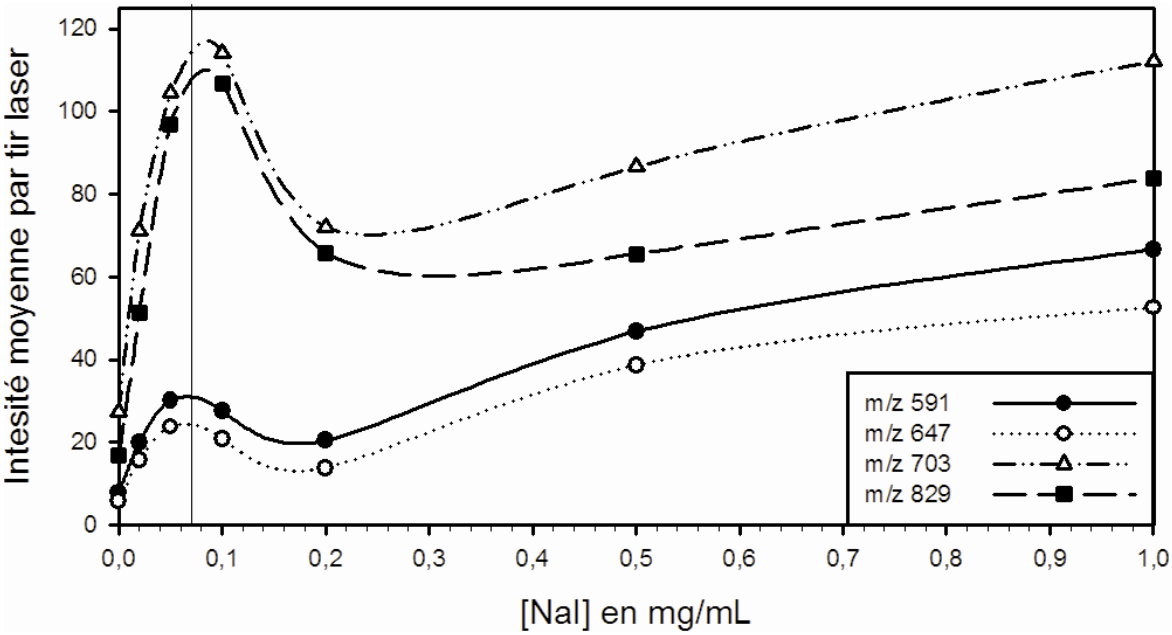


Figure 2.26 : Evolution des intensités moyennes par tir laser des pics correspondants aux adduits sodium des diglycérides et triglycérides relevées sur des spectres de masse DIAMS en fonction de la concentration d'agent cationisant utilisée.

La Figure 2.26 montre un maximum local d'amélioration du signal pour 7.10^{-2} g.L^{-1} de NaI dans la solution déposée, puis une augmentation continue de l'intensité à partir de 0.2 g.L^{-1}.

Pour une analyse en DIAMS, la concentration correspondant au maximum local sera préférée, elle permet d'améliorer significativement l'intensité du signal tout en restant dans des quantités respectables d'agent cationisant.

5.2.2.3 Etude avec un ajout d'agent cationisant

Une série de mesures supplémentaire par méthodes d'ionisation est réalisée en ajoutant de l'iodure de sodium à la solution de glycérides utilisée. De plus, le monoglycéride est sorti de l'étude car les valeurs associées sont trop souvent faussées à cause de la proximité d'ions parasites en MALDI et en LDI.

m/z		591	647	703	829
DIAMS	Intensité normalisée moyenne	12	9	48	31
	Ecart type	3	2	4	4
MALDI	Intensité normalisée moyenne	22	15	35	12
	Ecart type	2	2	2	2
LDI	Intensité normalisée moyenne	18	10	36	17
	Ecart type	2	1	2	1

Tableau 2.3 : Intensités normalisées moyennes et écarts types pour les expériences avec NaI.

Les nouveaux résultats sont regroupés dans le Tableau 2.3 et l'homogénéité des écart-types est validée pour les trois méthodes par le test de Cochran puisque les $C_{calculés}$ sont tous inférieurs à la valeur $C_{tabulée}$.

C(12,4)	0,49
$C_{DIAMS\ NaI}$	0,33
$C_{MALDI\ NaI}$	0,31
$C_{LDI\ NaI}$	0,36

Tableau 2.4 : Résultats du test de Cochran pour les trois méthodes lorsque l'agent cationisant est utilisé et valeur critique tabulée correspondante.

Ces conditions autorisent le calcul des écarts types de répétabilité selon l'équation (2.4). L'écart type de répétabilité du DIAMS est supérieur à ceux du MALDI et de la LDI, il faut donc étudier le ratio $q = s_r^2{}_{DIAMS} / s_r^2{}_{MALDI}$.

$s_{r\ DIAMS}$	3,64
$s_{r\ MALDI}$	2,21
$s_{r\ LDI}$	1,47

Tableau 2.5 : Ecarts types de répétabilité calculés pour les trois méthodes.

Le ratio $q = s_r^2{}_{DIAMS} / s_r^2{}_{MALDI}$ est alors comparé à la valeur critique de Fisher-Snedecor au risque 1%.associée à cette comparaison. Cette dernière est retrouvée en considérant 44 degrés de liberté pour les deux études, puisque dans ce cas, $N = N_{ref} = 4x12$ mesures effectuées pour chacun des cas et k = 4 rapports m/z différents

$$F_{0.01}(44;44) = 2,03.$$

$$q = s_r^2{}_{DIAMS} / s_r^2{}_{MALDI} = 1,65$$

Le ratio des variances est inférieur à la valeur critique ce qui permet de conclure que la fidélité de la méthode DIAMS est du même ordre que celle de la méthode MALDI.

5.3 La reproductibilité

5.3.1 Principe

Une étude de reproductibilité à proprement parler implique la participation de plusieurs laboratoires, chacun reçoit un ou plusieurs échantillons sur lesquels sont répétées plusieurs fois les mêmes mesures en respectant un même protocole. Mais ces études, généralement lourdes et coûteuses, peuvent, dans un premier temps, être remplacées par des études plus abordables de reproductibilité interne.

La reproductibilité interne consiste à remplacer le facteur laboratoire par un autre et à répéter plusieurs fois une même série de mesures en jouant sur ce dernier. Par exemple, acquérir les séries

de mesures sur différentes plaques DIAMS permet d'évaluer la robustesse de la méthode vis-à-vis de ce paramètre.

5.3.1.1 Acquisition des données :

Ainsi, quatre groupes de douze mesures sont obtenus à partir de dépôts réalisés sur quatre plaques DIAMS différentes. Le protocole d'acquisition des spectres est homologue à celui utilisé pour l'étude de répétabilité et les intensités de chaque pic d'intérêt sont relevées et normalisées afin de calculer l'intensité normalisée moyenne correspondant à chacune des espèces cationisées ainsi que les écarts-types associés.

5.3.1.2 Analyse de la variance :

Pour attester de la reproductibilité de la méthode DIAMS, les résultats sont soumis à une analyse de la variance à un facteur, aussi connu sous le nom de test ANOVA pour ANalysis Of VAriance. Cette dernière étudie par le biais d'un test de Fisher, la compatibilité entre la variabilité inter-groupe (liée à une intervention sur le facteur étudié) et la variabilité intra-groupe (variabilité naturelle n'étant associée à aucune action sur le système) et permet de déterminer, avec la marge d'erreur considérée, si les résultats obtenus sur les différentes plaques appartiennent à la même population.
En effet, la variance, s^2, est calculée à partir de la somme des carrés des écarts à la moyenne (SCE) :

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n}\left(x_i - \bar{x}\right)^2}{n-1} = \frac{SCE}{ddl} \qquad (2.5)$$

avec n, l'effectif de l'échantillon, $\sum_{i=1}^{n}\left(x_i - \bar{x}\right)^2$, la somme des carrés des écarts à la moyenne et ddl, le nombre de degrés de liberté. Cette somme des carrés des écarts peut être décrite comme une combinaison linéaire :

$$SCE_{totale} = SCE_{facteur} + SCE_{residuelle} \qquad (2.6)$$

avec $SCE_{facteur}$, la part imputable au facteur, traduite par la déviation des moyennes par rapport à la moyenne générale :

$$SCE_{facteur} = n\sum_{j=1}^{p}\left(\overline{x_j} - \bar{x}\right)^2 \qquad (2.7)$$

et $SCE_{residuelle}$, la part non imputable au facteur, qui se traduit par les variations internes à chacun des groupes :

$$SCE_{résiduelle} = \sum_{i=1,\, j=1}^{n,\, p} \left(x_{i,\, j} - \overline{x_j} \right)^2 \qquad (2.8)$$

avec p, le nombre de séries de mesure.

L'analyse de la variance consiste à comparer ces deux composantes de la variance en les soumettant à un test de Fisher. L'utilisation de ce test repose sur les hypothèses suivantes :

- La distribution de la population suit une loi normale.
- Les échantillons sont indépendants.

L'hypothèse nulle, H_0, correspond au cas où les distributions suivent la même loi normale, et l'hypothèse alternative est qu'il existe au moins une des distributions dont la moyenne diffère des autres moyennes.

Le rapport q, entre la variance due au facteur considéré, $s^2_{facteur}$, et la variance résiduelle, $s^2_{résiduelle}$, est comparé à une valeur de critique issue des tables de Fisher en considérant les degrés de liberté $ddl_{facteur}$ et $ddl_{résiduelle}$ correspondant, respectivement, à la variabilité inter-groupe et résiduelle :

$$q = \frac{s^2_{facteur}}{s^2_{résiduelle}} = \frac{\dfrac{SCE_{facteur}}{ddl_{facteur}}}{\dfrac{SCE_{résiduelle}}{ddl_{résiduelle}}} = \frac{\dfrac{SCE_{facteur}}{p-1}}{\dfrac{SCE_{résiduelle}}{N-p}} \qquad (2.9)$$

avec N, le nombre total de mesures, soit N=n.p

- si q est inférieur ou égal à la valeur critique au risque choisi, alors les résultats obtenus sur les différentes plaques appartiennent à la même population et il est possible de conclure de la reproductibilité des résultats d'une plaque DIAMS à une autre.
- si q est supérieur à la valeur critique au risque choisi, les résultats obtenus sur les différentes plaques ne pourraient, alors, pas être considérés comme constant.

Cette étude d'analyse de la variance ne considère qu'un pic significatif, elle est donc menée en parallèle pour chaque composé de référence.

5.3.2 Résultats :

Les résultats des mesures effectuées sur les quatre plaques DIAMS sont reportés dans le tableau de la Figure 2.27 et présentés sous forme d'un diagramme, celui-ci illustre l'homogénéité des intensités normalisées moyennes d'une plaque à l'autre. D'autre part, le recouvrement des intervalles d'erreur apporte un premier témoignage de la constance des résultats.

m/z		591	647	703	829
Plaque 1	Moyenne	11,52	8,92	48,18	31,38
	Ecart type	3,44	2,23	4,21	4,31
Plaque 2	Moyenne	13,3	9,58	48,29	28,82
	Ecart type	2,45	1,26	2,74	4,35
Plaque 3	Moyenne	12,65	9,59	49,1	28,67
	Ecart type	2,56	1,85	2,35	2,77
Plaque 4	Moyenne	11,64	8,45	51,47	28,45
	Ecart type	2,23	1,54	3,36	2,7

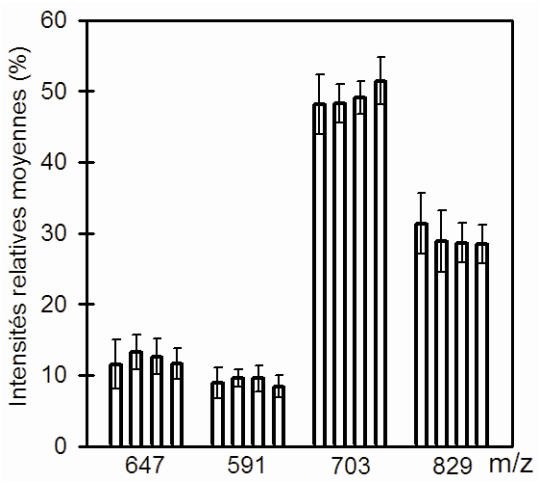


Figure 2.27 : Tableau récapitulatif et diagramme de comparaison des intensités normalisées moyennes obtenues sur 4 plaques DIAMS différentes en présence de NaI et des écarts types associés.

Cependant, ces observations ne sont pas suffisantes pour attester de la reproductibilité d'une plaque à l'autre et les intensités normalisées relevées sont donc soumises à un test ANOVA.

Dans ce cas, l'hypothèse nulle, H_0, correspond au cas où les variances inter-groupe et intra-groupe sont compatible. Ce qui signifie que, si l'hypothèse nulle est vérifiée, le facteur étudié n'engendre pas plus de variation que la dispersion naturelle et donc que les intensités relevées sur les différentes plaques DIAMS appartiennent à la même population.

Dépôt	Plaque 1	Plaque 2	Plaque 3	Plaque 4
1	49,67	45,44	53,53	56,08
2	46,20	48,35	44,06	50,37
3	47,26	46,25	50,06	53,92
4	56,85	52,35	48,83	55,97
5	45,26	46,62	47,99	50,18
6	43,41	47,23	50,20	48,00
7	46,80	45,56	50,55	51,28
8	43,74	52,42	51,26	50,81
9	47,06	44,89	48,62	55,38
10	52,20	50,01	48,28	46,66
11	45,55	48,84	48,81	52,22
12	54,12	51,54	46,94	46,75
Total	578,12	579,50	589,13	617,62
Moyenne	48,18	48,29	49,09	51,47

Tableau 2.6 : Séries d'intensités normalisées relevées sur quatre plaques DIAMS différentes.

Pour donner un exemple du test ANOVA utilisé, les intensités normalisées du pic à m/z 703, correspondant à l'adduit sodium du 1,3-distearate-glycerol, sont présentées dans le Tableau 2.6.

Elles permettent de dresser la table d'ANOVA suivante :

	SCE	DDL	Variance
Inter groupes (facteur)	84,19	3	28,06
Intra groupes (résiduelle)	462,28	44	10,51
total	546,47	47	
		F	2,67

Tableau 2.7 : Table d'ANOVA pour l'ion m/z 703.

La même étude réalisée sur les quatre pics d'intérêt permet de calculer les valeurs de Fisher $F_{m/z\ 591}$, $F_{m/z\ 647}$, $F_{m/z\ 703}$ et $F_{m/z\ 829}$ respectivement égaux à 1.19, 1.19, 2.67 et 1.74. La valeur critique tabulée $F_{0.05}$ = 2.82 en considérant un niveau de confiance de 95% est obtenue grâce aux degrés de liberté du numérateur $ddl_{facteur}$ = p-1 = 3 et du dénominateur $ddl_{résiduelle}$ = N-p = 44, le nombre de séries de mesure, p, étant de 4, et le nombre total de mesures, N, de 48.

La valeur calculée pour les quatre ions de référence étant inférieure à la valeur critique tabulée, l'hypothèse nulle est vérifiée. Ainsi, le test statistique atteste, avec une marge d'erreur de 5%, que les résultats obtenus sur les différentes plaques appartiennent à la même population et donc que la méthode permet l'obtention de résultats reproductibles d'une plaque à l'autre.

6 Quantification en DIAMS-MS : dosage d'un composé de faible poids moléculaire.

La fidélité des résultats fournis par la méthode DIAMS est démontrée grâce à l'étude de robustesse, il est alors possible d'envisager réaliser des analyses quantitatives.

En spectrométrie de masse par désorption/ionisation laser, le dosage quantitatif d'une molécule est généralement réalisé en ajoutant une quantité connue d'un équivalent marqué. Le rapport des intensités entre le pic mono-isotopique et le pic correspondant à la molécule marquée retrace l'abondance relative des deux espèces et permet de calculer la quantité de composé présente dans l'échantillon.

La méthode DIAMS étant principalement destinée à l'étude de molécules de basses masses, l'expérience de quantification utilise une petite molécule, l'acide salicylique. Dans ce cas, l'élément marqué ajouté est l'équivalent hexa-deutéré.[79]

6.1 Dosage dans l'eau.

Pour estimer la faisabilité d'un dosage quantitatif, une étude préliminaire consiste à doser de l'acide salicylique dans de l'eau.

6.1.1 Expérience

La première étape consiste à préparer sept solutions disposant chacune d'une concentration différente d'acide salicylique, celle-ci s'échelonnent de 0.5 à 16 mM, et d'une même concentration de référence deutérée, fixée à 4 mM.

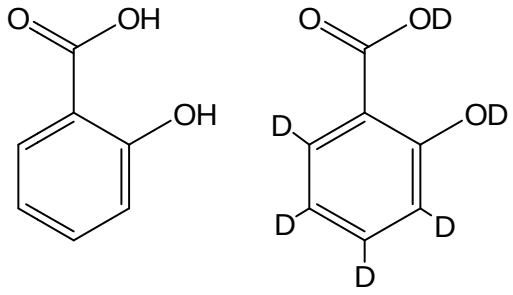


Figure 2.28 : Molécules d'acide salicylique et son équivalent deutéré.

Les sept solutions sont ensuite analysées par DIAMS-MS en mode négatif. Cinq dépôts de chaque solution sont réalisés sur une plaque DIAMS en utilisant la méthode de la goutte séchée. Chaque dépôt correspond 4 nmol de molécule de référence et 0.5 à 16 nmol d'acide salicylique.

6.1.2 Résultats

Sur les spectres de masse des mélanges d'acide salicylique/acide salicylique deutéré (Figure 2.29), des pics intenses à m/z 137, pour la molécule déprotonée d'acide salicylique ($HOC_7H_4COO^-$), et m/z 141, pour celle de la référence deutéré ($HOC_7D_4COO^-$), sont observés sans autre signal interférant majeur.

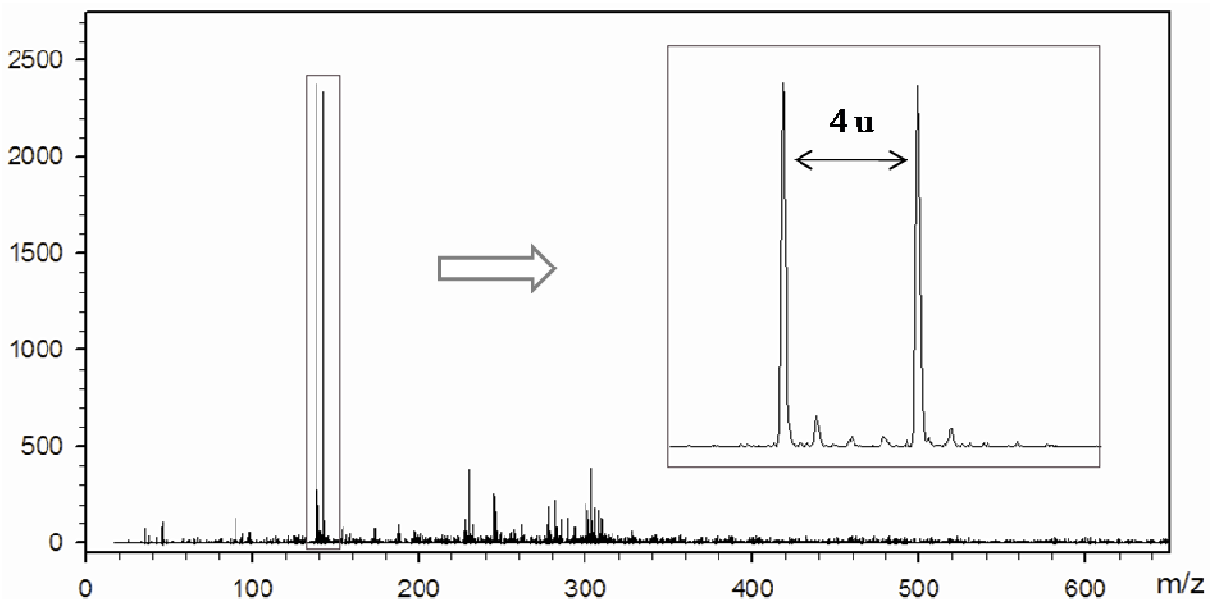


Figure 2.29 : Spectre de masse DIAMS-MS du mélange équimolaire d'acide salicylique est d'acide salicylique deutéré. [mode linéaire négatif; laser 40%; 200 accumulations]

L'écart de masse observé entre les deux ions est de quatre unités de masse, en effet, bien que la molécule deutérée contienne à l'origine six deutériums, elle échange, lors de sa solubilisation, les deux deutériums localisés sur les groupements acides contre des hydrogènes.

L'évolution de l'abondance relative des ions de l'acide salicylique et de son équivalent deutéré (Figure 2.30) confirme que l'évolution du pic de l'acide salicylique par rapport à celui de la référence recoupe la quantité d'acide déposée.

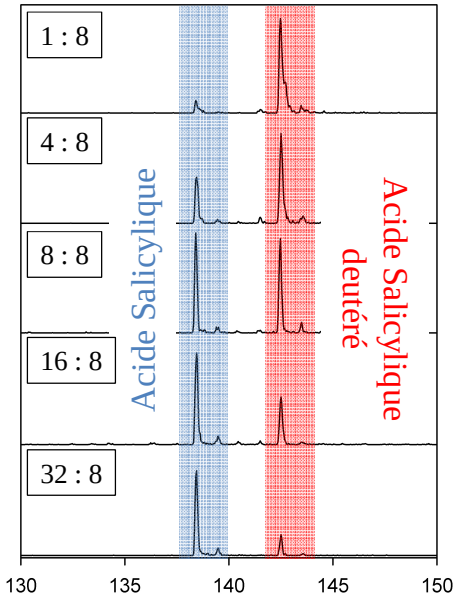


Figure 2.30 : Evolution de l'abondance relative des ions de l'acide salicylique et de son équivalent deutéré lorsque le rapport molaire entre l'acide salicylique et la référence deutérée varie de 1/8 à 4.

Pour vérifier la linéarité de la technique de dosage, une courbe d'étalonnage est établie (Figure 2.31), elle retrace l'évolution du rapport entre l'intensité du pic m/z 137 et celle du pic m/z 141, en fonction de la concentration en acide salicylique des solutions déposées.

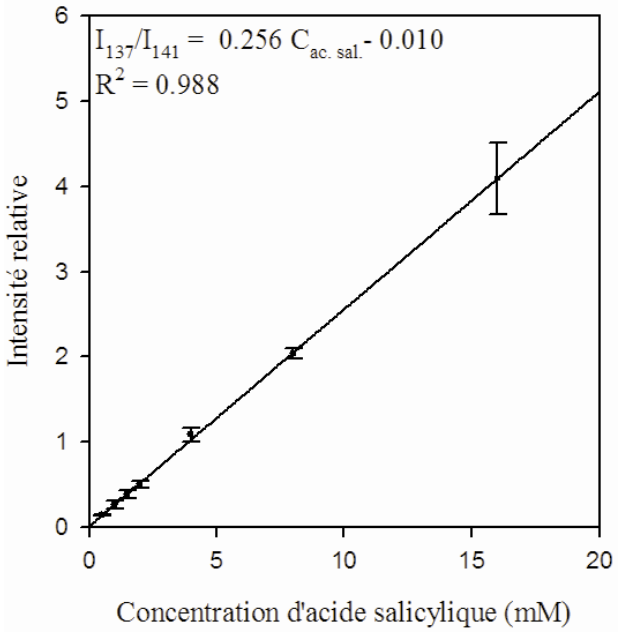


Figure 2.31 : Courbe d'étalonnage du dosage de l'acide salicylique dans l'eau.

Les résultats expérimentaux permettent d'établir une droite d'étalonnage dont l'équation est :

$$\frac{I_{C_7H_5O_3^-}}{I_{C_7HD_4O_3^-}} = 0.255[C_7H_6O_3] - 0.01 \qquad (2.10)$$

avec un coefficient de corrélation de 0.988, ce qui démontre une très bonne linéarité entre les intensités relatives des pics et les concentrations des solutions d'acide salicylique étudiées sur la gamme de concentration observée.

D'autre part, sachant que la référence deutérée est introduite avec une concentration de 4mM, l'équation attendue pour la droite de calibration était :

$$\frac{I_{C_7H_5O_3^-}}{I_{C_7HD_4O_3^-}} = \frac{[C_7H_6O_3]}{[C_7D_6O_3]} = \frac{[C_7H_6O_3]}{4} = 0.25[C_7H_6O_3] \qquad (2.11)$$

La droite expérimentale recoupe donc bien la courbe d'étalonnage attendue, ce qui garantie l'efficacité de la technique de dosage.

6.2 Dosage dans un plasma bovin.

Dans une matrice simple comme l'eau, le dosage de l'acide salicylique s'est montré très efficace, cependant l'application à un cas pratique est souvent plus délicate. Pour vérifier que cette méthode soit adaptée à une matrice réelle et plus complexe, un dosage de l'acide salicylique contenu dans un plasma bovin a été effectué.

Le dosage est généralement effectué en prélevant un échantillon sanguin chez un patient ayant, au préalable, reçu de l'aspirine. Chez l'humain et dans le cadre d'un usage thérapeutique, la concentration d'acide salicylique retrouvée dans le sérum est typiquement de l'ordre de 0.7 à 1.4 mM (100–200 mg/L). Pour des concentrations supérieures, l'effet reste modéré jusqu'à environ 7 mM où le taux est considéré comme toxique. Dans le cas présent, l'étude a été réalisée avec des échantillons de plasma dopés avec de l'acide salicylique en concentration variable, de 0.5 à 2.5 mM et avec 1.8 mM d'acide salicylique deutéré.

6.2.1 Expérience : Préparation de l'échantillon et obtention des spectres de masse

Les échantillons de plasma bovin ont été obtenus auprès d'un laboratoire Intervet de recherche pharmaceutique vétérinaire, puis ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation. Après décongélation, les échantillons sont dopés en mélangeant 5 mL d'une solution d'acide salicylique et de référence deutérée dans l'eau avec 5 mL de plasma. Quatre solutions sont préparées contenant 0.7, 1.4, 2.8 et 3.5 mM d'acide salicylique et 1.8 mM de référence.
Le traitement des échantillons comporte deux étapes :

- Une centrifugation de 3 minutes à 10000 tours par minute (rpm), une pellicule solide se forme alors à la surface et la phase liquide est récupérée.
- Une extraction sur phase solide (SPE) phase inverse qui permet de supprimer une grande partie des composés indésirables de la matrice et de récupérer les composés d'intérêt.

  L'extraction, réalisée sur un banc à vide en utilisant une cartouche StrataX 33 µm de Phenomenex, comporte plusieurs étapes, au cours desquelles différentes solutions sont percolées à travers la cartouche :

  - Conditionnement de la cartouche SPE :
    - 6 mL de méthanol
    - 6 mL d'eau
  - Chargement de la cartouche :
    - 10 mL de la solution d'échantillon
  - Lavage de la cartouche :
    - 10 mL d'eau contenant 5% de méthanol
  - Elution de l'analyte :
    - 10mL d'un mélange Eau/Méthanol : 40/60.

Lors de l'étape de chargement, les composés d'intérêt sont piégés par affinité avec le substrat. Le rinçage permet de chasser les composés non retenus, tels que les sels, les lipides ou les protéines,

enfin, les composés d'intérêt sont récupérés par élution d'un solvant moins polaire qui va les entrainer sur son passage. Le solvant d'élution, qui contient les composés d'intérêt, est analysé par spectrométrie de masse DIAMS. Pour chacun des quatre extraits, trois gouttelettes de 0.7 µL sont successivement déposées sur le même emplacement d'une plaque DIAMS et évaporées à l'air libre. Ces dépôts sont ensuite analysés par DIAMS-MS pour établir une courbe d'étalonnage d'un dosage de l'acide salicylique. Ce sont en réalité quatre séries de quinze spectres qui sont enregistrées afin de déterminer un intervalle d'erreur pour chaque mesure.

6.2.2 Résultats :

L'analyse des extraits par DIAMS-MS révèle clairement la présence de l'acide salicylique et de son équivalent deutéré, en effet le spectre de masse obtenu à partir d'un extrait, Figure 2.32, présente les deux pics correspondant à m/z 137 et m/z 141.

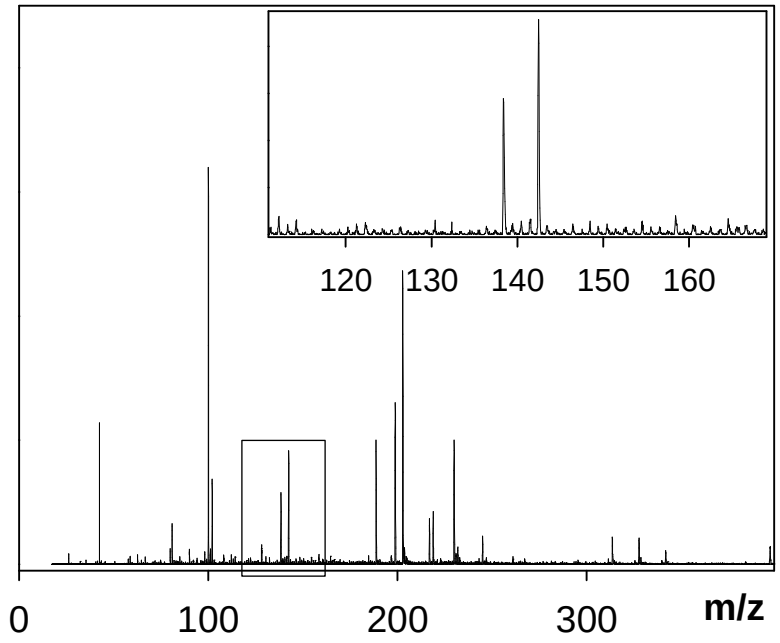


Figure 2.32 : Spectre de masse DIAMS-MS de l'extrait SPE du plasma contenant de l'acide salicylique et son équivalent deutéré. [mode linéaire négatif; laser 50%; 300 accumulations]

Les séries de mesures effectuées pour les 4 concentrations d'acide salicylique rendent compte de l'évolution des abondances relatives de l'acide salicylique par rapport à l'équivalent deutéré en fonction de la quantité d'acide salicylique introduite dans le plasma (Figure 2.33).

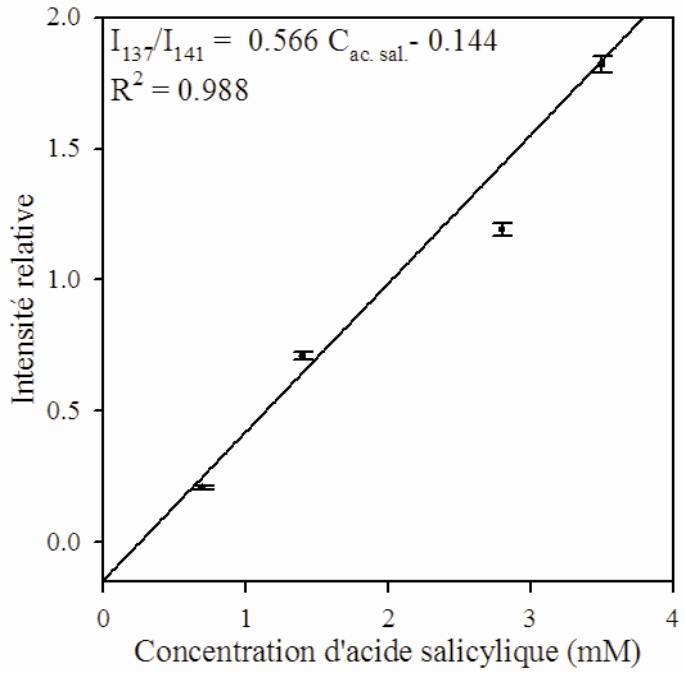


Figure 2.33 : Courbe d'étalonnage du dosage de l'acide salicylique dans le plasma bovin.

Trois des quatre points expérimentaux son alignés et permettent de tracer une droite d'étalonnage d'équation :

$$\frac{I_{C_7H_5O_3^-}}{I_{C_7HD_4O_3^-}} = 0.566\left[C_7H_6O_3\right] - 0.144 \qquad (2.12)$$

avec un coefficient de corrélation de 0.988, malgré la complexité du milieu, la linéarité entre les intensités relatives et la concentration d'acide introduite est retrouvée. D'autre part, sachant que la référence deutérée est introduite avec une concentration de 1.8mM, la relation attendue entre les deux variables est :

$$\frac{I_{C_7H_5O_3^-}}{I_{C_7HD_4O_3^-}} = \frac{\left[C_7H_6O_3\right]}{\left[C_7D_6O_3\right]} = \frac{\left[C_7H_6O_3\right]}{1.8mM} = 0.556\left[C_7H_6O_3\right] \qquad (2.13)$$

La pente expérimentale correspond donc bien à la pente attendue, par contre le décalage au zéro pour une concentration nulle peut mettre en balance la justesse de ce dosage si la droite d'étalonnage n'est pas établie au préalable.

La finesse des intervalles d'erreur sur chaque moyenne, indique que les mesures sont très précises, dans cette gamme de concentration, ce qui est aussi observé lors du dosage dans l'eau où la dispersion des mesures ne se fait sentir qu'au dessus d'une concentration d'acide de 10mM. Il reste toute de même à noter que le point correspondant à la concentration d'acide salicylique de 2.8 mM n'a pas été pris en compte pour l'obtention de cette droite de régression, car il est excentré ce qui

doit correspondre à une erreur lors de l'étape de préparation du plasma ou de l'extraction, cette mesure aurait mérité d'être refaite, ce qui n'a pas été le cas par manque de plasma. En somme, dans le cas d'une matrice simple, le dosage est particulièrement efficace, dans ce cas l'utilisation de la technique d'ionisation DIAMS permet une quantification qui n'aurait pas été possible en MALDI classique à cause de la présence des ions de matrice dans la gamme de masse de l'acide salicylique. En revanche, son utilisation associée à un prétraitement de l'échantillon induit une erreur systématique de l'ordre de 0.25nM sur la concentration mesurée, elle peut être imputée à l'étape de prétraitement ou à la composition de l'échantillon de plasma.

7 Conclusion

La méthode DIAMS bénéficie donc d'une procédure d'élaboration (par des méthodes physiques et chimiques) et de contrôle des cibles (par électrochimie et AFM) bien établie. Elle apparaît aussi pouvoir proposer un ensemble de design de monocouches dont les propriétés peuvent être reliées à l'ingénierie moléculaire. L'utilisation des cibles DIAMS en LDI sans matrice est applicable à de nombreuses classes de composés de faible poids moléculaire. Des mélanges de lipides, acides gras, polyphénols et peptides sont ainsi directement analysables par DIAMS. Les spectres de masse DIAMS mettent d'ailleurs en évidence l'absence d'ions dans les faibles gammes de rapport *m/z*. On peut d'ailleurs rappeler, qu'à part les ions des cations sodium et potassium et la présence d'un contaminant comme le tétrabutylammonium, aucun signal parasite n'est observé vers les basses masses. La méthode DIAMS est aussi reproductible et répétable que la technique MALDI et la désorption/ionisation laser sur surface d'or. Elle peut être, par conséquent, appliquée à la quantification de petites molécules organiques dans des matrices biologiques complexes en s'affranchissant des méthodes de séparations chromatographiques. Le dosage de l'acide salicylique dans le plasma est ici tout à fait illustratif des potentialités du DIAMS. Ce sont justement de telles potentialités qui nous conduisent à envisager une étude mécanistique plus détaillée afin de pouvoir mieux appréhender les différents processus impliqués dans la désorption/ionisation DIAMS et d'envisager alors un design dirigé des cibles. Les différents taux de fragmentation de l'angiotensine II en DIAMS et LDI sur or sont *a priori* à mettre au crédit des propriétés intrinsèques de la méthode DIAMS vis-à-vis du transfert d'énergie vers les analytes ionisés et vaporisés. Des évaluations comparatives liées aux distributions d'énergie interne des ions émis en LDI sur or et DIAMS et à leur vitesse initiale ont donc été entreprises.

8 Bibliographie

(1) Sanguinet, L.; Alévèque, O.; Blanchard, P.; Dias, M.; Levillain, E.; Rondeau, D. *Journal of Mass Spectrometry* **2006**, *41*, 830-833.
(2) Nuzzo, R. G.; Allara, D. L. *Journal of the American Chemical Society* **1983**, *105*, 4481-4483.
(3) Porter, M. D.; Bright, T. B.; Allara, D. L.; Chidsey, C. E. D. *Journal of the American Chemical Society* **1987**, *109*, 3559-3568.
(4) Bain, C. D.; Whitesides, G. M. *Science* **1988**, *240*, 62-63.
(5) Bain, C. D.; Evall, J.; Whitesides, G. M. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*, 7155-7164.
(6) Laibinis, P. E.; Whitesides, G. M.; Allara, D. L.; Tao, V. T.; Parikh, A. N.; Nuzzo, R. G. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 7152-7167.
(7) Dubois, L. H.; Nuzzo, R. G. *Annual Review of Physical Chemistry* **1992**, *43*, 437-463.
(8) Dubois, L. H.; Zegarski, B. R.; Nuzzo, R. G. *The Journal of Chemical Physics* **1993**, *98*, 678-688.
(9) Biebuyck, H. A.; Bain, C. D.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **1994**, *10*, 1825-1831.
(10) Poirier, G. E.; Pylant, E. D. *Science* **1996**, *272*, 1145-1148.
(11) Fenter, P.; Eisenberger, P.; Li, J.; Camillone Iii, N.; Bernasek, S.; Scoles, G.; Ramanarayanan, T. A.; Liang, K. S. *Langmuir* **1991**, *7*, 2013-2016.
(12) Walczak, M. M.; Chung, C.; Stole, S. M.; Widrig, C. A.; Porter, M. D. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 2370-2378.
(13) Christopher Love, J.; Wolfe, D. B.; Haasch, R.; Chabinyc, M. L.; Paul, K. E.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 2597-2609.
(14) Carvalho, A.; Geissler, M.; Schmid, H.; Michel, B.; Delamarche, E. *Langmuir* **2002**, *18*, 2406-2412.
(15) Li, Z.; Chang, S. C.; Williams, R. S. *Langmuir* **2003**, *19*, 6744-6749.
(16) Muskal, N.; Turyan, I.; Mandler, D. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1996**, *409*, 131-136.
(17) Li, Y.; Huang, J.; McIver Jr, R. T.; Hemminger, J. C. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 2428-2432.
(18) Burroughs, J. A.; Hanley, L. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1993**, *4*, 968-970.
(19) Fukuo, T.; Monjushiro, H.; Hong, H.-G.; Haga, M.-A.; Arakawa, R. *Rapid Commun. Mass Spectrom. Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2000**, *14*, 1301-1306.
(20) Su, J.; Mrksich, M. *Angewandte Chemie - International Edition* **2002**, *41*, 4715-4718.
(21) Su, J.; Mrksich, M. *Langmuir* **2003**, *19*, 4867-4870.
(22) Min, D. H.; Yeo, W. S.; Mrksich, M. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 3923-3929.
(23) Tyan, Y. C.; Liao, J. D.; Jong, S. B.; Liao, P. C.; Yang, M. H.; Chang, Y. W.; Klauser, R.; Himmelhaus, M.; Grunze, M. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2005**, *16*, 135-142.
(24) Yeo, W. S.; Min, D. H.; Hsieh, R. W.; Greene, G. L.; Mrksich, M. *Angewandte Chemie - International Edition* **2005**, *44*, 5480-5483.
(25) Lingenfelser, D.; Hess, P. *Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111*, 9250-9254.
(26) Morris, M. R.; Riederer Jr, D. E.; Winger, B. E.; Cooks, R. G.; Ast, T.; Chidsey, C. E. D. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1992**, *122*, 181-217.
(27) Ast, T.; Riederer, D. E.; Miller, S. A.; Morris, M.; Cooks, R. G. *Org. Mass Spectrom.* **1993**, *28*, 1021-1033.

(28) Somogyi, A.; Kane, T. E.; Ding, J. M.; Wysocki, V. H. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 5275-5283.
(29) Miller, S. A.; Riederer Jr, D. E.; Cooks, R. G.; Cho, W. R.; Lee, H. W.; Kang, H. *Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98*, 245-251.
(30) Meot-Ner, M.; Dongre, A. R.; Somogyi, A.; Wysocki, V. H. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **1995**, *9*, 829-836.
(31) Vekey, K.; Somogyi, A.; Wysocki, V. H. *Journal of Mass Spectrometry* **1995**, *30*, 212-217.
(32) Kane, T. E.; Angelico, V. J.; Wysocki, V. H. *Langmuir* **1997**, *13*, 6722-6725.
(33) Angelico, V. J.; Mitchell, S. A.; Wysocki, V. H. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 2603-2608.
(34) Laskin, J. *Journal of Physical Chemistry A* **2006**, *110*, 8554-8562.
(35) Warren, M. E.; Brockman, A. H.; Orlando, R. *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 3757-3761.
(36) Flink, S.; Van Veggel, F. C. J. M.; Reinhoudt, D. N. *Advanced Materials* **2000**, *12*, 1315-1328.
(37) Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. *Chemical Reviews* **2005**, *105*, 1103-1169.
(38) Lee, M. T.; Hsueh, C. C.; Freund, M. S.; Ferguson, G. S. *Langmuir* **2003**, *19*, 5246-5253.
(39) Tour, J. M.; Jones Ii, L.; Pearson, D. L.; Lamba, J. J. S.; Burgin, T. P.; Whitesides, G. M.; Allara, D. L.; Parikh, A. N.; Atre, S. V. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 9529-9534.
(40) Troughton, E. B.; Bain, C. D.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G.; Allara, D. L.; Porter, M. D. *Langmuir* **1988**, *4*, 365-385.
(41) Huang, J.; Hemminger, J. C. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 3342-3343.
(42) Heister, K.; Frey, S.; Ulman, A.; Grunze, M.; Zharnikov, M. *Langmuir* **2004**, *20*, 1222-1227.
(43) Cooper, E.; Leggett, G. J. *Langmuir* **1998**, *14*, 4795-4801.
(44) Laibinis, P. E.; Whitesides, G. M. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 9022-9028.
(45) Ferguson, M. K.; Lohr, J. R.; Day, B. S.; Morris, J. R. *Physical Review Letters* **2004**, *92*, 732011-732014.
(46) Valiokas, R.; Astblom, M.; Svedhem, S.; Svensson, S. C. T.; Liedberg, B. *Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106*, 10401-10409.
(47) Bareman, J. P.; Klein, M. L. *Journal of Physical Chemistry* **1990**, *94*, 5202-5205.
(48) Laibinis, P. E.; Fox, M. A.; Folkers, J. P.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **1991**, *7*, 3167-3173.
(49) Jousselme, B. *Thèse de l'Université d'Angers* **2002**.
(50) Elouarzaki, K. *DEA : Elaboration de monocouches sur surfaces d'or pour la spectrométrie de masse.* **2006**.
(51) Blanchard, P.; Jousselme, B.; FrÃ¨re, P.; Roncali, J. *Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 3961-3964.
(52) Yang, X. F.; Mague, J. T.; Li, C. J. *Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66*, 739-747.
(53) Guyard, L.; Hapiot, P.; Jouini, M.; Lacroix, J. C.; Lagrost, C.; Neta, P. *Journal of Physical Chemistry A* **1999**, *103*, 4009-4015.
(54) Neudeck, A.; Audebert, P.; Guyard, L.; Dunsch, L.; Guiriec, P.; Hapiot, P. *Acta Chemica Scandinavica* **1999**, *53*, 867-875.
(55) Venables, J. A. *Thin Film Processes II* **1991**.
(56) Schlesinger, M.; Paunovic, M. *Modern Electroplating* **2000**.
(57) Hou, Z.; Abbott, N. L.; Stroeve, P. *Langmuir* **1998**, *14*, 3287-3297.
(58) Dubrovsky, T. B.; Hou, Z.; Stroeve, P.; Abbott, N. L. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 327-332.
(59) Hou, Z.; Dante, S.; Abbott, N. L.; Stroeve, P. *Langmuir* **1999**, *15*, 3011-3014.
(60) Baudrand, D. *Plating and Surface Finishing* **2000**, *87*, 42-44.
(61) Pham, T.; Jackson, J. B.; Halas, N. J.; Lee, T. R. *Langmuir* **2002**, *18*, 4915-4920.

(62) Dowling, D. P.; Donnelly, K.; McConnell, M. L.; Eloy, R.; Arnaud, M. N. *Thin Solid Films* **2001**, *398-399*, 602-606.
(63) Poon, V. K. M.; Burd, A. *Burns* **2004**, *30*, 140-147.
(64) Bain, C. D.; Troughton, E. B.; Tao, Y. T.; Evall, J.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*, 321-335.
(65) Kawasaki, M.; Sato, T.; Tanaka, T.; Takao, K. *Langmuir* **2000**, *16*, 1719-1728.
(66) Yamada, R.; Wano, H.; Uosaki, K. *Langmuir* **2000**, *16*, 5523-5525.
(67) Bensebaa, F.; Voicu, R.; Huron, L.; Ellis, T. H.; Kruus, E. *Langmuir* **1997**, *13*, 5335-5340.
(68) Bounichou, M.; Sanguinet, L.; Elouarzaki, K.; Aleveque, O.; Dias, M.; Levillain, E.; Rondeau, D. *Journal of Mass Spectrometry* **2008**, *43*, 1618-1626.
(69) Lewis, W. G.; Shen, Z.; Finn, M. G.; Siuzdak, G. *International Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *226*, 107-116.
(70) Shen, Z.; Thomas, J. J.; Averbuj, C.; Broo, K. M.; Engelhard, M.; Crowell, J. E.; Finn, M. G.; Siuzdak, G. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 612-619.
(71) Wu, W. N.; Beal, J. L.; Fairchild, E. H.; Doskotch, R. W. *Journal of Organic Chemistry* **1978**, *43*, 580-585.
(72) Krist, S.; Stuebiger, G.; Unterweger, H.; Bandion, F.; Buchbauer, G. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 8310-8316.
(73) Ishida, Y.; Nakanishi, O.; Hirao, S.; Tsuge, S.; Urabe, J.; Sekino, T.; Nakanishi, M.; Kimoto, T.; Ohtani, H. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 4514-4518.
(74) Guyon, F.; Absalon, C.; Eloy, A.; Salagoity, M. H.; Esclapez, M.; Medina, B. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2003**, *17*, 2317-2322.
(75) Ayorinde, F. O. *Lipid Technol. FIELD Full Journal Title:Lipid Technology* **2000**, *12*, 41-44.
(76) Asbury, G. R.; Al-Saad, K.; Siems, W. F.; Hannan, R. M.; Hill H.H, Jr. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1999**, *10*, 983-991.
(77) Cohen, L.; Go, E. P.; Siuzdak, G. *MALDI MS. A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications* **2007**, 299-337.
(78) Okuno, S.; Wada, Y.; Arakawa, R. *International Journal of Mass Spectrometry* **2005**, *241*, 43-48.
(79) Okuno, S.; Wada, Y. *Journal of Mass Spectrometry* **2005**, *40*, 1000-1004.

Chapitre III :

Evaluations comparatives des distributions d’énergie interne d’ions gazeux produits par la méthode DIAMS

En spectrométrie de masse, l'allure du spectre enregistré pour un composé donné, peut varier en fonction du type de source d'ionisation utilisée. Elle peut même être dépendante d'un spectromètre de masse pour une même méthode d'ionisation choisie. La nature et l'intensité des fragments observés sur un spectre de masse dépendent aussi de l'espèce ionique produite et des aspects énergétiques et cinétiques de la réaction de fragmentation considérée.[1] En d'autres termes, les spectres de masse d'ions fragments sont non seulement liés à l'énergie interne accumulée par l'espèce ionique au cours de sa formation dans la source d'ionisation, mais ils dépendent aussi de la fenêtre de temps correspondant à l'observation de la réaction de fragmentation.[2] En ionisation par impact électronique (EI), l'énergie cinétique des électrons ionisants est généralement fixée à 70 eV et conduit à une distribution d'énergie interne $P(E_{int})$ de l'ion formé qui s'étend jusqu'à 16 eV avec un maximum autour de 4 eV. C'est une distribution qui est considérée comme reproductible quelque soit l'instrument utilisé. Ceci est notamment dû à la très faible pression qui règne dans ce type de source et dans la zone d'accélération qui conduit les ions vers l'analyseur. Cette reproductibilité n'est pas triviale lorsque le cas des sources d'ionisation dites douces est exploré. En effet, dans le cas des méthodes de production d'ions à partir de processus d'ablation/désorption, comme en FAB ou en MALDI, les distributions d'énergie interne des ions produits sont beaucoup modifiées par des paramètres variables comme la libération de la matière dans le vide et les collisions induites dans le jet en expansion. Surtout que ces paramètres sont aussi dépendants de la nature et de la méthode de préparation du dépôt ainsi que des paramètres instrumentaux. Le problème est identique en electrospray où les ions émis en phase gazeuse vont traverser des régions de pressions plus ou moins élevées avant d'entrer dans l'analyseur.[3-5] Dans ces régions, l'énergie interne des ions peut être modifiée indépendamment des conditions d'ionisation.[6] Ceci est lié à la nature de l'interface qui sépare la région à pression atmosphérique et l'analyseur où règne un vide poussé. Plusieurs autres paramètres instrumentaux vont contribuer à redéfinir la distribution d'énergie interne des ions dérivant.[7] Parmi ceux-ci, la présence d'éléments dédiés à améliorer la focalisation et la désolvatation des ions,[8] va conduire dans certains cas, à des dissociations induites par collisions (CID) avec le gaz ambiant. Celles-ci sont activées lorsque des différences de potentiel croissantes sont appliquées dans cette région. Ce processus connu sous le terme de "in-source CID" permet d'une part de compléter l'étape de désolvatation thermique des ions, et d'autre part, d'activer les réactions de fragmentation d'espèces chargées entièrement désolvatées pour parfaire leur analyse structurale.[9-11] Si on veut, à l'image d'une source EI, construire des bibliothèques de spectres de masse par in-source CID, il est nécessaire de proposer une calibration en énergie interne des ions émis dans les sources à pression atmosphérique.[12] Cette calibration en énergie interne a pu être proposée au travers de l'introduction de la méthode de rendements de survie d'ions, dite

méthode SY pour "Survival Yield".[7] Elle fut initialement introduite pour évaluer la distribution d'énergie interne d'ions après activation collisionnelle, afin de calibrer en énergie des spectres CID/MS/MS.[13, 14] Elle a ensuite été adaptée au cas des sources ESI, où l'évaluation de la distribution d'énergie interne $P(E_{int})$ des ions émis en phase gazeuse a été comparée à une distribution de type Boltzmann et reliée à un paramètre thermodynamique unique appelé la température caractéristique T_{char} (pour Characteristic Temperature).[15, 16] Ce paramètre évoluant avec le voltage d'accélération des ions dans la zone de désolvatation, a permis de comparer le processus d'in-source CID à une activation de type thermique.[17, 18] Ainsi, au-delà de la recherche d'une méthode de calibration en énergie des sources ESI, l'utilisation de la méthode SY a permis d'apporter des informations supplémentaires sur les mécanismes de production des ions gazeux en ESI.[19, 20] Elle a conduit notamment à montrer que pour un même type d'analyseur et une même différence de potentiel de part et d'autre de la zone de désolvatation (35 V), la source ESI d'un spectromètre de masse quadripolaire PESCIEX produit des ions dits "plus chauds" que la source ESI d'un VG Platform (voir Figure 3.1).[21] Une distribution $P(E_{int})$ plus large et déplacée vers des valeurs plus importantes d'énergie interne E_{int} est donc évaluée dans le premier cas.

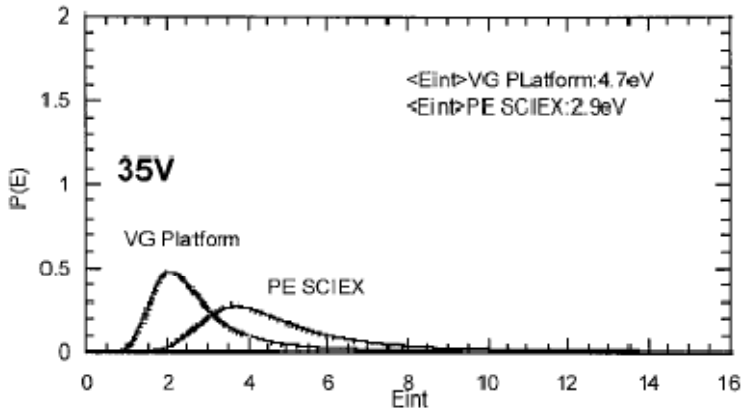


Figure 3.1 : Distributions d'énergie interne d'ions générés en phase gazeuse par electrospray en appliquant un voltage de 35 V sur le cône d'échantillonnage d'une source ESI d'un VG Platform et en utilisant un voltage de 35 V de la plaque d'orifice d'une source API 165 d'un PESCIEX (d'après la référence [21]).

Une telle comparaison a pu être réalisée dans le cas des sources de désorption/ionisation laser (LDI pour Laser Desorption Ionization).[22, 23] Des distributions d'énergie de type thermique ont été observées en mode MALDI.[24-26] Elles ont été attribuées à la forte densité de la plume en expansion issue de l'expulsion en phase gaz du dépôt analyte/matrice irradié. Dans le cas de méthodes de désorption ionisation laser sur surfaces de silicium poreux (méthode DIOS) ou sur nanotubes de silicium, des ions plus chauds semblent être produits.[27] Des distributions $P(E_{int})$ plus étroites en

DIOS que les distributions type thermique obtenues en MALDI ont également été observées (voir Figure 3.2). Cet écart a été corrélé avec la nature et la morphologie de la surface. Une modification chimique des groupements silanols du silicium et la taille des pores du revêtement DIOS encapsulant l'analyte, induiraient la dimensionnalité de la plume en expansion dans le vide.

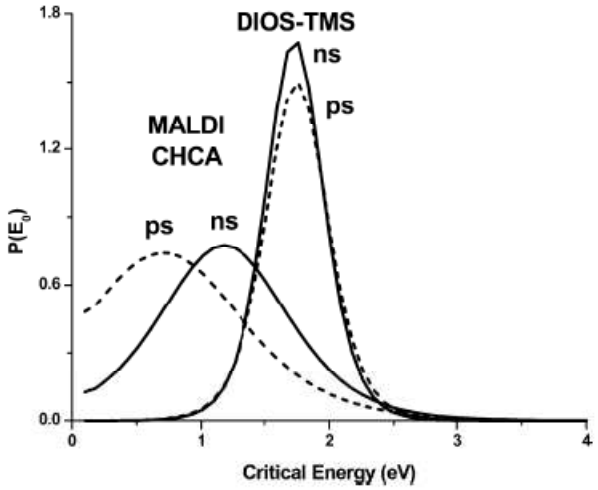


Figure 3.2 : Distributions d'énergie interne de cations benzylpyridinium produits en phase gazeuse par désorption laser assistée par matrice (MALDI) en utilisant l'acide α-hydroxycinnamique (CHCA) et par désorption ionisation sur silicium poreux (DIOS) dont la surface a été modifiée par triméthylsilylation. Sur la figure, « ps » et « ns » indiquent respectivement l'utilisation d'un laser picoseconde et nanoseconde (d'après la référence [24]).

Au regard de ces résultats, il peut être intéressant d'appliquer la méthode SY à la compréhension des phénomènes de désorption ionisation laser en DIAMS. Dans ce but, les distributions d'énergie interne d'ions produits par la méthode DIAMS ont été comparées à celles d'ions émis à partir d'une irradiation laser d'une surface simplement recouverte d'une couche d'or et sur laquelle l'échantillon est déposé. Pour comprendre l'implication des différents constituants de la monocouche, différents design ont été testés avec la méthode SY. Cependant, il apparaît utile de faire un rappel bibliographique et théorique sur la méthode de rendement de survie d'ions et son application à l'évaluation de l'énergie interne d'ions produits par des méthodes d'ionisation douce.

1 Principe de la méthode de rendement de survie d'ions (SY)

Elle peut être décrite sur la base d'une relation entre le degré de fragmentation d'un ion et la quantité d'énergie interne qu'il contient.[15, 16, 21] Les ions sélectionnés pour cette corrélation sont appelés des ions thermomètres, parce que leur chemin de dissociation est considéré comme bien

décrit autant en termes de mécanismes réactionnels qu'en termes de paramètres énergétiques. Ces ions thermomètres peuvent être des complexes de métal de transition avec des ligands carbonyles,[14] des ions tétraéthylsilanes,[14] des peptides et des esters protonés,[28, 29] ou encore des cations benzylpyridinium différemment substitués.[30] Pour les évaluations de distributions d'énergie interne d'ions produits en ionisation ESI, MALDI ou LDI, ce sont très souvent les cations benzylpyridinium (PyR^+) qui sont utilisés.

1.1 Les hypothèses inhérentes à la méthode SY dans le cas des sels de benzylpyridinium

L'hypothèse fondamentale impliquée dans la méthode SY est que la fragmentation de l'ion parent PyR^+ se produit par l'intermédiaire d'une rupture simple (RS) liée à l'allongement de la liaison C-N entre le radical benzyle et la pyridine *Py*. Cette fragmentation conduit à la formation d'un cation benzylium substitué R^+, visible sur le spectre de masse avec l'ion parent. Si on examine la variation d'énergie potentielle en fonction de la coordonnée de la réaction, comme l'illustre la Figure 3.3, cette dissociation est supposée se produire sans énergie de réaction retour. Avec l'absence d'énergie d'activation retour, l'énergie critique de la réaction ε_0 est équivalente à la valeur de la différence d'enthalpie de formation $\Delta(\Delta H_f)$ des constituants de l'état final et initial, tel que :

$$\varepsilon_0 = \Delta\left(\Delta H_f\right) = \left\{\left[\Delta H_f\left(Py\right) + \Delta H_f\left(R^+\right)\right] - \Delta H_f\left(Py^+R\right)\right\} \quad (1)$$

Les premières études reportées dans la littérature à ce sujet, se référaient à des valeurs d'enthalpie qui étaient corrélées avec des énergies d'ionisation des radicaux benzyle substitués correspondants.[16, 21] Les énergies critiques furent ensuite déterminées par calcul de chimie quantique en utilisant des méthodes semi-empirique (AM1) ou *ab initio* qui impliquent différents niveaux théoriques (HF/6-31G* et DFT B3LYP/6-31G).[7]

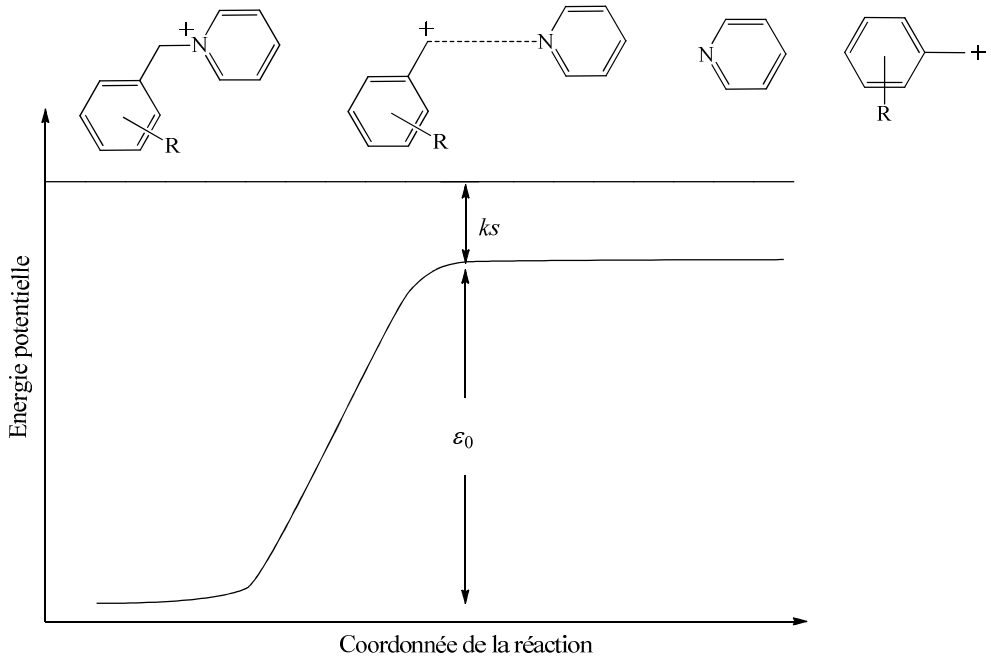


Figure 3.3 : Schéma de dissociation des cations benzylpyridinium substitués et évolution de l'énergie potentielle de la réaction de fragmentation en fonction, de la distance de la liaison C-N considérée comme la coordonnée de la réaction. Notons que les paramètres E_0 et ks sont reliés à l'énergie critique de la réaction et au déplacement cinétique.

Notons cependant que la réactivité intrinsèque des cations benzylpyridiniums substitués n'apparaît pas aussi simple que celle qui est formulée par l'hypothèse *ad hoc*. En effet, des travaux ultérieurs ont montré que les ions fragments R^+ pouvaient conduire à des réactions d'addition de solvant en ESI et à des captures d'hydrogène radicalaire en désorption ionisation laser.[25, 31] De plus, des études théoriques et expérimentales ont mis en évidence des voies de dissociations consécutives et compétitives lors de la fragmentation des cations PyR^+.[32, 33] Il est ainsi possible d'envisager la formation d'un ion tropylium par réarrangement intramoléculaire lors de la fragmentation des cations PyR^+. Ce processus devrait être pris en compte plus particulièrement dans le cas de la dissociation de certains des cations benzylpyridiniums utilisés dans la méthode SY. Ceci conduirait alors à considérer, suivant le cas, une énergie d'activation de réaction par rupture avec réarrangement (RR) plus faible que pour une rupture simple (RS) et une énergie d'activation retour. A ces aspects purement énergétiques, il faut ajouter un paramètre cinétique lié à la structure de l'état de transition de la réaction. Celui-ci serait dit plus "tendu" quand la formation compétitive de l'ion tropylium est favorisée par rapport à la production de l'ion benzylium issue de la RS. Ces résultats récents n'ont pas encore été appliqués à la méthode SY, c'est pourquoi dans le cas de la présente étude nous considérerons *a priori*, que l'hypothèse fondamentale d'une rupture simple est valide dans le cas de la réaction : $PyR^+ \rightarrow Py + R^+$. Cette démarche est d'autant plus légitime qu'il

s'agit ici de réaliser une étude comparative de distributions d'énergie interne par rapport aux évaluations reportées dans la littérature.

A côté de cette hypothèse fondamentale, il faut aussi ajouter que l'utilisation de ces ions thermomètres pour évaluer l'énergie interne déposée sur les précurseurs PyR^+, implique de considérer que :

- aucune énergie d'ionisation n'est à prendre en compte dans la production des ions gazeux puisqu'ils sont émis par séparation de charge entre le cation et le contre-ion formant le sel analysé ;
- l'énergie interne est de type vibrationnel pour tous les ions ;
- les cations benzylpyridinium différemment substitués ont des masses, des structures, des degrés de libertés et des énergies de collision au centre de masse comparables ;
- le mode de répartition de l'énergie interne par mode de vibration est identique pour tous les ions dans des conditions expérimentales identiques.

1.2 De la mesure des rendements de survie d'ions expérimentaux à l'évaluation de la distribution d'énergie interne

Le rendement de survie *SY* d'un ion parent P^+ est mesuré expérimentalement à partir d'un spectre de masse. Il est relié au rapport entre l'intensité de l'ion parent $I_P{}^+$ et de l'ion fragment $I_F{}^+$ tel que :

$$SY = \frac{I_{\mathrm{P}^+}}{\left(I_{\mathrm{P}^+} + \sum_{\mathrm{F}^+=1}^{n} I_{\mathrm{F}^+} \right)} \quad (2)$$

où $\sum_{i=1}^{n} I_{F_i}^+$ est la somme des intensités des ions fils. C'est une fraction des ions parents qui ont une énergie interne au dessus de l'énergie seuil d'apparition E_{thr} (pour appearance energetic threshold) des ions fragments (voir Figure 3.3). Le paramètre E_{thr} représente l'excès d'énergie par rapport à E_0 que le système moléculaire doit avoir pour que la vitesse de la réaction de dissociation permettant de détecter les ions fragments, corresponde au temps d'observation τ de la méthode instrumentale (voir Figure 3.3). La réaction de fragmentation doit donc se produire avant que les ions parents ne quittent la source. On écrit alors :

$$E_{\mathrm{ks}} = E_{\mathrm{thr}} - \varepsilon_0 \quad (3)$$

Le temps de séjour τ des ions dans la source peut être calculé à partir des dimensions de la source, de la zone d'accélération et des voltages appliqués. La valeur de la constante de vitesse nécessaire à l'observation de la réaction de fragmentation correspond à l'inverse du temps de séjour des ions :

$k\left(s^{-1}\right)=\frac{1}{\tau}$(4). L'énergie interne correspondant à cette constante de vitesse *k* est E_{thr}. Elle résulte de la projection sur l'axe des abscisses de la valeur du logarithme de $1/\tau$ par l'intermédiaire de la courbe représentant l'évolution de Log[$k(E_{int})$] en fonction de E_{int} où $k(E_{int})$ est la constante de vitesse micro-canonique de la réaction de fragmentation de l'ion thermomètre considéré (voir Figure 3.4a). Son évaluation sera décrite plus précisément dans le paragraphe 1.3.

Dans le cas de l'utilisation de cations benzylpyridinium différemment substitués, chaque ion thermomètre conduit à exprimer une courbe Log[$k(E_{int})$] *vs*. E_{int} qui caractérise sa facilité à se fragmenter dans les conditions de source choisies. Par exemple, toutes les études théoriques et expérimentales réalisées à partir de la fragmentation du paraméthoxybenzylpyridium (pMeOBzPyr), ont montré que cet ion thermomètre est caractérisé par une faible énergie de critique dissociation ε_0 et une faible valeur de E_{thr}. A l'opposé, ces mêmes études ont permis de décrire la réactivité du cation paranitrobenzylpyridium (pNO_2BzPyr) comme l'ion thermomètre le plus difficile à dissocier en pyridine et paranitrobenzylium ; donc avec une forte valeur de E_{thr}.[7] Pour illustrer la procédure de la méthode SY, tel que dans la Figure 3.4, on peut, en première approximation, proposer une série de cations benzylpyridinium incluant en plus un paraméhylbenzylpyridium (pMeBzPyr) et un métaméhylbenzylpyridium (pMeBzPyr). Dans ce cas, les énergies seuils d'apparition peuvent être obtenues grâce aux courbes Log[$k(E_{int})$] *vs*. E_{int} et à la de Log(k) = $1/\tau$ (voir Figure 3.4a). On trouve généralement : E_{thr}(pMeOBzPyr)< E_{thr}(pMeBzPyr) < E_{thr}(mMeOBzPyr) < E_{thr}(pNO_2BzPyr). Les rendements de survie expérimentaux des ions sont calculés à partir de l'équation (2) et reportés en fonction de la valeur de E_{thr} tel que décrit dans la Figure 3.4b. Dans cette procédure, deux points sont ajoutés manuellement pour modéliser le comportement d'un ion qui se dissocierait totalement et celui d'un ion qui survivrait entièrement dans les conditions expérimentales choisies, SY = 0 et SY = 1. Les données de la Figure 3.4b peuvent ensuite être ajustées par une simple fonction sigmoïde symétrique :

$$y=\frac{a}{e^{-\frac{x-x_0}{b}}+1}\ (5)\ .$$

La distribution d'énergie interne est alors obtenue grâce à la dérivée de l'équation (5), telle que :

$$\frac{dy}{dx}=\frac{e^{-\frac{x-x_0}{b}}}{b\left(e^{-\frac{x-x_0}{b}}+1\right)^2}\ (6).$$

La courbe $P(E_{int})$ ainsi calculée, est une gaussienne comme l'illustre la Figure 3.4c.

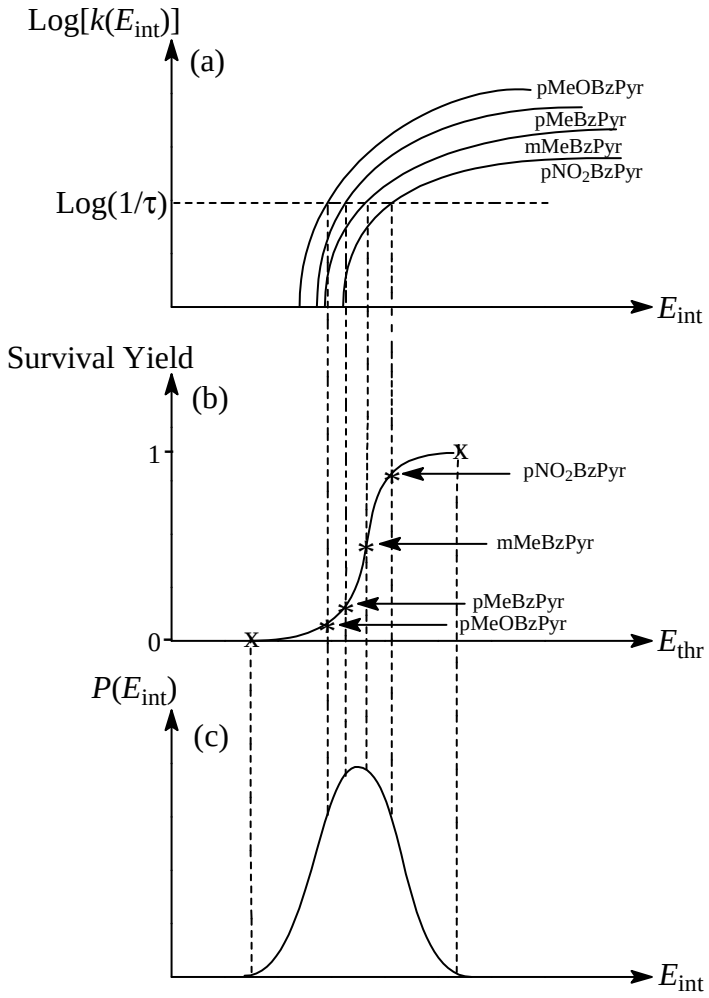


Figure 3.4 : Illustration de l'évaluation de la distribution d'énergie interne des ions en incluant le déplacement cinétique et à partir de la réactivité des ions thermomètres paraméthoxybenzylpyridium (pMeOBzPyr), paranitrobenzylpyridium (pNO$_2$BzPyr), paraméhylbenzylpyridium (pMeBzPyr) et métaméhylbenzylpyridium (pMeBzPyr). a) Evolution du logarithme de la constante de vitesse de fragmentation de chaque ion en fonction de l'énergie interne (E_{int}). b) Valeur du rendement de survie expérimentale de chaque ion thermomètre (*) reportée en fonction de l'énergie seuil d'apparition (E_{thr}) calculée à partir du temps de séjour τ des ions dans la source tel que décrit dans la figure a). c) Distribution d'énergie interne des ions obtenue à partir de la dérivée et de la courbe tracée à partir d'un ajustement des valeurs de la figure b) ; l'ajustement est réalisé pour une sigmoïde avec deux points fictifs (x) ajoutés pour un rendement de survie nul ou total.

Les allures des distributions d'énergie interne peuvent être décrites au travers de leur largeur à mi hauteur et de leur position sur l'échelle des valeurs d'énergie. D'après la démarche illustrée dans la Figure 3.2, elles apparaissent être reliées non seulement aux valeurs expérimentales de SY de chaque ion, mais aussi aux valeurs de E_{thr} qui dépendent de l'évolution de la courbe Log[k(E_{int})] *vs*.

E_{int} . L'influence de ce dernier paramètre qui est lié à des grandeurs moléculaires est non négligeable et doit faire l'objet d'une description plus particulière.

1.3 La méthode SY incluant le déplacement cinétique et le calcul de l'énergie seuil d'apparition de fragments

La valeur de E_{thr} peut être calculée à partir de la théorie RRKM/QET qui permet de calculer la constante micro-canonique de réaction de dissociation $k(E_{int})$ d'un ion en fonction d'une énergie interne E_{int} et d'une énergie critique E_0 grâce à l'équation :

$$k(E_{int}) = \frac{\sigma}{h}\frac{N^{\ddagger}(E_{int} - \varepsilon_0)}{\rho(E_{int})} \quad (7)$$

où, σ est la dégénérescence de la réaction (σ = 1 pour la réaction $PyR^+ \rightarrow Py + R^+$), h est la constante de Planck, $N^{\ddagger}(E_{int}\text{-}\varepsilon_0)$ est la somme des micro-états au niveau de l'état de transition dans une gamme d'énergie allant de 0 à $E_{int}\text{-}E_0$ et $\rho(E_{int})$ est la densité des micro-états de l'état fondamental à une énergie E_{int}.[34-36] Il y a plusieurs méthodes de calcul possibles pour évaluer $N^{\ddagger}(E_{int}\text{-}\varepsilon_0)$ et $\rho(E_{int})$.[37-39] Cependant, la plupart du temps, ces grandeurs sont évaluées par comptage direct grâce à l'algorithme de Beyer-Swinehart qui utilise les modèles de fréquence de l'ion à l'état fondamental et du complexe activé situé au niveau de l'état de transition.[40, 41] Le modèle de fréquence permettant d'exprimer $\rho(E_{int})$ est obtenu par calcul de chimie quantique. Il s'agit d'obtenir la valeur de la fréquence de chacun des 3N-6 oscillateurs à partir des résultats de minimisation en énergie des structures moléculaires de l'état initial. Par contre, il est plus difficile de déterminer la valeur de la somme d'états du complexe activé, quand on considère une réaction de dissociation par rupture simple. En effet, ainsi que l'illustre la Figure 3.5a, un état de transition est aisément localisable sur le chemin réactionnel conduisant du réactif aux produits lors d'une réaction de rupture avec réarrangement. Ce qui permet d'obtenir le fichier de fréquence des 3N-7 oscillateurs du complexe activé, où un degré de liberté est perdu puisqu'il correspond à la coordonnée de la réaction.

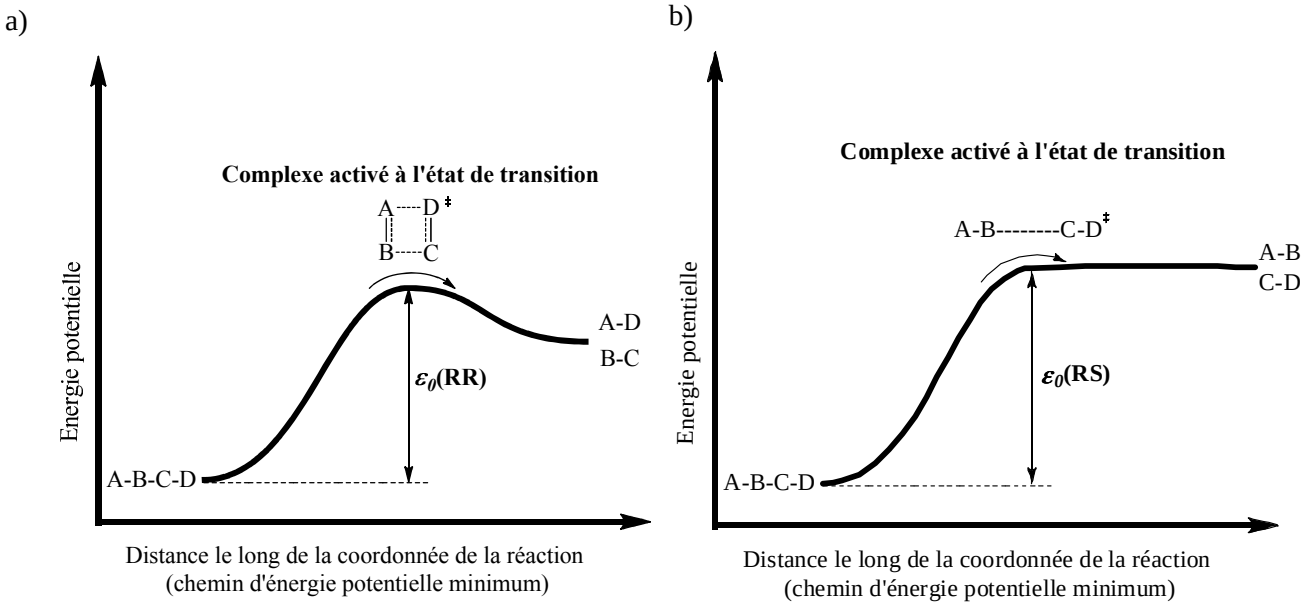


Figure 3.5 : Représentation schématique de l'évolution de l'énergie potentielle en fonction de la coordonnée de la réaction pour des réactions de fragmentation a) par rupture avec réarrangement (RR) et b) par rupture simple, dans le contexte du concept de l'état de transition

Dans le cas d'une réaction de rupture simple, la localisation de l'état de transition est plus difficile (voir Figure 3.5b). Dans ce cas, on définit un modèle moléculaire appelé complexe activé "lâche", pour lequel on construit le modèle de fréquences de la façon suivante : la fréquence correspondant à l'allongement de la liaison impliquée dans la rupture simple est éliminée, cinq autres fréquences associées à cette coordonnée de la réaction sont sélectionnées et leur valeur est modifiée par un même facteur d'échelle.[42] Des résultats publiés dans la littérature ont montré que cette façon de construire le fichier de fréquences du complexe activé pouvait être appliquée au cas de la fragmentation par rupture simple des cations benzylpyridinium dans le contexte d'une utilisation avec la méthode SY. Après calcul d'énergie et de fréquences de vibration par méthode *ab initio* HF/6-31G* de l'ion parent, une valeur de fréquence la plus proche de la vibration CH_2-N^+ est éliminée (~1200 cm^{-1}) et cinq fréquences sont choisies pour représenter le complexe activé. Il s'agit alors, de choisir arbitrairement deux valeurs proches de 800 cm^{-1}, deux valeurs proches de 600 cm^{-1} et une valeur proche de 100 cm^{-1} ; chacune étant abaissée d'un facteur 0,75.

Cette méthodologie peut d'ailleurs être aussi appliquée au cas des RR lorsque la réaction de fragmentation concerne de gros systèmes moléculaires, pour lesquels les temps de calculs seraient trop longs et ne permettraient pas de localiser l'état de transition. Pour construire le fichier de fréquences d'un tel complexe activé, on choisit un facteur d'échelle $\leq$ 0,75, mais surtout, on substitue la plus basse valeur de fréquence de vibration (~20 cm^{-1}) du fichier de l'ion parent par une valeur de l'ordre 1500 cm^{-1}. Il s'agit ici de modéliser un complexe activé "tendu" caractéristique des réactions RR, qui correspond à une structure rigidifiée dans laquelle la fréquence de rotation le long

de la liaison centrale est transformée en vibration hors du plan. Dans notre cas, une telle méthodologie sera utilisée lorsque des peptides modèles seront utilisés pour évaluer des distributions d'énergie interne en DIAMS et LDI sur or.

Energies critiques E_0, fichiers de fréquences, sommes et densités d'états, sont des paramètres moléculaires caractérisant une réaction considérée. Pour relier ces paramètres à des grandeurs réactionnelles macroscopiques comme l'énergie d'activation E_a, la différence d'entropie entre l'état de transition et l'état initial $\Delta S^{\ddagger}$ et le facteur pré-exponentiel d'Arrhenius A_{pe}, on suit la démarche suivante :

i) Les fonctions de partition de vibration de l'état initial et de l'état de transition, respectivement Q et $Q^{\ddagger}$, sont calculées à une valeur de température en utilisant les expressions (8) et (9) :

$$Q = \left\{ \prod_{i=1}^{s} \left[\frac{1}{1-\exp\left(\frac{h\nu_i}{k_B T} \right)} \right] \right\} \quad (8)$$

$$Q^{\ddagger} = \left\{ \prod_{j=1}^{s-1} \left[\frac{1}{1-\exp\left(\frac{h\nu_j^{\ddagger}}{k_B T} \right)} \right] \right\} \quad (9)$$

où T est la température, k_B est la constante de Boltzmann, ν_i représente la fréquence de vibration d'un oscillateur i parmi les s = 3N-6 degrés de liberté du réactant, $\nu_j^{\ddagger}$ représente la fréquence de vibration d'un oscillateur j parmi les s -1 = 3N-7 degrés de liberté du complexe activé N étant le nombre d'atomes.

ii) Les énergies thermiques de l'état initial E_{therm}^{0} et de l'état de transition $E_{therm}^{\ddagger}$ sont calculées à une valeur de température en utilisant les expressions (10) et (11) :

$$E_{therm}^{0} = \sum_{i=1}^{s} \frac{h\nu_i}{\exp\left(\frac{h\nu_i}{k_B T} \right) - 1} \quad (10)$$

$$E_{therm}^{\ddagger} = \sum_{j=1}^{s-1} \frac{h\nu_j^{\ddagger}}{\exp\left(\frac{h\nu_j^{\ddagger}}{k_B T} \right) - 1} \quad (11)$$

iii) La différence d'entropie entre l'état de transition et l'état initial $\Delta S^{\ddagger}$ est calculée à une certaine température et pour une réaction donnée en utilisant l'expression (12) :

$$\Delta S^{\ddagger} = R \ln \frac{\prod_{j=1}^{s-1} Q^{\ddagger}}{\prod_{i=1}^{s} Q} + \frac{E_{therm}^{\ddagger} - E_{therm}^{0}}{T} \quad (12)$$

où R est la constante des gaz parfaits et les termes du membre de droite de l'égalité sont obtenus pour une même température à partir des résultats des équations (8) à (11).

iv) Le facteur pré-exponentiel d'Arrhenius A_{pe} qui va caractériser la "lâcheté" de l'état de transition est calculé en utilisant l'expression (13) :

$$A_{pe} = \frac{k_B T}{h} \cdot \exp(1) \cdot \exp\left(\frac{\Delta S^{\ddagger}}{R}\right) \quad (13)$$

avec la valeur de $\Delta S^{\ddagger}$ qui est obtenue pour une même température à partir de l'équation (12).

Cette démarche qui sera utilisée dans notre cas, aussi bien pour les cations benzylpyridinium et les peptides modèles, permet de relier des paramètres strictement moléculaires obtenus initialement par calcul de chimie quantique (énergie critique de réaction et fréquences de vibration) à des grandeurs macroscopiques accessibles par l'expérience. Il est ainsi généralement admis qu'un état de transition lâche correspond à une valeur de $A_{pe} = 14$.[43, 44] C'est cette même valeur qui est choisie pour décrire la "lâcheté" de l'état de transition lors de la réaction de fragmentation par rupture simple des cations benzylpyridinium. L'évaluation de $k(E_{int})$ s'effectue alors en modifiant certaines valeurs de fréquence de sorte qu'elles vérifient la valeur de A_{pe} au travers des équations (8) à (13). Cette démarche est cohérente dans la mesure où la distribution d'énergie interne des ions considérés est de type thermique. Il peut être donc utile de rappeler brièvement la relation entre ces deux concepts.

1.4 L'énergie thermique

L'énergie thermique moyenne d'un système de molécules peut être définie comme l'excès d'énergie E de ce système relativement à un état d'énergie qui serait défini en fonction de la répartition des molécules sur leur niveau d'énergie le plus bas E_0. Elle peut aussi être considérée comme un degré de dégénérescence globale d'un système, déterminé par les niveaux d'énergie ε sur lesquels se répartissent les molécules, et par la température qui gouverne la distribution du nombre total de N particules sur un ensemble d'états. La disponibilité de ces états est représentée par les fonctions de partition q. On écrit alors :

$$E_{therm} = E - E_0 = \sum_{i=1}^{N} N_i (\varepsilon_i - \varepsilon_0) = \frac{N}{q} g_i \cdot \Delta\varepsilon \cdot \exp\left(\frac{-\Delta\varepsilon}{k_B T}\right) = \frac{N}{q} k_B T^2 \frac{dq}{dT} = RT^2 \frac{dq}{dT} \quad (14)$$

où ε_i est le niveau i d'énergie sur le lequel se répartissent les particules, ε_0 le niveau d'énergie fondamental g_i la dégénérescence des niveaux d'énergie considérés. Les fonctions de partition q sont normalement déterminées à partir des mouvements moléculaires de translation, de vibration et de rotation. Dans le cas de la détermination de l'énergie thermique d'un système moléculaire évoluant au travers d'une fragmentation, la conservation des moments cinétique et angulaire au cours de la réaction conduit à ne considérer que les fonctions de partition de vibration pour l'état de transition et pour l'état initial. Celles-ci ont été respectivement définies dans les équations (8) et (9) ainsi que l'énergie thermique moyenne à partir des expressions (10) et (11).

Dans le cas d'une molécule isolée, l'énergie thermique moyenne peut aussi être exprimée à partir de l'équation (10) où l'ensemble des fréquences ν_i définit le modèle de fréquences.

Si l'énergie d'un ensemble de molécules a pu être historiquement corrélée à la distribution des vitesses moléculaires à différentes températures selon la loi de répartition de Boltzmann, la distribution d'énergie interne au sein d'une molécule isolée peut être exprimée en considérant les énergies moléculaires et les densités d'états liés à un ensemble micro-canonique telle que :[45]

$$P(E_{\text{int}}) = \frac{\rho(\varepsilon)\cdot\exp\left(-\varepsilon/k_B T\right)}{\int_0^{\infty}\rho(\varepsilon)\cdot\exp\left(-\varepsilon/k_B T\right)} \quad (15)$$

L'équation (15), qui implique le calcul de la densité d'états vibrationnels $\rho(\varepsilon)$, a pour objectif de décrire la distribution d'énergie interne dans une molécule isolée. La distribution $P(E_{\text{int}})$ obtenue grâce à l'expression (15) n'est pas une gaussienne exacte, mais présente une trainée vers les hautes valeurs d'énergie interne.

Toutes ces équations nécessitent d'être calculées en utilisant un logiciel de modélisation adapté à la fois à la démarche choisie et au contexte d'étude proposé. Dans notre cas, c'est le logiciel MassKinetics qui a été mis à contribution.[46]

1.5 Le logiciel MassKinetics et les rendements de survie d'ion théoriques

La démarche adoptée initialement dans la méthode SY pour évaluer les distributions d'énergie interne était basée sur l'obtention de données expérimentales en rapport avec les rendements de survie d'ions relevés sur les spectres de masse. Cette démarche a été complétée grâce à l'utilisation du logiciel MassKinetics qui permet de modéliser le comportement d'un ion dans un spectromètre de masse aux travers de différents paramètres ajustables comme la distribution d'énergie interne.[46]

Il est donc possible par cette voie d'obtenir des rendements de survie d'ions théoriques et de les comparer avec les données expérimentales pour une distribution d'énergie interne choisie lors de la modélisation. Le logiciel MassKinetics permet de modéliser les vitesses de réaction, les échanges

d'énergie et les abondances d'ions produits dans un spectromètre de masse et leur évolution lorsque ces ions évoluent au sein du dispositif. Le concept de base de ce logiciel est de définir l'état d'un ion selon ses énergies cinétique et interne, puis de modéliser son comportement au travers des distributions d'énergie et de l'utilisation de fonction de probabilités pour le transfert entre les différents états. Les énergies cinétique et/ou interne des ions en phase gazeuse peuvent être modifiées en fonction de différentes paramètres tels que : l'accélération dans un champ électromagnétique, les échanges d'énergie radiative par absorption ou émission de photons, les échanges d'énergie de collision et la partition des différentes formes d'énergie lors de réactions chimiques (unimoléculaires ou bimoléculaires). Il est donc nécessaire de modéliser les séquences des différents évènements qui peuvent se produire dans un spectromètre de masse. On peut utiliser les paramètres géométriques de l'instrument, les voltages appliqués sur les différents systèmes d'accélération et de déviation ainsi que les différents temps de séjour des ions dans certaines parties du dispositif. Dans notre cas, la séquence suivante a été utilisée, pour rendre compte des expériences réalisées sur le MALDI-TOF BIFLEX III Bruker :

- Etape de formation des ions dans la source où la distribution d'énergie interne déposée au cours du processus LDI est modélisée.
- Vol libre des ions pendant une durée de 200 ns pour rendre compte du délai d'extraction.
- Accélération électrostatique entre IS1 et IS2 sur une distance de $2.5.10^{-3}$ m avec une différence de potentiel de 1760 V.
- Accélération électrostatique entre IS2 et la lentille portée à la terre sur une distance de $1.25.10^{-2}$ m avec une différence de potentiel de 17290 V.
- Sélection de l'ion suivie de sa détection au travers d'un vol dans l'analyseur linéaire sur une distance de 1.1850 m.

On notera que les énergies internes et cinétiques des cations préalablement à l'étape de désorption ionisation, ont été considérées à 293 K.

MassKinetics permet de calculer toutes les expressions (7) à (15) précédemment décrites en utilisant notamment l'algorithme de Beyer-Swinehart pour le calcul des sommes et densités d'états. Il utilise les fréquences de vibration des cations benzylpyridinium obtenues par calcul théorique en prenant en compte le modèle de l'oscillateur harmonique pour décrire les rotations moléculaires internes comme des vibrations de faible fréquence. Les modèles de fréquence des complexes activés et les énergies critiques des réactions sont également issus des calculs théoriques quand l'état de transition est localisable le long de la coordonnée de la réaction. Dans le cas d'une réaction de rupture simple, l'énergie critique de réaction est calculée à partir de l'équation (1) et le fichier de

fréquence de l'état de transition est construit selon la procédure proposée dans le paragraphe **1.3** en choisissant une valeur A_{pe} = 14 qui définit la configuration lâche de l'état de transition et implique, dans MassKinetics, le changement de valeurs de fréquences de l'état initial tel que décrit dans Tableau 3.1.

Fréquences de l'état fondamental devant être modifiées	Fréquences considérées dans le complexe activé pour Log(A_{pe}) = 14
800	581.28
800	581.28
600	484.4
600	484.4
100	72.66

Tableau 3.1 : Valeurs des fréquences de vibration de l'état initial choisies dans MassKinetics pour être modifiées afin de construire un fichier de fréquence de l'état de transition caractéristique d'une réaction de fragmentation se produisant avec un facteur pré-exponentiel de 14

Avec MassKinetics, il est possible de calculer l'abondance des ions et d'obtenir leur rendement de survie théorique SY_{THEO} en utilisant des paramètres d'ajustement liés à la distribution d'énergie interne des ions lors de leur formation dans la source. Ces paramètres notés X_c et w sont reliés à $P(E_{int})$ au travers d'une gaussienne (16) telle que :

$$P(E_{\text{int}}) = \frac{eV}{\text{w}\sqrt{\pi/2}} \exp\left[-2\frac{\left(E_{\text{int}} - \text{X}_\text{c}\right)^2}{\text{w}^2}\right] (16)$$

Cette expression empirique peut être comparée à une distribution de type thermique telle que proposée dans l'équation exacte (15) pour des systèmes aussi gros que des dipeptides et pour des températures proches de l'ambiante. Dans ce cas, la trainée de la distribution vers les hautes valeurs d'énergie issue de l'expression (15) peut être négligée et $P(E_{int})$ peut être assimilée à la gaussienne issue de (16).[45]

Pour relier la formule empirique (16) à des grandeurs moléculaires, on pose :

$$P(E_{\text{int}}) = \frac{eV}{W\sqrt{\pi/2}} \exp\left[-2\frac{\left(E_{\text{int}} - E_{\text{therm}}\right)^2}{W^2}\right] (17)$$

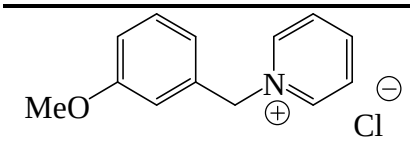
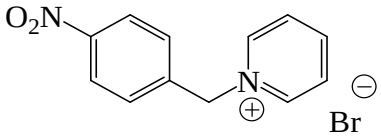
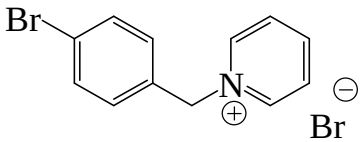
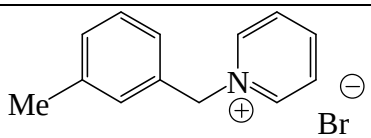
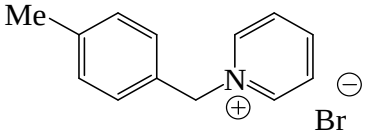
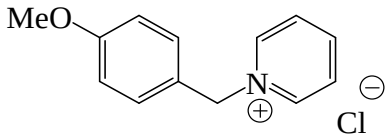
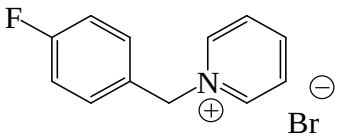
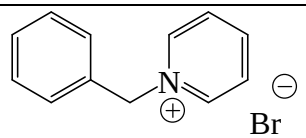
Dans l'expression (17), E_{therm} est l'énergie thermique moyenne calculée à partir de (10) et la largeur de la distribution W est déterminée par analyse de régression comme étant :

$$W = 1.80 \times 10^{-4} \left(eV/K\right) T\sqrt{s}\ (18).$$

La précision d'une telle approximation a été évaluée par la comparaison des valeurs de Xc d'après (16) et E_{therm} obtenues selon (15) et (17). On obtient une précision de ± 6% pour les peptides et d'une déviation standard de ± 8 % pour des petits systèmes comme les cations benzylpyridinium pris à des températures comprises entre 300 et 2000 K.[45]

2 Evaluation de la distribution d'énergie interne en DIAMS et LDI sur Or des ions benzylpyridinium substitués

2.1 Structures des sels de benzylpyridinium

Structure	Nom du composé	Nom du cation (*m/z*)	m/z du fragment
	Chlorure de 3-Methoxy-benzylpyridinium	mMeOBzPyr (200)	121
	Bromure de 4-nitro- benzylpyridinium	pNO$_2$BzPyr (215)	136
	Bromure de 4-bromo- benzylpyridinium	pBrBzPyr (248)	169
	Bromure de 3-Methyl- benzylpyridinium	mMeBzPyr (184)	105
	Bromure de 4- Methyl- benzylpyridinium	pMeBzPyr (184)	105
	Chlorure de 4-Methoxy-benzylpyridinium	pMeOBzPyr (200)	121
	Bromure de 4-fluoro- benzylpyridinium	pFBzPyr (188)	109
	Bromure de benzylpyridinium	BzPyr (170)	91

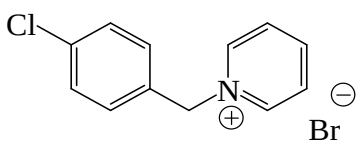
	Bromure de 4-chloro-benzylpyridinium	pClBzPyr (204)	125

Tableau 3.2 : Structures et dénominations des sels de benzylpyridinium différemment substitués utilisés dans le cadre de la présente étude

2.2 Fréquences de vibration et énergie critique de réaction via les calculs de chimie quantique

Les calculs de chimie quantique ont été réalisés par le docteur Nicolas Galland du Laboratoire de Spectrochimie et Modélisation de la Faculté des Sciences et des Techniques de l'Université de Nantes (UPRES-EA 1149, 1, quai de Tourville-BP 1026 44035 Nantes, CEDEX) en utilisant la suite de programme Gaussian 03.[47] Au regard du grand nombre de réactions envisageables dans le cas de la fragmentation des cations benzylpyridinium, des explorations rapides de la surface d'énergie potentiel ont été réalisées par les méthodes Hartree Fock HF et de la fonctionnelle de la densité B3LYP en conjonction avec un ensemble de base de type 6-31G*. Une étude préalable a été réalisée sur des petits systèmes pour confirmer l'occurrence de rupture simple par allongement de la liaison C-N.[48] Dans le cas des cations benzylpyridinium du Tableau 3.2 et de leurs produits de rupture de la liaison C-N, les géométries, les énergies liées à la réaction et les propriétés vibrationnelles des différentes entités ont été recalculées en utilisant le niveau théorique MP2/6-31+G**. Comme les dérivés "méta" des cations benzylpyridinium peuvent se révéler sous la forme de plusieurs conformères, les énergies de réactions ont été ré-affinées grâce aux résultats de calculs QCISD/6-31+G**//MP2/6-31+G**. Les propriétés vibrationnelles et structurales ont ensuite été ré-optimisées pour tous les cations au niveau MP2/6-31+G**. A noter que le cas du dérivé para-bromé, pBrBzPyr n'a pas pu être étudié aussi précisément étant donné la taille des bases requises pour son optimisation. Il n'a donc pas fait l'objet de l'étude expérimentale qui suit. On notera pour information les valeurs d'énergie critiques de réactions reportées dans le Tableau 3.3.

Cation benzylpyridinium	Energie critique de réaction en eV
pMeOBzPyr	1.763
mMeOBzPyr	2.325
pMeBzPyr	2.193
mMeBzPyr	2.332
pClBzPyr	2.317
pFBzPyr	2.339
BzPyr	2.423
pNO_2BzPyr	2.828

*Tableau 3.3 : Energies critiques obtenues par calcul de chimie quantique QCISD/6-31+G**//MP2/6-31+G** des réactions de dissociation par rupture simple de cations benzylpyridinium différemment substitués.*

2.3 Mesures de rendements de survie expérimentaux en DIAMS et LDI sur Or

Pour cette étude, trois surfaces sont utilisées : une plaque DIAMS, une plaque d'or (pour la LDI) et une plaque d'or recouverte par une monocouche de décane-thiols (SAM C10).

Chaque sel est dissous dans un mélange H_2O/MeOH (1:1) à une concentration de 30 mM, puis deux solutions filles sont obtenues en mélangeant les sels par groupes de quatre et en diluant dix fois. 1 µL est directement déposé sur la surface étudiée (DIAMS, Or ou SAM C10) soit environ 0.75 nmol par sel. Sur les spectres de masse (Figure 3.6), les ions parents M^+ et les ions fragments F^+ par perte de pyridine sont détectés.

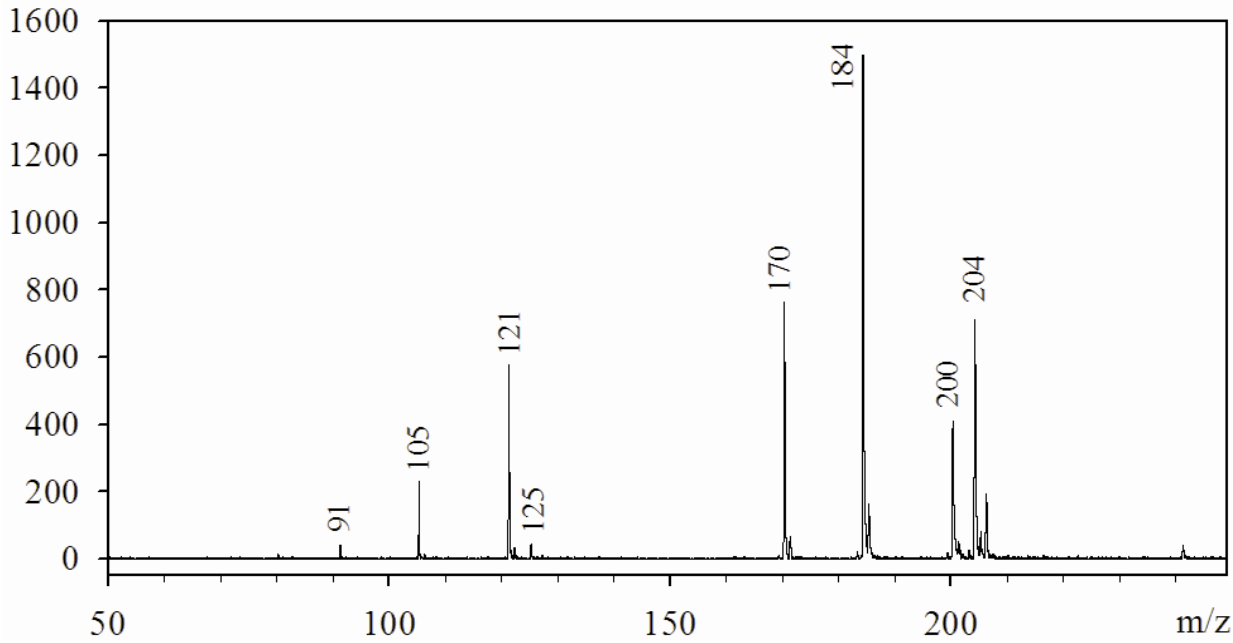


Figure 3.6 : Spectre de masse DIAMS d'un mélange de Benzylpyridinium : pClBzPyr (M+ : m/z 204. F+ : m/z 125), pMeOBzPyr (M+ : m/z 200; F+ : m/z 121), pMeBzPyr (M+ : m/z 184; F+ : m/z 105) et BzPyr (M+ : m/z 170; F+ : m/z 91) (Linéaire, puissance laser : 60%, gain du détecteur : 5, amplification électronique : 1, accumulation de 25spectres).

Les mesures sont d'abord effectuées en DIAMS et en LDI pour trois puissances laser différentes (70%, 80% et 90%). Dans une seconde étude, la puissance laser est fixée à 70% et une nouvelle surface est utilisée, la SAM C10, qui va permettre d'étudier l'influence du chromophore sur la distribution d'énergie interne des ions formés.

2.4 Evaluation de la distribution d'énergie interne par MassKinetics

Les distributions d'énergie interne sont déterminées à partir des rendements de survie d'ions expérimentaux. La fonction gaussienne (16) est utilisée pour décrire la distribution, elle fait intervenir un couple de variables Xc/w qui est ajusté afin d'obtenir la meilleure corrélation entre les rendements de survie expérimentaux SY_{EXP} et calculés SY_{THE}. La confrontation des rendements de survie d'ions expérimentaux et théoriques, comme l'illustre la Figure 3.7, permet de vérifier l'adéquation des variables choisies pour modéliser la distribution d'énergie interne des ions.

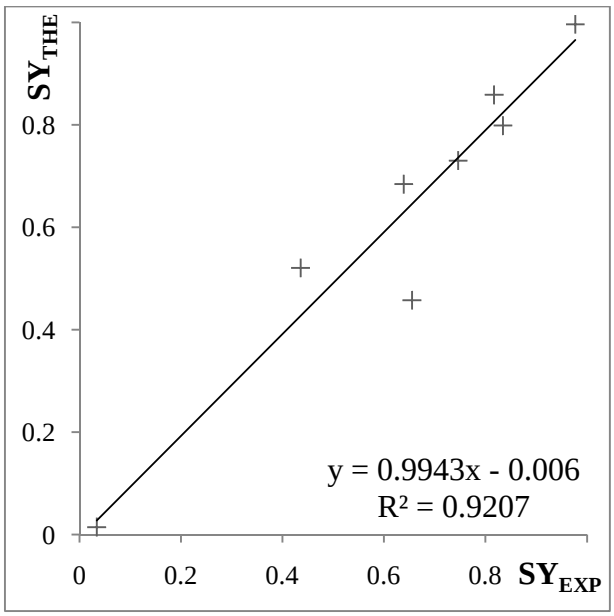


Figure 3.7 : Corrélation entre les rendements de survis expérimentaux en DIAMS pour une puissance laser de 90% et les rendements de survis calculés en considérant une distribution d'énergie interne de type gaussienne avec Xc = 5.20 et w = 1.20.

Les distributions d'énergie interne des ions formés lors du processus de désorption/ionisation $P(E_{int})$ ont été estimées pour les trois puissances laser et pour les deux surfaces. Elles sont représentées sur la Figure 3.8.

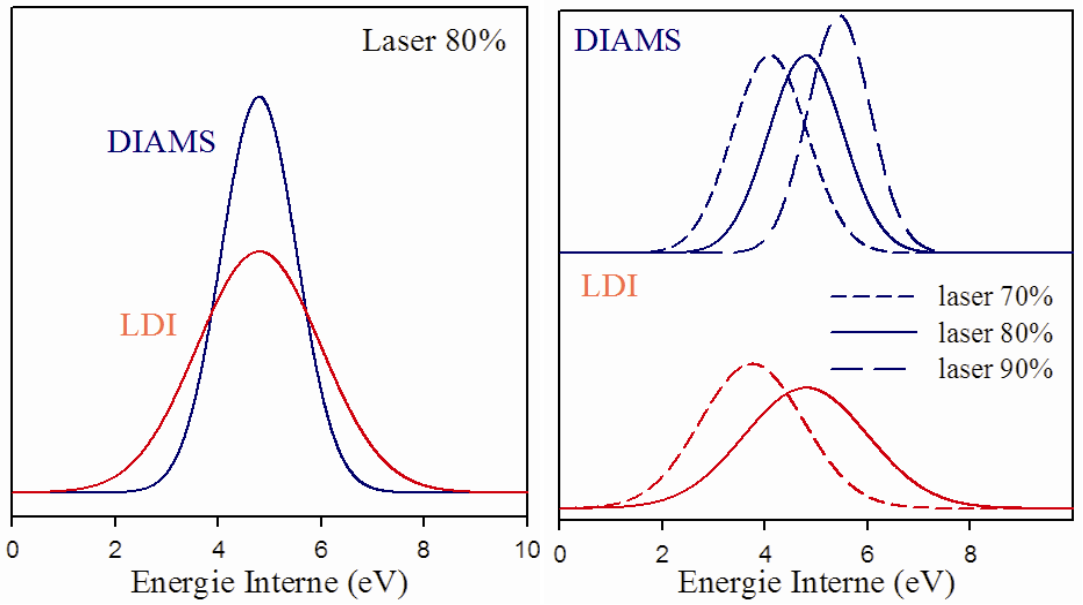


Figure 3.8 : Comparaison des $P(E_{int})$ dans le cas de la SAM DIAMS et du LDI sur or pour les mélanges de sels de benzylpyridinium et leur évolution en fonction de la puissance laser utilisée. (à partir de spectres enregistrés en mode positif linéaire, puissance laser : 80%, gain du détecteur : 5, amplification électronique : 1, accumulation de 25spectres)

En comparant, pour une même puissance laser, les distributions d'énergie interne obtenues en DIAMS et en LDI, il apparait que celles-ci sont à peu près centrées sur la même valeur d'énergie moyenne X_c. Mais, la largeur, associée à la variable w, est plus importante en LDI qu'en DIAMS. Cette distribution plus large explique l'observation qui a été faite avec l'angiotensine II dans le Chapitre 2. En effet, étant donnée la largeur de la distribution, la proportion de cations ayant une énergie interne élevée est plus importante dans le cas de la LDI, le taux d'ions fragments est donc plus élevé. La détermination de la distribution d'énergie interne, n'a d'ailleurs pas été possible à la puissance laser 90% car les valeurs de SY sont quasiment toutes nulles.

Une étude semblable est menée sur une monocouche dépourvue de chromophore (Figure 3.9) en utilisant une puissance laser de 80%, l'enveloppe de la distribution reste relativement la même, mais elle est décalée vers les plus hautes énergies. Il apparait alors clairement que le chromophore joue un rôle protecteur puisqu'en son absence, l'énergie interne moyenne des ions formés est plus importante.

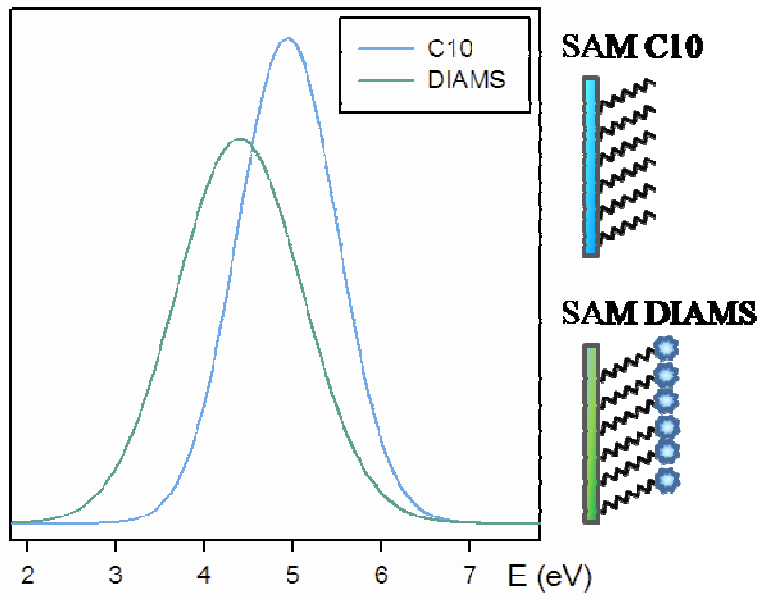


Figure 3.9 : Comparaison des $P(E_{int})$ dans le cas de la SAM DIAMS et de la SAM C10 pour les mélanges de sels de benzylpyridinium. (à partir de spectres enregistrés en mode positif linéaire, puissance laser : 80%, gain du détecteur : 5, amplification électronique : 1, accumulation de 25 spectres)

2.5 Interprétation

D'après la comparaison des distributions d'énergie interne des cations benzylpyridinium, Il semblerait que l'utilisation d'une monocouche présentant des groupements chromophores comme le bithiophène, permette de constituer un milieu protecteur vis-à-vis du processus LDI. Les distributions sont plus larges pour le LDI sur or qu'en DIAMS. Elles ont aussi tendance à se

déplacer vers les plus fortes valeurs d'E_{int} avec l'énergie du faisceau laser, ce phénomène s'accompagnant d'un élargissement plus important de $P(E_{int})$ en LDI sur or qu'en DIAMS. Il n'est pas envisageable d'après les mesures d'AFM réalisées sur les surfaces testées, de corréler l'influence de la taille de pores ou trous éventuellement présents à la surface, avec la dimensionnalité de la plume en expansion et la largeur de $P(E_{int})$ tel qu'évoqué dans le cas du DIOS.[26, 27]

Si on compare ces distributions d'énergie interne à des distributions de type thermique obtenues au travers de l'équation (15), il apparaît d'après les courbes reportées dans la Figure 3.10, que le processus de désorption laser lié à la méthode DIAMS peut être caractérisé comme purement thermique. On remarquera à ce sujet la trainée de la courbe de distribution thermique vers les hautes énergies obtenue avec l'équation exacte (15) par rapport à la $P(E_{int})$ modélisée à l'aide de l'expression (16) dans le cas du DIAMS. Cet écart observable pour des petits systèmes comme les cations benzylpyridinium est en accord avec la précision de l'approximation évoquée au paragraphe 1.5. Les résultats d'une modélisation prenant en compte une distribution thermique (Figure 3.11) appuient cette théorie et montrent une parfaite corrélation entre rendements de survie théoriques et expérimentaux. Par contre dans le cas du LDI sur or, cette distribution est plus large que la distribution thermique, ce qui laisse envisager l'intervention de mécanismes de désorption différents. Il faut d'ailleurs mentionner que la température des ions telle qu'elle est modélisée est de 1410 K, ce qui est beaucoup trop élevé pour être en accord avec le mécanisme de la plume froide évoqué dans la partie théorique dans le cas d'une faible irradiance laser. Le modèle dit de la plume froide est en effet relatif à des températures relativement basses mesurées dans le nuage gazeux. On ne peut donc pas prendre en compte un chauffage unique par transfert de matière thermiquement excitée à travers la surface puis refroidie par le phénomène d'expansion. Les phénomènes étudiés ici seraient donc à considérer d'avantage au travers d'une irradiance dont les valeurs se situeraient proche des fortes irradiances. Le transfert d'énergie se produirait par conduction directe avec la cible. Dans ce cas, la diffusivité thermique importante de la surface d'or, telle qu'évoquée précédemment, seraient cohérente avec l'hypothèse que ce milieu est plus apte à transférer la chaleur qu'à la stocker, conférant ainsi des distributions d'énergie interne qui augmentent et s'élargissent d'avantage en fonction de l'énergie laser que dans le cas du DIAMS.

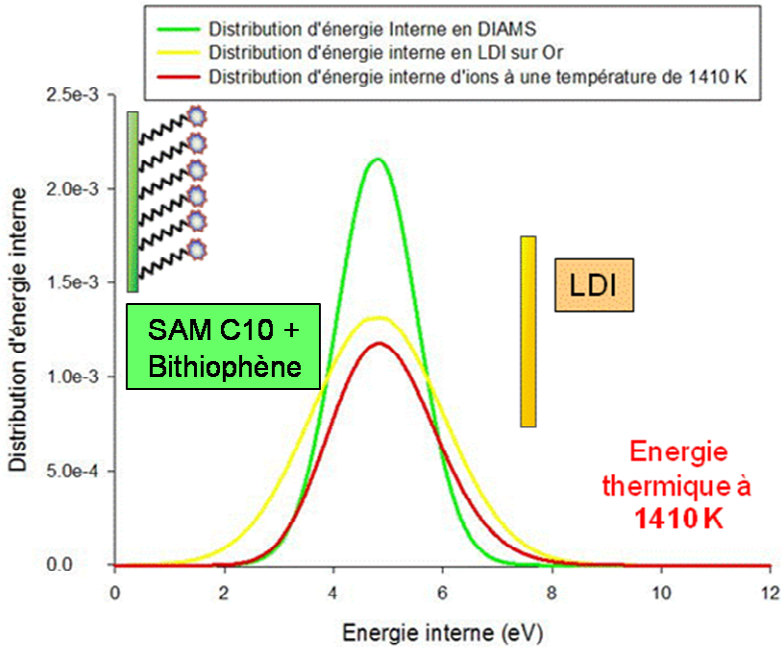


Figure 3.10 : Comparaison des distributions d'énergie interne de cations benzylpyridinium évaluées sur LDI sur or et DIAMS avec une distribution d'énergie thermique des cations déterminée pour une température de 1410 K

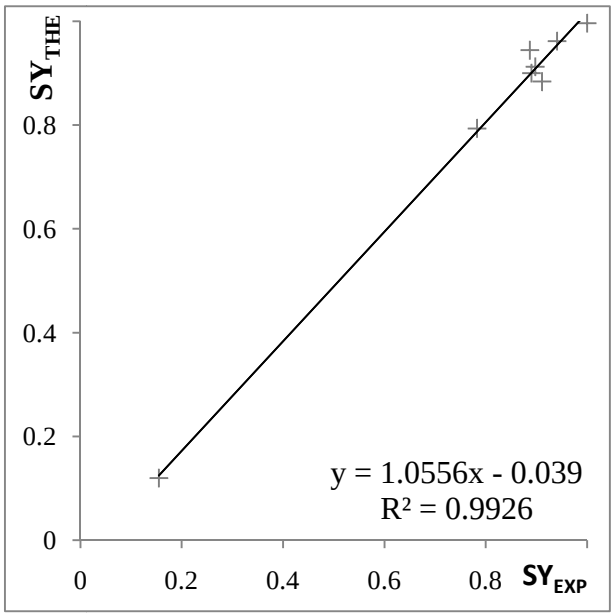


Figure 3.11 : Corrélation entre les rendements de survis expérimentaux en DIAMS pour une puissance laser de 80% et les rendements de survis calculés en considérant une distribution d'énergie interne de type thermique de 1410 K.

3 Evaluation de la distribution d'énergie interne en DIAMS et LDI sur Or de peptides modèles

3.1 Nature et préparation des peptides thermomètres utilisés

Les peptides synthétisés par l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) à Montpellier sont protonés sur le résidu arginine positionné vers la partie N-terminale tel qu'illustré dans la **Figure 3.12** pour le peptide $[LDIFSDFR+H]^+$ et dans la **Figure 3.13** pour le peptide $[LEIFSEFR+H]^+$.

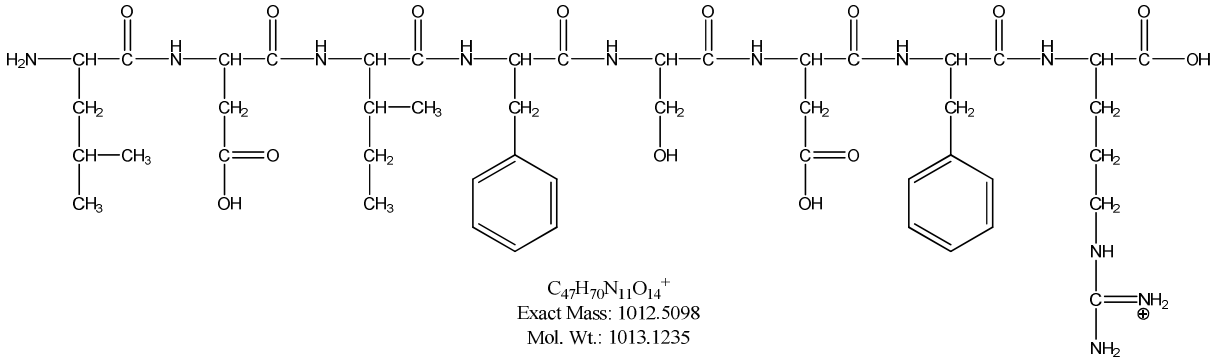


Figure 3.12 : Formule semi développée du peptide $[LDIFSDFR+H]^+$

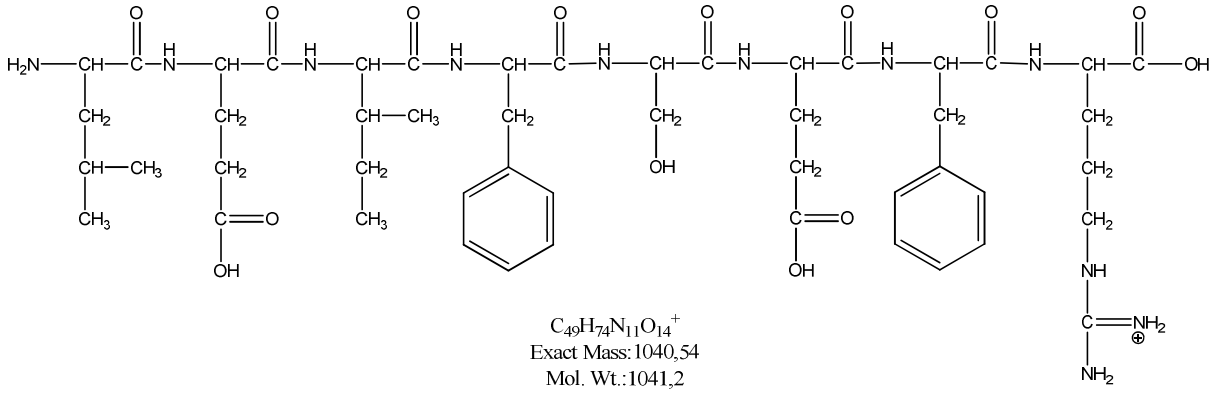


Figure 3.13 : Formule semi développée du peptide $[LEIFSEFR+H]^+$

Dans un premier temps, chaque peptide est prélevé dans des eppendorf séparés suivant les masses données dans le **Tableau** 3.4, puis dissous dans 1 mL d'eau ultra-pure.

Peptides	LDIFSDFR	LEIFSDFR
Masse prélevée (mg)	1,25	0,99

Tableau 3.4 : Masses de LDIFSDFR et LEIFSEFR prélevées

Il faut mentionner que le peptide LEIFSEFR a montré des résistances à se dissoudre. Ce qui est probablement dû à la présence d'acides aminés hydrophobes, comme l'isoleucine ou la leucine. Face à cette résistance, de l'acétonitrile a été ajoutée (soit 4 µL), mais n'a pas permis de réaliser une dissolution complète. Un volume de 7 µL de 0,1% d'acide trifluoroacétique, connu sous le nom de TFA, a donc été introduit dans l'eppendorf et a permis la dissolution totale du peptide récalcitrant. Ce mode opératoire est suivi pour tous les peptides. Deux dilutions ont enfin été réalisées : une dilution par 10 et par 100 (respectivement des volumes de 100 et 10 µL prélevés d'échantillons dans 1 mL d'eau ultra pure). Ces échantillons sont déposés sur la plaque à l'aide d'une micropipette réglée à 0,7 µL.

3.2 Réactivité des peptides protonés

Les peptides tels que ceux étudiés ici, ont la particularité de se fragmenter de manière sélective. Différents mécanismes de fragmentation ont été proposés pour rendre compte de leur réactivité.[49, 50] Celle-ci est liée au fait que le proton initialement positionné sur le résidu arginine du coté C-terminal, est séquestré par solvatation de charge avec l'acide carboxylique C-terminal. L'impossibilité de mobilité, qui résulte pour ce proton, conduit alors à une orientation sélective de la réaction de fragmentation. Dans le cas de LDIFSDFR, le résidu acide aspartique situé du côté N-terminal conduit à un ion *m/z* 784 (voir Schéma 3.1), tandis que l'acide aspartique positionné du côté C-terminal conduit à un ion *m/z* 322 (voir Schéma 3.2). Les mécanismes réactionnels de ces deux fragmentations sont donnés dans le cas de $[LDIFSDFR+H]^+$ dans le Schéma 3.1 et dans le Schéma 3.2. Les structures et les rapports *m/z* des ions produits dans le cas de la fragmentation de $[LDIFSDFR+H]^+$ sont reportés dans le Schéma 3.3.

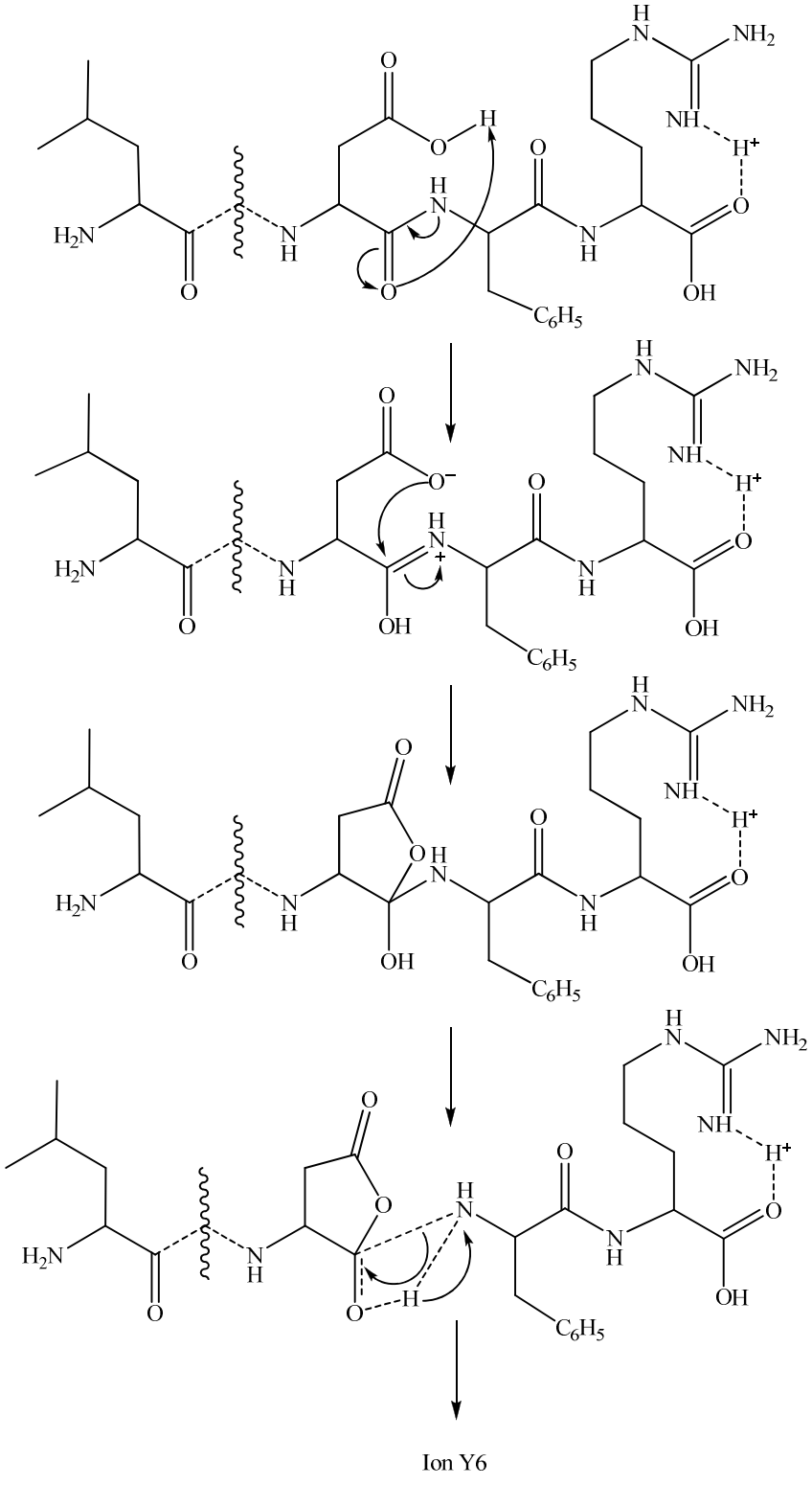


Schéma 3.1 : Mécanisme de formation de l'ion m/z 322 (ion Y6) à partir de la fragmentation du peptide LDIFSDFR

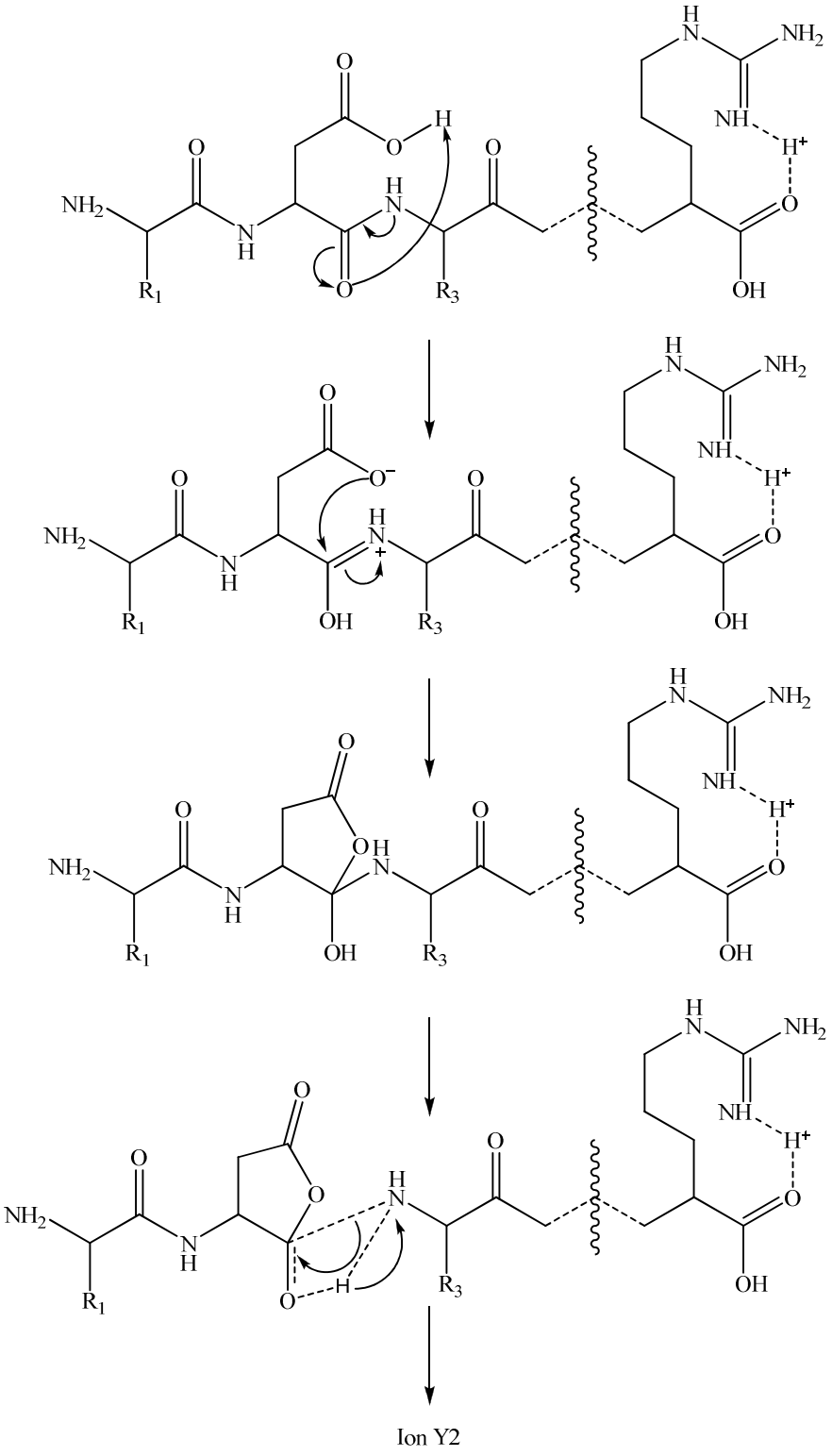
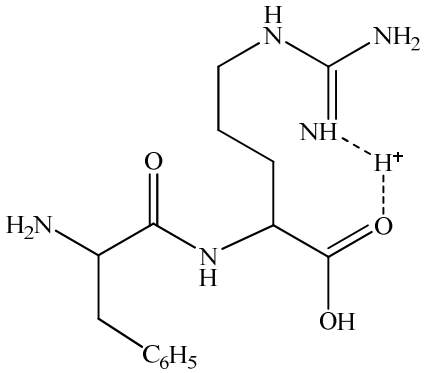
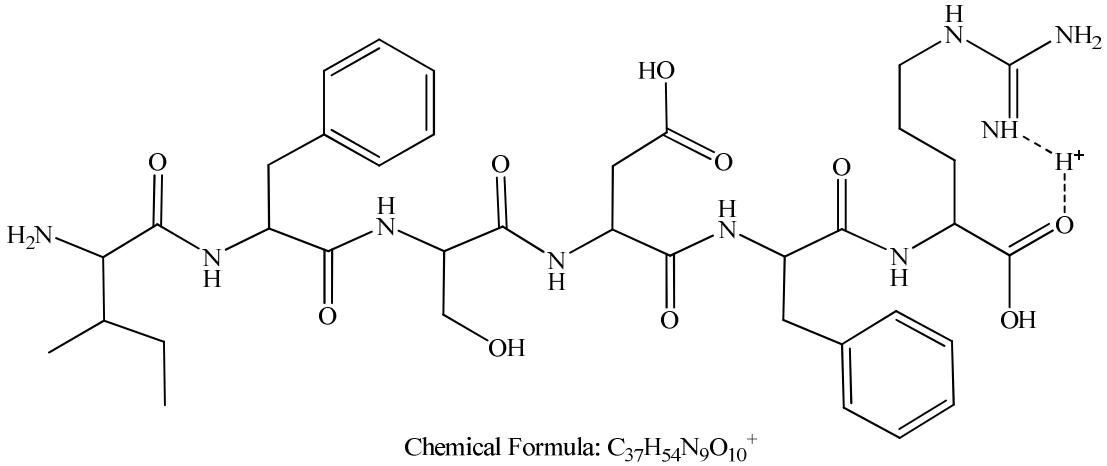


Schéma 3.2 : Mécanisme de formation de l'ion m/z 784 (ion Y2) à partir de la fragmentation du peptide LDIFSDFR



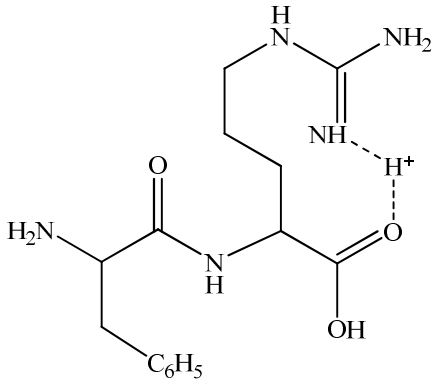
Chemical Formula: $C_{15}H_{24}N_5O_3^+$
Exact Mass: 322.19



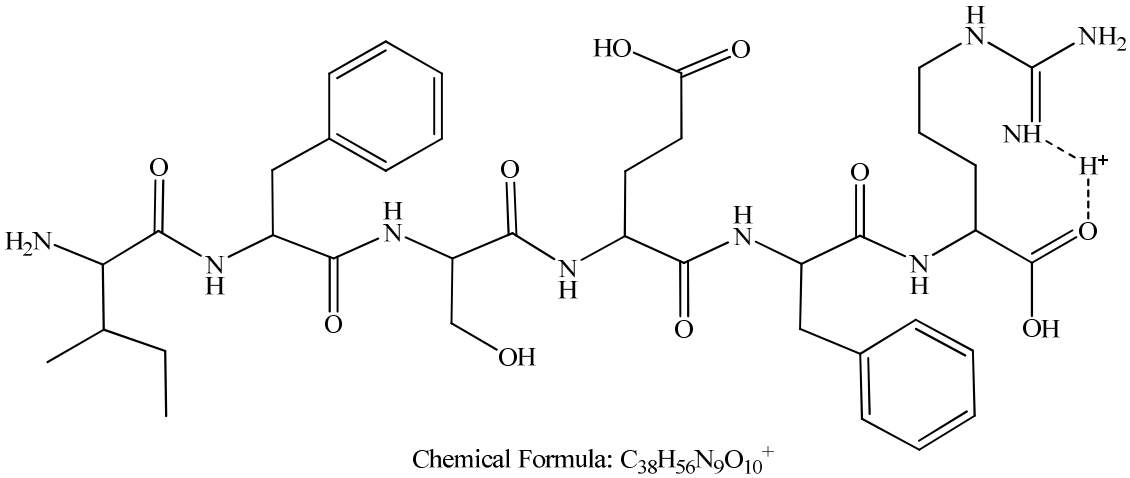
Chemical Formula: $C_{37}H_{54}N_9O_{10}^+$
Exact Mass: 784.40

Schéma 3.3 : Structures et rapports masse sur charge des ions m/z 322 (Ion Y6) et m/z 784 (ion Y2) issus de la fragmentation sélective de l'ion [LDIFSDFR+H]$^+$.

Dans le cas des fragmentations du peptide [LEIFSEFR+H]$^+$ seuls les structures et les rapports *m/z* des ions fils sont reportés (voir Schéma 3.4). Les mécanismes de fragmentations sont, en effet, supposés équivalents. Il faut toutefois signaler que dans le cas de la fragmentation de [LEIFSEFR+H]$^+$, on peut envisager une contrainte supplémentaire au niveau de l'état de transition étant donnée la taille de la chaîne alkyl du résidu glutamique impliqué dans le mécanisme de fragmentation. Cette contrainte structurale devrait avoir un impact sur la valeur de la différence d'entropie entre l'état initial et l'état de transition.



Chemical Formula: $C_{15}H_{24}N_5O_3^+$
Exact Mass: 322.19



Chemical Formula: $C_{38}H_{56}N_9O_{10}^+$
Exact Mass: 798.41

Schéma 3.4 : Structures et rapports masse sur charge des ions m/z 322 (Ion Y6) et m/z 798 (ion Y2) issus de la fragmentation sélective de l'ion $[LEIFSEFR+H]^+$.

3.3 Réalisation des fichiers de fréquences des peptides protonés

La réalisation du fichier de fréquences de vibration de l'état initial du peptide protoné est basée sur une procédure décrite dans la littérature.[51] Dans un premier temps, les fréquences de vibration de 20 acides aminés ont été calculées en utilisant une méthode de chimie quantique de type DFT et des bases étendues de type 6-31G**. Le calcul de ces fréquences est réalisé à partir d'une géométrie d'énergie minimum optimisée par la même méthode B3LYP/6-31G**. Dans un deuxième temps, les fréquences de vibration d'un peptide linéaire incorporant les différents acides aminés sont déterminés en considérant que :

i. Pour un acide aminé positionné à l'extrémité N-terminal du peptide, quatre modes de vibration sont éliminés. Il s'agit de l'élongation, de la déformation et de la torsion de la liaison O-H ainsi que de l'allongement de la liaison C=O. Pour un acide aminé C-terminal, deux modes de vibration sont éliminés. Il s'agit de l'élongation et de la déformation de la liaison N-H.

ii. Pour un acide aminé inclus dans la chaîne peptidique, les six modes de vibration décrits précédemment sont éliminés. Ensuite, trois fréquences de vibration associées à la liaison peptidique sont ajoutées. Ainsi, pour chaque liaison peptidique les fréquences correspondant au nombre d'ondes 44, 294 et 1149 cm^{-1} doivent être ajoutées.

iii. Pour l'attachement d'un proton, un mode de vibration d'élongation N-H de 3600 cm^{-1} et un mode de vibration de déformation NH_2 de 1600 cm^{-1} sont ajoutés. La troisième fréquence de vibration ajoutée est de 1000 cm^{-1}, elle correspond à la moyenne des valeurs de fréquences de vibration de déformation hors du plan de la liaison N-H (750 cm^{-1}), de vibration de cisaillement du groupement NH_2 (850 cm^{-1}) et de vibration de torsion du groupement de NH_2 (1350 cm^{-1}). Pour vérifier l'influence de chacune de ces fréquences (750, 850, 1000 et 1350 cm^{-1}), les courbes Log[$k(E_{int})$] *vs.* E_{int} sont calculées à l'aide du Logiciel MassKinetics, à partir de l'expression (7) et en utilisant un fichier de fréquences contenant l'une ou l'autre de ces valeurs.

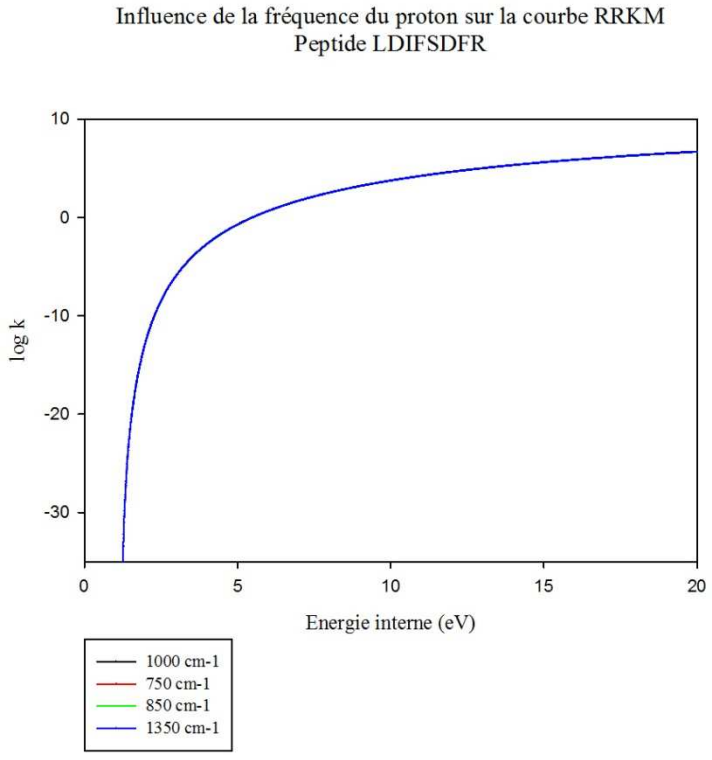


Figure 3.14 : Courbes Log[k(E_{int})] vs. E_{int} calculées dans le cas du peptide LDIFSDFR à l'aide du Logiciel MassKinetics en utilisant différents modèles de fichiers de fréquences qui ne diffèrent que par une valeur de fréquence de vibration de l'attachement du proton (750, 850, 1000 ou 1350 cm^{-1})

La Figure 3.14 montre clairement que les courbes obtenues se superposent. Par conséquent les fréquences de vibration du proton, données par les quatre valeurs proposées, n'ont aucune influence

sur la constante RRKM. Ces résultats sont vérifiés pour le peptide LEIFSEFR. C'est la valeur moyenne de 1000 cm^{-1} qui a été retenue dans notre cas.

L'élaboration du fichier de fréquences de l'état de transition est une étape difficile. En effet, l'état de transition correspondant à la réaction de fragmentation d'un peptide ionisé à l'état de radical cation ou de molécule protonée est difficile à modéliser. Sa structure est mal connue et il n'est pas possible de faire une recherche d'état de transition par calcul de chimie quantique étant donné le nombre d'atomes à considérer dans un peptide. Le temps de calcul s'avèrerait trop élevé, même avec le choix de méthode incluant des bases peu étendues. Ce qui limiterait, de plus, la précision des résultats. Pour palier à ce manque d'information structurale et mécanistique, une démarche analogue à celle décrite dans le paragraphe 1.3 a été utilisée pour modéliser un fichier de fréquences de vibration à l'état de transition. On considère dans un premier temps que la fréquence de vibration correspondant à l'allongement de la liaison C-N, ν = 1149cm^{-1}, doit être supprimée. En effet, ce mode de vibration correspond à la coordonnée de réaction. Dans un deuxième temps, et en accord avec la littérature, le fichier de fréquences de l'état initial est pris en compte et les valeurs de fréquences de vibration ν sont réduites de la façon suivante : aucune correction n'est apportée pour $\nu > 2000 cm^{-1}$, réduction des fréquences de l'ordre de 0,5% pour 2000 $cm^{-1} \geq \nu \geq 1000\ cm^{-1}$, réduction des fréquences de l'ordre de 0,1% pour 300 $cm^{-1} > \nu \geq 25\ cm^{-1}$.[52] Ces modifications sont liées au cas des fréquences de l'acide aspartique, pour le peptide LDIFSDFR, et de l'acide glutamique, pour le peptide LEIFSEFR, puisque seuls ces acides aminés sont étroitement impliqués dans les réactions de fragmentation (voir Schéma 3.1). De plus, une rotation autour de la liaison C-N, caractérisée par la plus faible fréquence (44 cm^{-1}) est transformée par une vibration hors du plan de fréquence supérieure (1500 cm^{-1}).

Pour valider les fichiers de fréquences modélisés, la différence d'entropie $\Delta S^{\ddagger}$ entre l'état de transition et l'état initial de la réaction de fragmentation des peptides protonés est calculée à l'aide des équations (8) à (12). Les valeurs obtenues pour les deux peptides sont comparées aux valeurs expérimentales reportées dans la littérature.[53] Les résultats de cette comparaison sont reportés dans le Tableau 3.5 et indiquent la validité de la méthode utilisée que ce soit dans le cas du peptide LDIFSDFR ou dans celui du peptide LEIFSEFR. Mentionnons cependant que pour ce dernier, une étape supplémentaire a été mise au point afin d'être en accord avec la littérature. Les fréquences de l'état initial de l'acide glutamique proches de 1000 cm^{-1} sont multipliées par un facteur de 2.[1] Ces fréquences sont choisies arbitrairement : il s'agit de 968, 1024, 1059, 1124 et 1144 cm^{-1}.

[1] La multiplication des fréquences de l'état initial par ce facteur 2 a donné des résultats conformes à la littérature.

Peptide	Valeurs de la littérature	Valeurs calculées
LDIFSDFR	$\Delta S^{\#}$ = -33,02	$\Delta S^{\#}$ = -32,561
LEIFSDFR	$\Delta S^{\#}$ = -52,25	$\Delta S^{\#}$ = -52,033

Tableau 3.5 : Comparaison de la différence d'entropie entre la littérature et le calcul théorique

L'élaboration des fichiers de fréquences de l'état de transition conduit à des résultats de différences d'entropie proches de ceux de la littérature pour les deux peptides considérés. Ces fichiers de fréquences de l'état de transition sont utilisés dans la détermination des distributions d'énergie interne des peptides.

3.4 Evaluation des distributions d'énergie interne et interprétation

Les analyses LDI/MS des peptides ont été réalisées sur différentes surfaces, en DIAMS et en LDI sur or. Les spectres de masse, donnés en **Annexe 2**, mettent en évidence une seule fragmentation pour chaque peptide, celle de plus faible rapport *m/z*. Les rendements de survie expérimentaux obtenus pour les peptides dilués par 100 sont reportés dans le **Tableau 3.6** pour la SAM DIAMS et pour le LDI sur or.

Peptide	DIAMS	LDI
LDIFSDFR	0,89285714	0,71052632
LEIFSEFR	0,5208333	0,67142857

Tableau 3.6 : Valeurs des SY_{EXP} expérimentaux mesurés à partir des peptides protonés en DIAMS et en LDI/or

Les distributions d'énergie interne ont été déterminées par l'intermédiaire de la fonction gaussienne (16). Différents couples Xc/w ont été déterminés pour lesquels le rendement de survie théorique SY_{THE} est comparable au rendement de survie expérimentaux SY_{EXP}.

Les $P(E_{int})$ évaluées dans ce contexte sont représentées sur la **Figure 3.15** pour les deux peptides.

a) **b)**

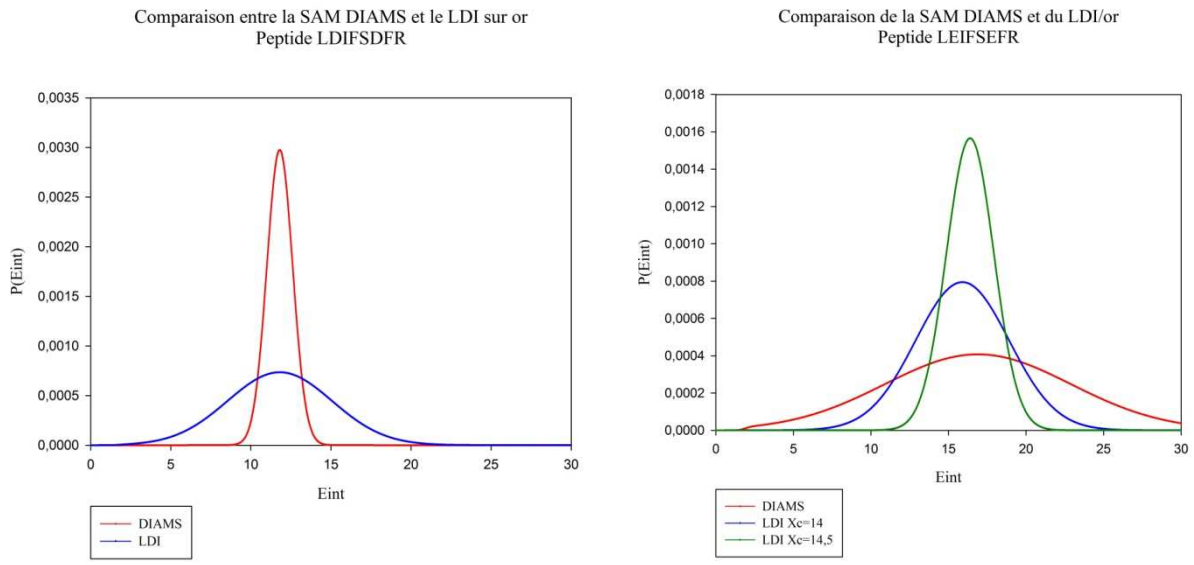


Figure 3.15 : Comparaison des $P(E_{int})$ pour la SAM DIAMS et le LDI sur or pour a) le peptide LDIFSDFR et b) le peptide LEIFSEFR, chaque peptide étant dilué 100 fois.

D'après les courbes en bleu de la Figure 3.15, il apparaît que la désorption ionisation laser sur surface d'or confère une distribution d'énergie interne comparable aux espèces $[M+H]^+$ des deux peptides étudiés. La largeur de la $P(E_{int})$ pour le LDI sur or est équivalente entre les deux peptides, à savoir w = 6,5 pour LDIFSDFR et w = 6 pour LEIFSEFR si Xc = 14. La distribution d'énergie en DIAMS est plus étroite (paramètre w) qu'en LDI sur or dans le cas des ions du peptide LDIFSDFR (courbe rouge de Figure 3.15a). C'est le contraire pour le peptide LEISFEFR (courbe rouge de la Figure 3.15b) lorsque l'on prend en compte une courbe centrée sur la même valeur d'énergie (paramètre X_c). Mais, ceci est aussi mis en évidence quel que soit le couple w/Xc choisi comme paramètre d'ajustement pour lier les SY_{THEO} aux SY_{EXP}.

Dans le cas du peptide LDIFSDFR, cette différence de comportement est en accord avec ce qui a été évoqué précédemment dans le cas des cations benzylpyridinium. Elle est à corréler avec la présence de la monocouche et du chromophore bithiophène. Celui-ci est destiné à absorber à la longueur d'onde du rayonnement laser. Il participe d'autant plus à la protection de l'analyte vis-à-vis de l'irradiation laser, que celui-ci a tendance à pénétrer au cœur de la monocouche. Pour le peptide LEIFSEFR, la distribution d'énergie interne est très large en DIAMS et LDI sur Or (voir Figure 3.15b). Celui-ci est moins soluble dans les solvants aqueux utilisés pour l'échantillonnage que le précédent et il conduit à des dépôts moins homogènes en DIAMS qu'en LDI sur or. Une irradiation directe de l'échantillon est envisageable. Celle-ci serait plus probable en DIAMS qu'en LDI sur or pour lequel l'étalement de l'échantillon sur la surface métallique absorbante est plus important. Dans ce cas, il faut donc envisager d'ajouter au phénomène lié à une énergie thermique transférée par conduction thermique de la cible, un processus d'excitation directe de l'analyte par

l'irradiation laser. Si ce processus additionnel est envisagé, il devrait être limité quand la densité de matière dans la plume est élevée. Les très nombreuses collisions qui se produiraient alors au sein du nuage en expansion contribueraient à rapprocher la phénoménologie observable de celle caractéristique d'un processus thermique. Dans ce but, la surface de la monocouche a été saturée en peptide LEIFSEFR. Celui-ci a été déposé à une concentration 10 fois plus élevée sur les surfaces d'or et DIAMS, alors une $P(E_{int})$ plus étroite est observée dans le cas du DIAMS (voir Figure 3.16) par rapport à celle mise en évidence avec une solution 100 fois diluée (voir Figure 3.15b). On se rapproche d'avantage d'un processus thermique, ce qui tend à confirmer l'hypothèse formulée, même si des études complémentaires devront être réalisées.

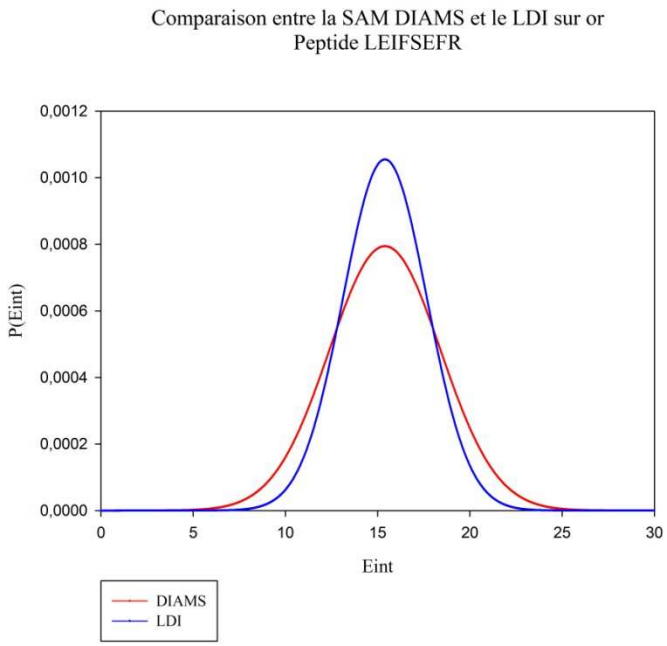


Figure 3.16 : Comparaison des $P(E_{int})$ dans le cas de la SAM DIAMS et du LDI sur or pour le peptide LEIFSEFR dilué 10 fois.

4 Bibliographie

(1) Vekey K. *Journal of Mass Spectrometry* **1996**, *31*, 445-463.
(2) Baer T.; Mayer P.M. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1997**, *8*, 103-115.
(3) Gaskell S.J. *Journal of Mass Spectrometry* **1997**, *32*, 677-688.
(4) Cole R.B. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *35*, 763-772.
(5) Kebarle P. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *35*, 804-817.
(6) Fenn J.B. *International Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *200*, 459-478.
(7) Gabelica V.; De Pauw E. *Mass Spectrometry Reviews* **2005**, *24*, 566-587.
(8) Bruins A.P. *In: Cole RB, editor. Electrospray ionization mass spectrometry. Chapter 3, New York: John Wiley & Sons.*, 107-136.
(9) Laprevote O.; Ducrot P.; Thal C.; Serani L.; Das B.C. *Journal of Mass Spectrometry* **1996**, *31*, 1149-1155.
(10) Van Dongen W.D.; Van Wijk J.I.T.; Green B.N.; Heerma W.; Haverkamp J. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1999**, *13*, 1712-1716.
(11) Schneider B.B.; Chen D.D.Y. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 791-799.
(12) Weinmann W.; Stoertzel M.; Vogt S.; Svoboda M.; Schreiber A. *Journal of Mass Spectrometry* **2001**, *36*, 1013-1023.
(13) Wysocki V.H.; Kenttamaa H.I.; Cooks R.G. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1987**, *75*, 181-208.
(14) Kenttamaa H.I.; Cooks R.G. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1985**, *64*, 79-83.
(15) Drahos L.; Heeren R.M.A.; Collette C.; De Pauw E.; Vekey K. *Journal of Mass Spectrometry* **1999**, *34*, 1373-1379.
(16) Collette C.; De Pauw E. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1998**, *12*, 165-170.
(17) Naban-Maillet J.; Lesage D.; Bossue A.; Gimbert Y.; Szteray J.; Vekey K.; Tabet J.C. *Journal of Mass Spectrometry* **2005**, *40*, 1-8.
(18) Hoxha A.; Collette C.; De Pauw E.; Leyh B. *Journal of Physical Chemistry A* **2001**, *105*, 7326-7333.
(19) Touboul D.; Jecklin M.C.; Zenobi R. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2008**, *22*, 1062-1068.
(20) Takats Z.; Drahos L.; Schlosser G.; Vekey K. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 6427-6429.
(21) Collette C.; Drahos L.; De Pauw E.; Vekey K. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1998**, *12*, 1673-1678.
(22) Greisch J.F.; Gabelica V.; Remacle F.; De Pauw E. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2003**, *17*, 1847-1854.
(23) Luo G.; Marginean I.; Vertes A. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 6185-6190.
(24) Luo G.; Chen Y.; Siuzdak G.; Vertes A. *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 24450-24456.
(25) Gabelica V.; Schulz E.; Karas M. *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, *39*, 579-593.
(26) Mowry C.D.; Johnston M.V. *Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98*, 1904-1909.
(27) Luo G.; Chen Y.; Daniels H.; Dubrow R.; Vertes A. *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 13381-13386.
(28) Pak A.; Lesage D.; Gimbert Y.; Vekey K.; Tabet J.C. *Journal of Mass Spectrometry* **2008**, *43*, 447-455.
(29) Laskin J. *Journal of Physical Chemistry A* **2006**, *110*, 8554-8562.
(30) Derwa F.; De Pauw E.; Natalis P. *Org. Mass Spectrom.* **1991**, *26*, 117-118.
(31) Gabelica V.; Lemaire D.; Laprevote O.; De Pauw E. *International Journal of Mass Spectrometry* **2001**, *210-211*, 113-119.
(32) Barylyuk K.V.; Chingin K.; Balabin R.M.; Zenobi R. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2010**, *21*, 172-177.

(33) Zins E.L.; Rondeau D.; Karoyan P.; Fosse C.; Rochut S.; Pepe C. *Journal of Mass Spectrometry* **2009**, *44*, 1668-1675.
(34) Rosenstock H.M.; Wallenstein M.B.; Wahrhaftig A.L.; Eyring H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1952**, *38*, 667-678.
(35) Marcus R.A. *The Journal of Chemical Physics* **1952**, *20*, 359-364.
(36) Marcus R.A.; Rice O.K. *Journal of Physical and Colloid Chemistry* **1951**, *55*, 894-908.
(37) Wright M. *Fundamental Chemical Kinetics, An explanatory introduction to the concepts. Horwood Publishing Limited, Chichester* **1999**.
(38) Bare T.; Hase W.L. *Unimolecular Reaction Dynamics. Oxford University Press, Oxford* **1996**.
(39) Robinson P.J.; Holbrook K.A. *Unimolecular Reactions. Wiley, Chichester* **1972**.
(40) Beyer T.; Swinehart D.F. *Comm. Assoc. Comput. Machines* **1973**, *16*, 379.
(41) Baer T.; Mayer P. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1997**, *8*, 103-115.
(42) Dunbar R.C. *Advances in Gas Phase Ion Chemistry* **1996**, *2*, 87-124.
(43) Graham Cooks R. *Journal of Physical Chemistry A* **2000**, *104*, 1359-1361.
(44) Holmes J.L.; Aubry C.; Mayer P.M. *Journal of Physical Chemistry A* **1999**, *103*, 705-709.
(45) Drahos L.; Vekey K. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1999**, *10*, 323-328.
(46) Drahos L.; Vekey K. *Journal of Mass Spectrometry* **2001**, *36*, 237-263.
(47) M. J. Frisch G.W.T., H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople *Gaussian 03, Revision C.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT* **2004**.
(48) Galland N.; Rondeau D.; Sanguinet L.; Vekey. K. *« Distribution d'énergie interne d'ions produits par une source electrospray interfacée avec un spectromètre de masse à analyseur magnéto-électrostatique » ; 23ème Journées Françaises de Spectrométrie de Masse, Nantes* **2006**.
(49) Tsaprailis G.; Somogyi A.; Nikolaev E.N.; Wysocki V.H. *International Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *195-196*, 467-479.
(50) Summerfield S.G.; Whiting A.; Gaskell S.J. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1997**, *162*, 149-161.
(51) Moon J.H.; Oh J.Y.; Kim M.S. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2006**, *17*, 1749-1757.
(52) Griffin L.L.; McAdoo D.J. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1993**, *4*, 11-15.
(53) Bailey T.H.; Laskin J.; Futrell J.H. *International Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *222*, 313-327.

Chapitre IV :

Evaluations comparatives des vitesses initiales d’ions gazeux produits par la méthode DIAMS

A l'origine, les sources de désorption/ionisation laser étaient équipées de champs d'extraction continus et les spectres de masse enregistrés étaient marqués par la dispersion en énergie cinétique initiale des ions formés. L'invention de l'extraction retardée,[1] qui sépare temporellement les étapes de désorption et d'extraction des ions, a permis de résoudre ce problème et d'augmenter le pouvoir de résolution des instruments à temps de vol. Maintenant, il est aussi possible de mettre à profit ce type de dispositif pour évaluer la vitesse initiale des ions.

Les distributions d'énergie cinétique des ions formés reflètent les mécanismes qui peuvent intervenir lors de la désorption/ionisation laser. Ainsi, l'étude de ces distributions peut fournir des informations utiles pour comprendre le processus qui intervient en DIAMS-MS.

Plusieurs études sur les vitesses initiales des ions formés en désorption/ionisation laser ont déjà été menées,[2-6] dans le cas du MALDI, on s'accorde à dire que la vitesse initiale des ions d'analytes varie entre 300 et 1000 m/s et celle de la matrice entre 300 et 1700 m/s. Il semblerait de même que ces vitesses initiales soient liées à la masse de l'espèce en question.

Diverses méthodes ont été utilisées pour évaluer les distributions d'énergie cinétique initiale des ions, les deux principales sont la méthode "field-free drift", qui déduit les vitesses initiales du temps de dérive des ions dans une zone libre de champ ou en comparant les temps de vol avec et sans application d'un champ, la seconde est une expérience de post ionisation des molécules neutres désorbées, dans cette méthode, le délai entre les tirs laser d'ablation et de post ionisation varie et les vitesses initiales sont déterminées grâce l'évolution de l'intensité des ions en fonction du temps. L'avantage de la méthode utilisant l'extraction retardée est qu'elle ne demande aucune modification de l'appareillage pour être utilisée.

1 Principes théoriques de la mesure de vitesses initiales d'ions gazeux dans un analyseur à temps de vol

La méthode qui va être utilisée pour la détermination de la vitesse initiale, v_0, des ions, imaginée par l'équipe de Juhasz, est appelée méthode du délai d'extraction.[7] Lorsque les ions sont formés en source, ils évoluent un certain temps avec leur vitesse initiale dans une zone libre de champ ce qui influence la durée totale de leur temps de vol et permet, grâce au tracé de celui-ci en fonction du délai d'extraction imposé, de construire une droite dont la pente dépend de v_0.

L'expression de la pente s'obtient en étudiant les équations du temps de vol, le développement du calcul est réalisé en **Annexe I**. Pour un appareil à temps de vol qui fonctionne en mode linéaire et munit d'une extraction retardée tel que schématisé dans la Figure 4.1.

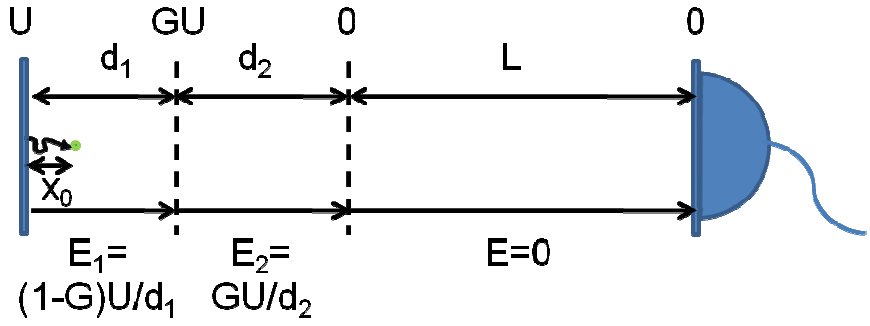


Figure 4.1 : Schéma d'un analyseur à temps de vol avec une extraction retardée. Les voltages appliqués sur la cible et les deux lentilles d'extraction sont respectivement U, GU (avec G<1) et 0V.

Soit un ion de masse m (kg) et de charge z (C), x la position de celui-ci suivant l'axe du tube de vol et x_0 la distance qu'il a parcouru pendant le délai d'extraction τ (s) avec sa vitesse initiale v_0 ($m.s^{-1}$). Le temps t qu'il mettra de la source au détecteur est exprimé par l'expression (4.1):

$$t = C_1 y + C_2 y^2 + C_3 y^3 \qquad (4.1)$$

Avec : $y = \left(\frac{m}{2zU}\right)^{\frac{1}{2}}$, $C_1 = \frac{h}{2}\frac{x_0}{d_1} + L_e$, $C_2 = -\frac{2v_0 d_1}{1-G}$, $C3 = -\frac{v_0^2 h}{2(1-G)}$,

$h = (1-G)L - \frac{2d_1}{(1-G)^{\frac{1}{2}}} + \frac{2d_2(1-G)^{\frac{1}{2}}}{1+(1-G)^{\frac{1}{2}}}$ et $Le = L + \frac{2d_1}{(1-G)^{\frac{1}{2}}} + \frac{2d_2}{1+(1-G)^{\frac{1}{2}}}$.

Comme $x_0 = v_0.\tau$, il n'y a que C_1 qui dépende de τ :

$$t = \left(\frac{h}{2}\frac{x_0}{d_1} + L_e\right)\left(\frac{m}{2zU}\right)^{\frac{1}{2}} + C_2 y^2 + C_3 y^3 \qquad (4.2)$$

$$t = \underbrace{\left(\frac{h}{2}\frac{v_0}{d_1}\left(\frac{m}{2zU}\right)^{\frac{1}{2}}\right)}_{\text{pente}}\tau + \text{constante} \qquad (4.3)$$

Soit

$$v_0 = \frac{\text{pente}.2d_1}{(1-G)L - \frac{2d_1}{(1-G)^{\frac{1}{2}}} + \frac{2d_2(1-G)^{\frac{1}{2}}}{1+(1-G)^{\frac{1}{2}}}} \left(\frac{2zU}{m}\right)^{\frac{1}{2}} \qquad (4.4)$$

Ainsi, pour déterminer la vitesse initiale, il suffit de tracer l'évolution des temps de vol des ions en fonction du délai d'extraction afin de calculer la valeur de la pente et de l'insérer dans l'équation (4.4).

2 Déterminations des vitesses initiales d'ions produits en LDI sur Or et en DIAMS

Nous tenons à remercier particulièrement Manuel Chapelle, ingénieur d'étude à l'institut Jacques Monod (Paris VII), ainsi que le Dr. Emmanuelle Leize, directrice de Recherche au CNRS à l'Institut de Chimie ISIS de Strasbourg, pour nous avoir tous deux accueilli dans leurs laboratoires et accordé l'accès à leurs spectromètres.

2.1 Expérience et Méthode

Les expériences ont été menées dans deux laboratoires différents, la première partie a été effectuée à l'institut Jacques Monod sur un MALDI TOF/TOF 4800 Applied Biosystems et la deuxième partie à l'Institut de Chimie ISIS de Strasbourg, sur un Autoflex Bruker. Ces mesures ont été effectuées à l'extérieur car notre version du Biflex III ne propose que trois délais d'extraction différents, ce qui n'est pas suffisant pour l'étude.

L'analyte utilisé est la gramicidine A, c'est un peptide de masse molaire 1882 $g.mol^{-1}$, il a été choisi car il répond bien en DIAMS et qu'il est conseillé de ne pas travailler avec de trop petites molécules.

Une solution de gramicidine de 1 mM est préparée puis diluée dix fois. Le dépôt est réalisé selon la méthode de la goutte sèche, 0.7 µL de solution est déposé sur la surface étudiée (DIAMS, Or ou SAM C10) et évaporé à pression atmosphérique.

La plaque de dépôt est ensuite entrée dans l'appareil et l'on procède à l'acquisition des spectres de masse pour différents délais d'extraction. Les deux appareils n'étant pas les mêmes, le laser utilisé sur l'Applied Biosystems est un Nd:YAG qui émet à 355 nm et un laser à azote (337nm) sur le Brucker.

2.2 Résultats et discussion

Sur l'Applied Biosystems, les spectres de masse de la gramicidine sont enregistrés pour des délais d'extraction allant de 50 à 750 ns avec une puissance laser indicative de 3500. Les temps de vol du peptide protoné, reportés en fonction du délai d'extraction sur la Figure 4.2, permettent d'établir des droites de régression qui correspondent très bien aux points expérimentaux.

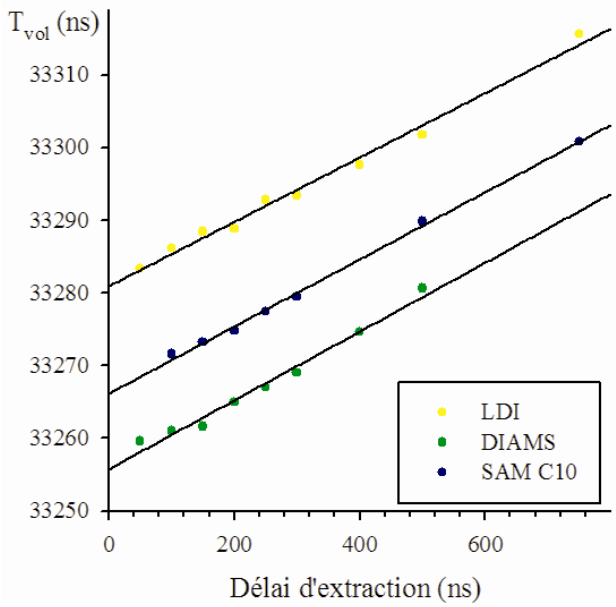


Figure 4.2 : Evolution des temps de vol des ions de gramidicine protonée en fonction du délai d'extraction pour les méthodes DIAMS, LDI et sur une surface de SAM C10 (spectres enregistrés en mode linéaire positif pour des délais d'extraction allant 50 à 750 ns).

Malheureusement, faute de connaitre les grandeurs de l'appareil, les valeurs d'énergies cinétiques n'ont pas pu être calculées, mais il reste possible de comparer les pentes obtenues pour les trois méthodes (Tableau 4.1).

Méthode	Pente
DIAMS	0.047
LDI	0.044
SAM C10	0.046

Tableau 4.1 : Valeurs des pentes calculées des droites de régressions du temps de vol des ions en fonction du délai d'extraction appliqué pour les DIAMS, LDI et désorption/ionisation sur SAM C10.

Les trois pentes sont quasiment égales, donc même sans calculer la valeur des vitesses initiales, tout porte à croire que celles-ci seront aussi égales. En revanche, on observe des différences notoires dans les temps de vol pour les mêmes valeurs du délai d'extraction, mais il faut plutôt l'imputer aux conditions expérimentales comme la pression ou la température.

La seconde partie de l'expérience est réalisée sur l'Autoflex dont les dimensions nous ont été données par le constructeur. Les spectres de masse de la gramicidine sont enregistrés sur une plaque DIAMS et une plaque d'or pour des délais d'extraction allant aussi de 50 à 750 ns et avec une puissance laser indicative de 80%. Le graphique représentant les temps de vol du peptide protoné en fonction du délai d'extraction est reporté sur la Figure 4.3.

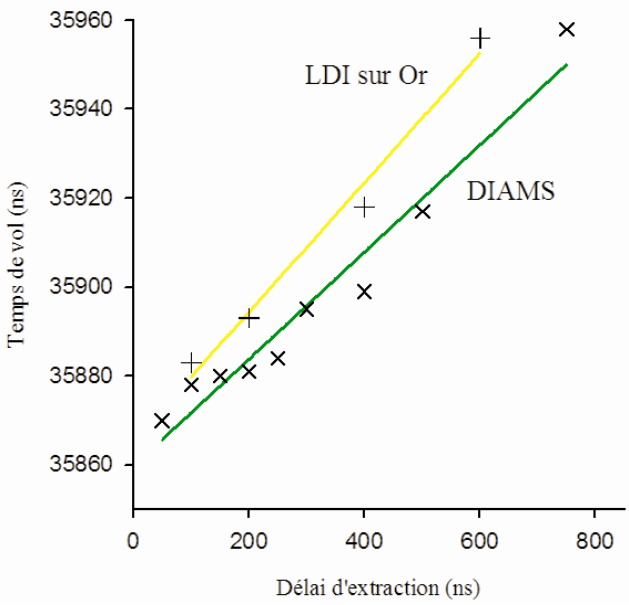


Figure 4.3 : Evolution des temps de vol des ions de gramicidine protonée en fonction du délai d'extraction pour les méthodes DIAMS et LDI (spectres enregistrés en mode linéaire positif pour des délais d'extraction allant 50 à 750 ns).

Les coefficients directeurs de chacune des droites permettent cette fois de calculer les vitesses initiales moyennes des ions émis en LDI et en DIAMS. D'après le Tableau 4.2, on retrouve des vitesses très proches comme dans la première partie de l'étude, la monocouche n'influence donc certainement pas la vitesse à laquelle les ions sont éjectés. Par contre les valeurs calculées restent en accord avec les ordres de grandeurs relevés dans la littérature.[2, 7]

Composé	**Laser nm**	**Matrice**	**Vitesse m/s**
[Gramicidine+H]$^+$	337	LDI sur Or	321
	337	DIAMS	391
[Insuline+H]$^+$	337	HCCA	291[2] à 311[7]
	266	HCCA	339[2]
	337	SA	332[2] à 352[7]
	337	DHB	521[2] à 543[7]

Tableau 4.2 : Vitesse initiale des ions formés en DIAMS et en LDI et comparaison avec des résultats de la littérature.

3 Bibliographie

(1) Wiley W.C.; McLaren I.H. *Review of Scientific Instruments* **1955**, *26*, 1150-1157.
(2) Gluckmann M.; Karas M. *Journal of Mass Spectrometry* **1999**, *34*, 467-477.
(3) Berkenkamp S.; Menzel C.; Hillenkamp F.; Dreisewerd K. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2002**, *13*, 209-220.
(4) Karas M.; Bahr U.; Fournier I.; Gluckmann M.; Pfenninger A. *International Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *226*, 239-248.
(5) Karas M.; Kruger R. *Chemical Reviews* **2003**, *103*, 427-439.
(6) Vera C.C.; Trimborn A.; Hinz K.P.; Spengler B. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19*, 133-146.
(7) Juhasz P.; Vestal M.L.; Martin S.A. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1997**, *8*, 209-217.

Conclusion générale et perspectives

D’après les travaux réalisés au cours de cette étude, il est possible de considérer la méthode DIAMS parmi les méthodes de désorption/ionisation laser sans matrice. Cette définition impose de préciser que par méthodes LDI sans matrice, on entend bien considérer les techniques comme le LDI sur or, le DIOS ou le NALDI qui ne nécessitent pas d’ajouter un composé supplémentaire pour parfaire les processus d’émission d’ions sous irradiation laser, comme c'est par exemple le cas en SALDI. L’élaboration et le contrôle des cibles DIAMS sont maintenant bien maîtrisés. On peut d’ailleurs souligner l’apport essentiel de la voltampérométrie cyclique à ce sujet. La méthode DIAMS est bien adaptée à l’analyse de composés de faibles poids moléculaires. Sa robustesse, évaluée par des études statistiques permet d’envisager son utilisation pour des évaluations quantitatives rapides. Notons à ce sujet que les estimations de la répétabilité et de la reproductibilité de la méthode DIAMS ont été menées au travers de mesures comparatives avec le LDI sur or et le MALDI. Le fait que ces deux dernières méthodes aient laissé apparaître des robustesses équivalentes, tend à fissurer le paradigme selon lequel aucune méthode de dosage semi-quantitatif ne pourrait être envisagée lorsque les techniques de désorption/ionisation laser sont mises à contribution.

Cette démarche comparative est aussi à mentionner dans le cas des études réalisées concernant les évaluations de distributions d’énergie interne et de vitesses initiales des ions émis en DIAMS. En effet, lorsque des techniques de LDI sans matrice sont développées, leurs performances et leur principe de fonctionnement ne sont pas systématiquement comparés avec la méthode de LDI sur or, qui est finalement la plus ancienne et *a priori* la plus simple à utiliser. Dans notre cas, nous avons pu montrer que le DIAMS confère moins d’énergie interne aux analytes que le LDI sur or et qu’il constitue un milieu de protection vis-à-vis du rayonnement laser qui croit avec l’intensité d’irradiation de la surface. Cette caractéristique serait à considérer avec attention dans le cas des peptides. Beaucoup semblent plus stables en DIAMS qu’en LDI et certains semblent avoir leur taux de fragmentation très influencé par leur interaction avec la surface modifiée. Grâce à un design dirigé des monocouches, nous avons pu préciser que la particularité de la méthode DIAMS vis-à-vis du transfert d’énergie, est due à la présence d’un groupement chromophore, absorbant à la longueur d’onde du laser, au sein de la structure moléculaire constitutive de la monocouche. Les évaluations de distribution d’énergie interne ont révélé un point important, à savoir que si on ne prend en compte que les énergies de vibration des molécules isolées, la température (1410 K) des ions gazeux produits en DIAMS est tout de même à considérer au travers d’un régime d’assez forte irradiance laser. Par contre, lors des études réalisées sur les énergies cinétiques d’ions générés en LDI sur or et DIAMS avec et sans chromophore, les valeurs de vitesses initiales mesurées sont apparues comme étant comparables entre elles et avec les vitesses d’ions en MALDI. Si on corrèle, cette fois, la température et l’énergie thermique à la distribution des vitesses moléculaires, les

faibles valeurs de vitesses mesurées en DIAMS, comme celles reportées pour le MALDI, conduisent à prendre en compte une faible température des ions. Ceci est en accord avec le modèle de la plume froide caractéristique d'une irradiance moyenne dans le cas du MALDI.

Voici deux interprétations apparemment contradictoires qui nécessiteront d'envisager des études plus précises sur la corrélation entre la notion de températures à évaluer (d'origine vibrationnelle ou translationnelle) et le phénomène à appréhender. Ceci pourra être réalisé en choisissant peut être d'autres molécules thermomètres et en reprenant des modèles plus diverses pour l'interprétation des mesures. De telles études pourraient être généralisées à d'avantage de méthodes LDI sans matrice, en incluant par exemple le DIOS et le NALDI.

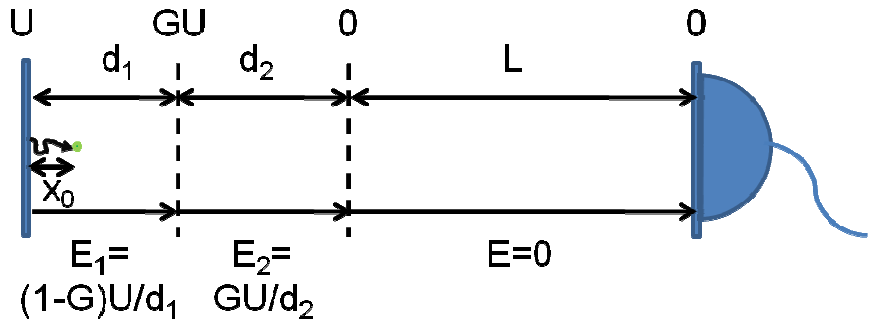
Cependant, si on conserve l'idée qu'un des grands intérêts de la méthode DIAMS réside dans le fait de pouvoir envisager un design dirigé des cibles grâce aux apports de l'ingénierie moléculaire, alors, de nombreuses perspectives peuvent être à considérer. Il s'agirait d'élaborer des surfaces dont la structure et les propriétés seraient adaptées au type de molécules cibles à analyser. Des études récentes réalisées au laboratoire laissent déjà présager un certain intérêt dans le design de monocouches de nature hydrophile dans l'analyse de composés d'origine naturelle.

Annexe I:

Calculs pour la détermination de l'énergie cinétique initiale des ions

Calculs pour la détermination de l'énergie cinétique initiale des ions :

Cette première annexe présente le raisonnement détaillé qui, à partir des équations gérant le temps de vol des ions, permet de lier leur vitesse initiale v_0 aux autres paramètres de l'appareil.



Soit un ion de masse m (kg) et de charge z (C), x la position de ce dernier suivant l'axe du tube de vol et x_0 la distance qu'il a parcouru pendant le temps τ (s) avec sa vitesse initial v_0 ($m.s^{-1}$).

— (1)

Zone 1 :

$$\left(d_1 = \frac{a_1}{2}t_1^2 + v_0 t_1 + x_0\right)$$

$$ma_1 = \sum F = zE_1$$

$$a_1 = \frac{zE_1}{m}$$

$$v_1 = at_1 + v_0$$

$$t_1 = \frac{v_1 - v_0}{a_1} = \frac{m(v_1 - v_0)}{zE_1}$$

Zone 2 :

$$\left(d_2 = \frac{a_2}{2}t_2^2 + v_1 t_2\right)$$

$$a_2 = \frac{zE_2}{m}$$

$$v_2 = at_2 + v_1$$

$$t_2 = \frac{v_2 - v_1}{a_2} = \frac{m(v_2 - v_1)}{zE_2}$$

$$t = t_1 + t_2 + t_3 = \frac{m(v_1 - v_0)}{zE_1} + \frac{m(v_2 - v_1)}{zE_2} + \frac{L}{v_2} \quad (10)$$

Conversion des vitesses en énergies cinétiques :

$$E_c = \frac{1}{2}mv^2 \qquad v = \left(\frac{2E_c}{m}\right)^{\frac{1}{2}} \tag{11}$$

$$t = \frac{(2m)^{\frac{1}{2}}}{z}\left[\frac{\left(E_{c1}^{\frac{1}{2}} - E_{c0}^{\frac{1}{2}}\right)\mathrm{d}_1}{(1-\mathrm{G})\mathrm{U}} + \frac{\left(E_{c2}^{\frac{1}{2}} - E_{c1}^{\frac{1}{2}}\right)\mathrm{d}_2}{\mathrm{GU}}\right] + L\left(\frac{\mathrm{m}}{2E_{c2}}\right)^{\frac{1}{2}} \tag{12}$$

1.1 Développements limités :

Développement limité de $x^{1/2}$ au voisinage de a :

$$x^{1/2} = a^{1/2} + (x-a)\frac{1}{2a^{1/2}} \tag{13}$$

Développement limité de $E_{c1}{}^{1/2}$ au voisinage de zU(1-G) :

$$E_{c1}^{1/2} = \left(zU(1-G)\right)^{1/2} + \left(E_{c1} - zU(1-G)\right)\frac{1}{2\left(zU(1-G)\right)^{1/2}} \tag{14}$$

$$E_{c1}^{1/2} = \left(zU(1-G)\right)^{1/2} + \frac{E_{c1}}{2\left(zU(1-G)\right)^{1/2}} - \frac{\left(zU(1-G)\right)^{1/2}}{2} \tag{15}$$

$$E_{c1}^{1/2} = \frac{\left(zU(1-G)\right)^{1/2}}{2} + \frac{E_{c1}}{2\left(zU(1-G)\right)^{1/2}} \tag{16}$$

Développement limité de $E_{c2}{}^{1/2}$ au voisinage de zU :

$$E_{c2}^{1/2} = (zU)^{1/2} + (E_{c2} - zU)\frac{1}{2(zU)^{1/2}} \tag{17}$$

$$E_{c2}^{1/2} = (zU)^{1/2} + \frac{E_{c2}}{2(zU)^{1/2}} - \frac{(zU)^{1/2}}{2} = \frac{(zU)^{1/2}}{2} + \frac{E_{c2}}{2(zU)^{1/2}} \tag{18}$$

Développement limité de $E_{c2}{}^{-1/2}$ au voisinage de zU :

$$\frac{1}{(E_{c2})^{1/2}} = \frac{1}{(zU)^{1/2}} - (E_{c2} - \mathrm{zU})\frac{1}{2(zU)^{3/2}} \tag{19}$$

$$\frac{1}{(E_{c2})^{1/2}} = \frac{1}{(zU)^{1/2}} - \frac{E_{c2}}{2(zU)^{3/2}} + \frac{1}{2(zU)^{1/2}} = \frac{3}{2(zU)^{1/2}} - \frac{E_{c2}}{2(zU)^{3/2}} \tag{20}$$

1.2 Introduction des développements limités dans l'expression du temps de vol des ions :

$$t = \frac{(2m)^{\frac{1}{2}}}{z}\left[\frac{\mathrm{d}_1}{(1-\mathrm{G})\mathrm{U}}\left(\frac{\left(zU(1-G)\right)^{1/2}}{2} + \frac{E_{c1}}{2\left(zU(1-G)\right)^{1/2}} - \left(\frac{\mathrm{m}\mathrm{v}_0^2}{2}\right)^{1/2}\right) + \frac{\mathrm{d}_2}{\mathrm{GU}}\left(\frac{(zU)^{1/2}}{2} + \frac{E_{c2}}{2(zU)^{1/2}} - \frac{\left(zU(1-G)\right)^{1/2}}{2} - \frac{E_{c1}}{2\left(zU(1-G)\right)^{1/2}}\right)\right] + L\left(\frac{\mathrm{m}}{2}\right)^{\frac{1}{2}}\left(\frac{3}{2(zU)^{1/2}} - \frac{E_{c2}}{2(zU)^{3/2}}\right) \quad (21)$$

Développement :

$$t = \frac{(2m)^{\frac{1}{2}}}{z}\left[\frac{\mathrm{d}_1\left(zU(1-G)\right)^{1/2}}{2\mathrm{U}(1-\mathrm{G})} + \frac{\mathrm{d}_1 E_{c1}}{2\mathrm{U}(1-\mathrm{G})\left(zU(1-G)\right)^{1/2}} - \left(\frac{\mathrm{m}}{2}\right)^{1/2}\frac{\mathrm{v}_0\mathrm{d}_1}{(1-\mathrm{G})\mathrm{U}} + \frac{\mathrm{d}_2(zU)^{1/2}}{2\mathrm{GU}} + \frac{\mathrm{d}_2 E_{c2}}{2\mathrm{GU}(zU)^{1/2}} - \frac{\mathrm{d}_2\left(zU(1-G)\right)^{1/2}}{2\mathrm{GU}} - \frac{\mathrm{d}_2 E_{c1}}{2\mathrm{GU}\left(zU(1-G)\right)^{1/2}}\right] + L\left(\frac{\mathrm{m}}{2}\right)^{\frac{1}{2}}\frac{3}{2(zU)^{1/2}} - L\left(\frac{\mathrm{m}}{2}\right)^{\frac{1}{2}}\frac{E_{c2}}{2(zU)^{3/2}} \quad (22)$$

1.3 Expression des énergies cinétiques :

D'après $E_{c1} - E_{c0} = \sum \vec{F}.\vec{L}$ soit $E_{c1} = \sum \vec{F}.\vec{L} + \frac{1}{2}mv_0^2$ (23)

$$E_{c1} = z(1-G)\frac{U}{\cancel{d_1}}\cancel{d_1}\left(1 - \frac{x_0}{d_1}\right) + \frac{1}{2}mv_0^2 = zU - \frac{zUx_0}{d_1} - zGU + \frac{zGUx_0}{d_1} + \frac{1}{2}mv_0^2 \quad (24)$$

$$E_{c2} = zG\frac{U}{\cancel{d_2}}\cancel{d_2} + z(1-G)U\left(1 - \frac{x_0}{d_1}\right) + \frac{1}{2}mv_0^2 = zU - \frac{zUx_0}{d_1} + \frac{zGUx_0}{d_1} + \frac{1}{2}mv_0^2 \quad (25)$$

1.4 Introduction des expressions des énergies cinétiques dans l'expression du temps de vol des ions :

$$t = \frac{(2m)^{\frac{1}{2}}}{z}\left[\frac{\mathrm{d}_1 z^{1/2}}{2\left(U(1-G)\right)^{1/2}} + \frac{\mathrm{d}_1}{2\mathrm{U}(1-\mathrm{G})\left(zU(1-G)\right)^{1/2}}\left(zU - \frac{zUx_0}{d_1} - zGU + \frac{zGUx_0}{d_1} + \frac{1}{2}mv_0^2\right) - \left(\frac{\mathrm{m}}{2}\right)^{1/2}\frac{\mathrm{v}_0\mathrm{d}_1}{(1-\mathrm{G})\mathrm{U}} + \frac{\mathrm{d}_2(zU)^{1/2}}{2\mathrm{GU}} + \frac{\mathrm{d}_2}{2\mathrm{GU}(zU)^{1/2}}\left(zU - \frac{zUx_0}{d_1} + \frac{zGUx_0}{d_1} + \frac{1}{2}mv_0^2\right) - \frac{\mathrm{d}_2\left(zU(1-G)\right)^{1/2}}{2\mathrm{GU}} - \frac{\mathrm{d}_2}{2\mathrm{GU}\left(zU(1-G)\right)^{1/2}}\left(zU - \frac{zUx_0}{d_1} - zGU + \frac{zGUx_0}{d_1} + \frac{1}{2}mv_0^2\right)\right] + L\left(\frac{\mathrm{m}}{2}\right)^{\frac{1}{2}}\frac{3}{2(zU)^{1/2}} - L\left(\frac{\mathrm{m}}{2}\right)^{\frac{1}{2}}\frac{1}{2(zU)^{3/2}}\left(zU - \frac{zUx_0}{d_1} + \frac{zGUx_0}{d_1} + \frac{1}{2}mv_0^2\right) \quad (26)$$

Développement :

$$t = \frac{(2m)^{\frac{1}{2}}}{z}\left[\frac{\mathrm{d}_1 z^{1/2}}{2\left(U(1-G)\right)^{1/2}} + \frac{zU\mathrm{d}_1}{2\mathrm{U}(1-\mathrm{G})\left(zU(1-G)\right)^{1/2}} - \frac{zU\mathrm{d}_1}{2\mathrm{U}(1-\mathrm{G})\left(zU(1-G)\right)^{1/2}}\frac{x_0}{d_1} - \frac{zGU\mathrm{d}_1}{2\mathrm{U}(1-\mathrm{G})\left(zU(1-G)\right)^{1/2}} + \frac{zGU\mathrm{d}_1}{2\mathrm{U}(1-\mathrm{G})\left(zU(1-G)\right)^{1/2}}\frac{x_0}{d_1} + \frac{1}{2}mv_0^2\frac{\mathrm{d}_1}{2\mathrm{U}(1-\mathrm{G})\left(zU(1-G)\right)^{1/2}} - \left(\frac{\mathrm{m}}{2}\right)^{1/2}\frac{\mathrm{v}_0\mathrm{d}_1}{(1-\mathrm{G})\mathrm{U}} + \frac{\mathrm{d}_2 z^{1/2}}{2GU^{1/2}} + \frac{zU\mathrm{d}_2}{2\mathrm{GU}(zU)^{1/2}} - \frac{zU\mathrm{d}_2}{2\mathrm{GU}(zU)^{1/2}}\frac{x_0}{d_1} + \frac{zGU\mathrm{d}_2}{2\mathrm{GU}(zU)^{1/2}}\frac{x_0}{d_1} + \frac{1}{2}mv_0^2\frac{\mathrm{d}_2}{2\mathrm{GU}(zU)^{1/2}} - \frac{\mathrm{d}_2\left(z(1-G)\right)^{1/2}}{2\mathrm{GU}^{1/2}} - \frac{zU\mathrm{d}_2}{2\mathrm{GU}\left(zU(1-G)\right)^{1/2}} + \frac{zU\mathrm{d}_2}{2\mathrm{GU}\left(zU(1-G)\right)^{1/2}}\frac{x_0}{d_1} + \frac{zGU\mathrm{d}_2}{2\mathrm{GU}\left(zU(1-G)\right)^{1/2}} - \frac{zGU\mathrm{d}_2}{2\mathrm{GU}\left(zU(1-G)\right)^{1/2}}\frac{x_0}{d_1} - \frac{1}{2}mv_0^2\frac{\mathrm{d}_2}{2\mathrm{GU}\left(zU(1-G)\right)^{1/2}}\right] + \left(\frac{\mathrm{m}}{2}\right)^{\frac{1}{2}}\left[\frac{3L}{2(zU)^{1/2}} - \frac{zUL}{2(zU)^{3/2}} + \frac{zUL}{2(zU)^{3/2}}\frac{x_0}{d_1} - \frac{zGUL}{2(zU)^{3/2}}\frac{x_0}{d_1} - \frac{1}{2}mv_0^2\frac{L}{2(zU)^{3/2}}\right] \quad (27)$$

Simplifications :

$$t = \frac{(2m)^{\frac{1}{2}}}{z}\left[\frac{z^{1/2}\mathrm{d}_1}{2\mathrm{U}^{1/2}(1-G)^{1/2}} + \frac{z^{1/2}\mathrm{d}_1}{2\mathrm{U}^{1/2}(1-G)^{3/2}} - \frac{z^{1/2}\mathrm{d}_1}{2\mathrm{U}^{1/2}(1-G)^{3/2}}\frac{x_0}{d_1} - \frac{z^{1/2}G\mathrm{d}_1}{2\mathrm{U}^{1/2}(1-G)^{3/2}} + \frac{z^{1/2}G\mathrm{d}_1}{2\mathrm{U}^{1/2}(1-G)^{3/2}}\frac{x_0}{d_1} + \frac{1}{2}mv_0^2\frac{\mathrm{d}_1}{2z^{1/2}\left(U(1-G)\right)^{3/2}} - \left(\frac{\mathrm{m}}{2}\right)^{1/2}\frac{\mathrm{v}_0\mathrm{d}_1}{\mathrm{U}(1-\mathrm{G})} + \frac{z^{1/2}\mathrm{d}_2}{2U^{1/2}\mathrm{G}} + \frac{z^{1/2}\mathrm{d}_2}{2U^{1/2}\mathrm{G}} - \frac{z^{1/2}\mathrm{d}_2}{2U^{1/2}\mathrm{G}}\frac{x_0}{d_1} + \frac{z^{1/2}\mathrm{d}_2}{2U^{1/2}}\frac{x_0}{d_1} + \frac{1}{2}mv_0^2\frac{\mathrm{d}_2}{2z^{1/2}\mathrm{G}U^{3/2}} - \frac{z^{1/2}\mathrm{d}_2(1-G)^{1/2}}{2\mathrm{GU}^{1/2}} - \frac{z^{1/2}\mathrm{d}_2}{2\mathrm{U}^{1/2}\mathrm{G}(1-G)^{1/2}} + \frac{z^{1/2}\mathrm{d}_2}{2\mathrm{U}^{1/2}\mathrm{G}(1-G)^{1/2}}\frac{x_0}{d_1} + \frac{z^{1/2}\mathrm{d}_2}{2\mathrm{U}^{1/2}(1-G)^{1/2}} - \frac{z^{1/2}\mathrm{d}_2}{2\mathrm{U}^{1/2}(1-G)^{1/2}}\frac{x}{d_1} - \frac{1}{2}mv_0^2\frac{\mathrm{d}_2}{2\mathrm{GU}\left(zU(1-G)\right)^{1/2}}\right] + \left(\frac{\mathrm{m}}{2}\right)^{\frac{1}{2}}\left[\frac{3L}{2(zU)^{1/2}} - \frac{L}{2(zU)^{1/2}} + \frac{L}{2(zU)^{1/2}}\frac{x_0}{d_1} - \frac{GL}{2(zU)^{1/2}}\frac{x_0}{d_1} - \frac{1}{2}mv_0^2\frac{L}{2(zU)^{3/2}}\right] \quad (28)$$

Mise en facteur commun :

$$t = \left(\frac{m}{2zU}\right)^{\frac{1}{2}}\left[\frac{\mathrm{d}_1}{(1-G)^{1/2}} + \frac{\mathrm{d}_1}{(1-G)^{3/2}} - \frac{\mathrm{d}_1}{(1-G)^{3/2}}\frac{x_0}{d_1} - \frac{G\mathrm{d}_1}{(1-G)^{3/2}} + \frac{G\mathrm{d}_1}{(1-G)^{3/2}}\frac{x_0}{d_1} + \frac{1}{2}mv_0^2\frac{\mathrm{d}_1}{zU(1-G)^{3/2}} - (2\mathrm{m})^{1/2}\frac{\mathrm{v}_0\mathrm{d}_1}{z^{1/2}\mathrm{U}^{1/2}(1-\mathrm{G})} + \frac{\mathrm{d}_2}{\mathrm{G}} + \frac{\mathrm{d}_2}{\mathrm{G}} - \frac{\mathrm{d}_2}{\mathrm{G}}\frac{x_0}{d_1} + \mathrm{d}_2\frac{x_0}{d_1} + \frac{1}{2}mv_0^2\frac{\mathrm{d}_2}{zGU} - \frac{\mathrm{d}_2(1-G)^{1/2}}{\mathrm{G}} - \frac{\mathrm{d}_2}{\mathrm{G}(1-G)^{1/2}} + \frac{\mathrm{d}_2}{\mathrm{G}(1-G)^{1/2}}\frac{x_0}{d_1} + \frac{\mathrm{d}_2}{(1-G)^{1/2}} - \frac{\mathrm{d}_2}{(1-G)^{1/2}}\frac{x_0}{d_1} - \frac{1}{2}mv_0^2\frac{\mathrm{d}_2}{z\mathrm{GU}(1-G)^{1/2}} + \frac{3L}{2} - \frac{L}{2} + \frac{L}{2}\frac{x_0}{d_1} - \frac{GL}{2}\frac{x_0}{d_1} - \frac{1}{2}mv_0^2\frac{L}{2zU}\right] \quad (29)$$

1.5 Expression sous la forme : $t = C_1 y + C_2 y^2 + C_3 y^3$

Avec $\mathrm{y} = \left(\frac{m}{2zU}\right)^{\frac{1}{2}}$, $C_1 = \frac{\mathrm{h}}{2}\frac{\mathrm{x}_0}{\mathrm{d}_1} + \mathrm{L_e}$; $C_2 = -\frac{2\mathrm{v}_0\mathrm{d}_1}{1-\mathrm{G}}$ et $C_3 = -\frac{v_0^2\mathrm{h}}{2(1-\mathrm{G})}$

$$t = \left(\frac{m}{2zU}\right)^{\frac{1}{2}}\left[\frac{x_0}{2d_1}\left(-\frac{2\mathrm{d}_1}{(1-G)^{3/2}} + \frac{2G\mathrm{d}_1}{(1-G)^{3/2}} - \frac{2\mathrm{d}_2}{\mathrm{G}} + 2\mathrm{d}_2 + \frac{2\mathrm{d}_2}{\mathrm{G}(1-G)^{1/2}} - \frac{2\mathrm{d}_2}{(1-G)^{1/2}} + L - GL\right) + \frac{\mathrm{d}_1}{(1-G)^{1/2}} + \frac{\mathrm{d}_1}{(1-G)^{3/2}} - \frac{G\mathrm{d}_1}{(1-G)^{3/2}} + \frac{\mathrm{d}_2}{\mathrm{G}} + \frac{\mathrm{d}_2}{\mathrm{G}} - \frac{\mathrm{d}_2(1-G)^{1/2}}{\mathrm{G}} - \frac{\mathrm{d}_2}{\mathrm{G}(1-G)^{1/2}} + \frac{\mathrm{d}_2}{(1-G)^{1/2}} + \frac{3L}{2} - \frac{L}{2}\right] + \left(\frac{m}{2zU}\right)\left[-\frac{2\mathrm{v}_0\mathrm{d}_1}{(1-\mathrm{G})}\right] + \left(\frac{m}{2zU}\right)^{\frac{3}{2}}\left[\frac{v_0^2\mathrm{d}_1}{(1-G)^{3/2}} + \frac{v_0^2\mathrm{d}_2}{\mathrm{G}} - \frac{v_0^2\mathrm{d}_2}{\mathrm{G}(1-G)^{1/2}} - \frac{v_0^2 L}{2}\right] \quad (30)$$

Soit :

$\mathrm{C_1}$: $$C_1 = \frac{\mathrm{h}}{2}\frac{\mathrm{x}_0}{\mathrm{d}_1} + \mathrm{L_e}$$

$$C_1 = \frac{x_0}{2d_1}\left(-\frac{2d_1}{(1-G)^{3/2}} + \frac{2Gd_1}{(1-G)^{3/2}} - \frac{2d_2}{G} + 2d_2 + \frac{2d_2}{G(1-G)^{1/2}} - \frac{2d_2}{(1-G)^{1/2}} + L - GL\right) + \frac{d_1}{(1-G)^{1/2}} +$$

$$\frac{d_1}{(1-G)^{3/2}} - \frac{Gd_1}{(1-G)^{3/2}} + \frac{d_2}{G} + \frac{d_2}{G} - \frac{d_2(1-G)^{1/2}}{G} - \frac{d_2}{G(1-G)^{1/2}} + \frac{d_2}{(1-G)^{1/2}} + \frac{3L}{2} - \frac{L}{2} \quad (31)$$

Avec $$h = -\frac{2d_1}{(1-G)^{3/2}} + \frac{2Gd_1}{(1-G)^{3/2}} - \frac{2d_2}{G} + 2d_2 + \frac{2d_2}{G(1-G)^{1/2}} - \frac{2d_2}{(1-G)^{1/2}} + L - GL \quad (32)$$

$$h = -\frac{2(1-G)d_1}{(1-G)^{3/2}} + 2d_2\left(-\frac{1}{G} + 1 + \frac{1}{G(1-G)^{1/2}} - \frac{1}{(1-G)^{1/2}}\right) + L(1-G) \quad (33)$$

$$h = -\frac{2d_1}{(1-G)^{1/2}} + 2d_2\left(\frac{(1-G)-(1-G)(1-G)^{1/2}}{G(1-G)^{1/2}}\right) + L(1-G) \quad (34)$$

$$h = -\frac{2d_1}{(1-G)^{1/2}} + 2d_2\left(\frac{(1-G)^{1/2}\left(1-(1-G)^{1/2}\right)}{G}\frac{1+(1-G)^{1/2}}{1+(1-G)^{1/2}}\right) + L(1-G) \quad (35)$$

$$h = -\frac{2d_1}{(1-G)^{1/2}} + 2d_2\left(\frac{(1-G)^{1/2}\left(\cancel{1}-(\cancel{1}-G)\right)}{G\left(1+(1-G)^{1/2}\right)}\right) + L(1-G) \quad (36)$$

$$h = (1-G)L - \frac{2d_1}{(1-G)^{1/2}} + \frac{2d_2(1-G)^{1/2}}{1+(1-G)^{1/2}} \quad (37)$$

$$L_e = \frac{d_1}{(1-G)^{1/2}} + \frac{d_1}{(1-G)^{3/2}} - \frac{Gd_1}{(1-G)^{3/2}} + \frac{d_2}{G} + \frac{d_2}{G} - \frac{d_2(1-G)^{1/2}}{G} - \frac{d_2}{G(1-G)^{1/2}} + \frac{d_2}{(1-G)^{1/2}} + \frac{3L}{2} - \frac{L}{2} \quad (38)$$

$$L_e = \frac{2d_1}{(1-G)^{1/2}} + d_2\left(\frac{2(1-G)^{1/2}-1+G-(1-G)}{G(1-G)^{1/2}}\right) + L \quad (39)$$

$$L_e = \frac{2d_1}{(1-G)^{1/2}} + 2d_2\left(\frac{(1-G)^{1/2}-(1-G)}{G(1-G)^{1/2}}\right) + L \quad (40)$$

$$L_e = \frac{2d_1}{(1-G)^{1/2}} + 2d_2\left(\frac{1-(1-G)^{1/2}}{G}\frac{1+(1-G)^{1/2}}{1+(1-G)^{1/2}}\right) + L \quad (41)$$

$$L_e = \frac{2d_1}{(1-G)^{1/2}} + 2d_2\left(\frac{\cancel{1}-(\cancel{1}-G)}{\cancel{G}\left(1+(1-G)^{1/2}\right)}\right) + L \quad (42)$$

$$L_e = L + \frac{2d_1}{(1-G)^{1/2}} + \frac{2d_2}{1+(1-G)^{1/2}} \quad (43)$$

C_2 : $$C_2 = -\frac{2v_0d_1}{(1-G)} \quad (44)$$

C_3 : $$C_3 = \frac{v_0^2d_1}{(1-G)^{3/2}} + \frac{v_0^2d_2}{G} - \frac{v_0^2d_2}{G(1-G)^{1/2}} - \frac{v_0^2L}{2} \quad (45)$$

$$C_3 = -\frac{v_0^2}{2(1-G)}\left((1-G)L - \frac{2d_1}{(1-G)^{1/2}} - \frac{2d_2(1-G)}{G} + \frac{2d_2(1-G)^{1/2}}{G}\right) \quad (46)$$

$$C_3 = -\frac{v_0^2}{2(1-G)}\left((1-G)L - \frac{2d_1}{(1-G)^{1/2}} + \frac{2d_2(1-G)^{1/2}(1-(1-G)^{1/2})}{G}\frac{1+(1-G)^{1/2}}{1+(1-G)^{1/2}}\right) \quad (47)$$

$$C_3 = -\frac{v_0^2}{2(1-G)}\left[(1-G)L - \frac{2d_1}{(1-G)^{1/2}} + \frac{2d_2(1-G)^{1/2}\left(\cancel{1}-(\cancel{1}-G)\right)}{\cancel{G}\left(1+(1-G)^{\frac{1}{2}}\right)}\right] \quad (48)$$

$$C_3 = -\frac{v_0^2h}{2(1-G)} \quad (49)$$

Pour déterminer la vitesse initiale des ions, il faut tracer la courbe de l'évolution du temps de vol des ions en fonction du temps d'extraction τ appliqué.

$$t = C_1 y + C_2 y^2 + C_3 y^3 \quad (50)$$

$$t = \left(\frac{\mathrm{h}}{2}\frac{\mathrm{x_0}}{\mathrm{d_1}} + \mathrm{L_e}\right)\left(\frac{m}{2zU}\right)^{\frac{1}{2}} + C_2 y^2 + C_3 y^3 \quad (51)$$

Or $$\mathrm{x_0} = \mathrm{v_0}\tau \quad (52)$$

$$t = \left(\frac{\mathrm{h}}{2}\frac{\mathrm{v_0}\tau}{\mathrm{d_1}} + \mathrm{L_e}\right)\left(\frac{m}{2zU}\right)^{\frac{1}{2}} + \mathrm{cste} \quad (53)$$

$$t = \left(\frac{\mathrm{h}}{2}\frac{\mathrm{v_0}}{\mathrm{d_1}}\left(\frac{m}{2zU}\right)^{\frac{1}{2}}\right)\tau + \mathrm{cste}' \quad (54)$$

La théorie prévoit que ce soit une droite dont la pente vaut :

$$\frac{1}{2}\left[(1-G)L - \frac{2\mathrm{d_1}}{(1-G)^{1/2}} + \frac{2\mathrm{d_2}(1-G)^{1/2}}{1+(1-G)^{1/2}}\right]\frac{\mathrm{v_0}}{\mathrm{d_1}}\left(\frac{m}{2zU}\right)^{\frac{1}{2}} \quad (55)$$

Ce qui permet donc la détermination de $\mathrm{v_0}$:

$$\mathrm{v_0} = \frac{\mathrm{pente}*2\mathrm{d_1}}{\left[(1-G)L - \frac{2\mathrm{d_1}}{(1-G)^{1/2}} + \frac{2\mathrm{d_2}(1-G)^{1/2}}{1+(1-G)^{1/2}}\right]}\left(\frac{2zU}{\mathrm{m}}\right)^{\frac{1}{2}} \quad (56)$$

Annexe II:

Spectres de masse du peptide LEIFSEFR.

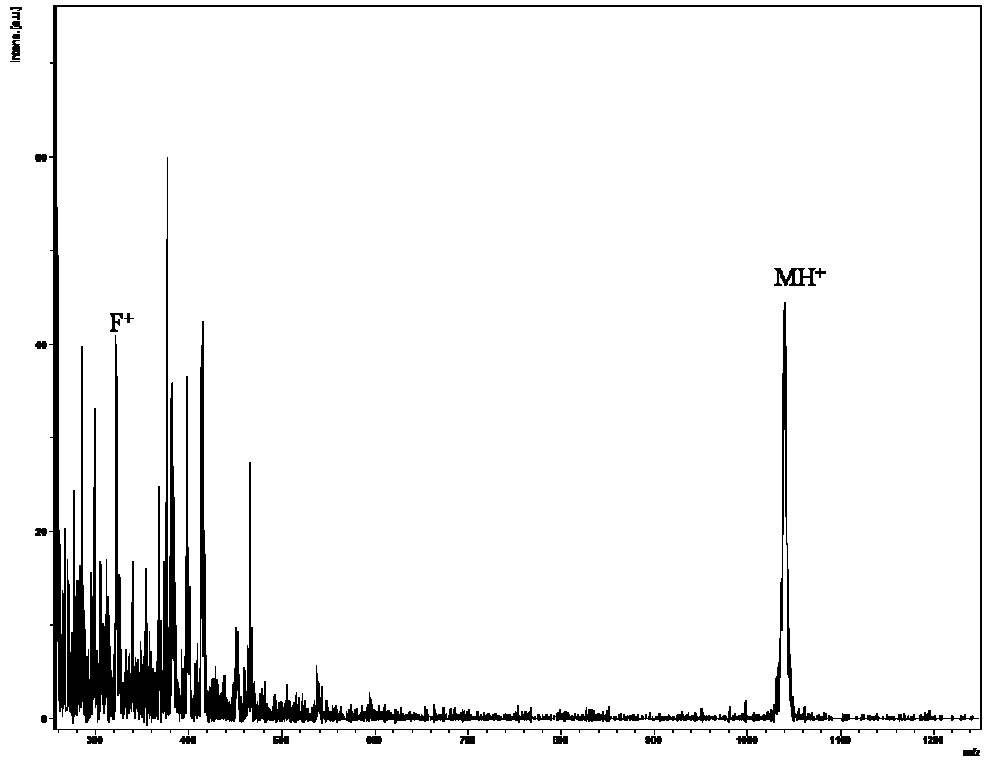


Figure A2.1 : Spectre de masse DIAMS-MS du peptide LEIFSEFR pour une solution 100 fois diluée et une puissance laser de 80%.

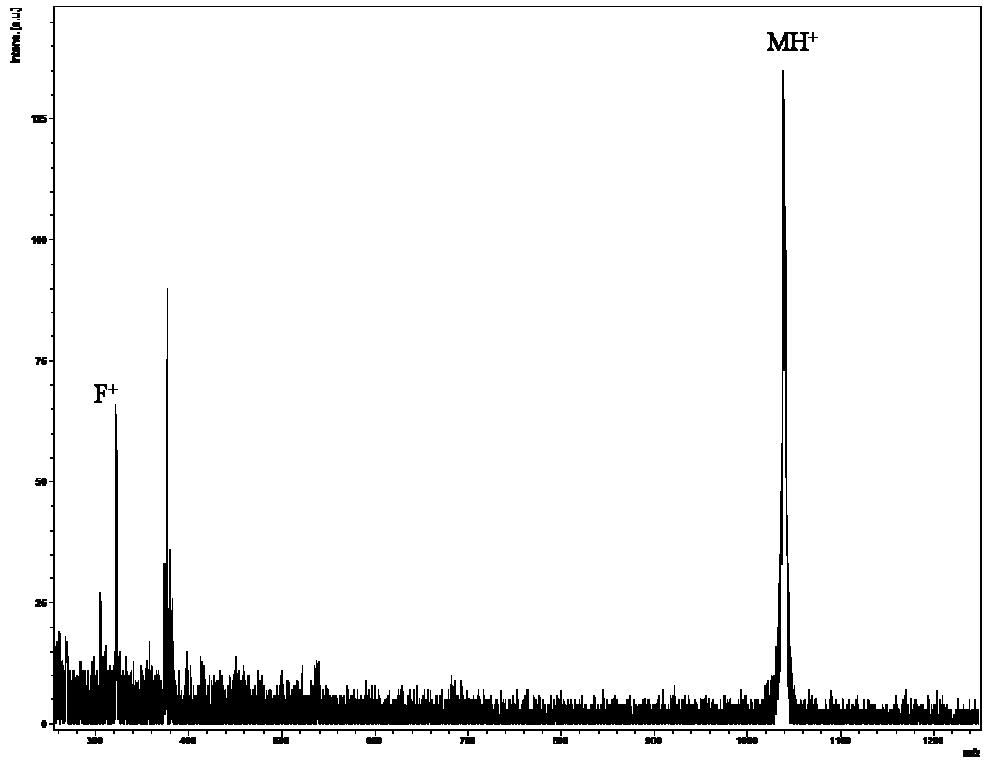


Figure A2.2 : Spectre de masse LDI-MS du peptide LEIFSEFR pour une solution 100 fois diluée et une puissance laser de 80%.

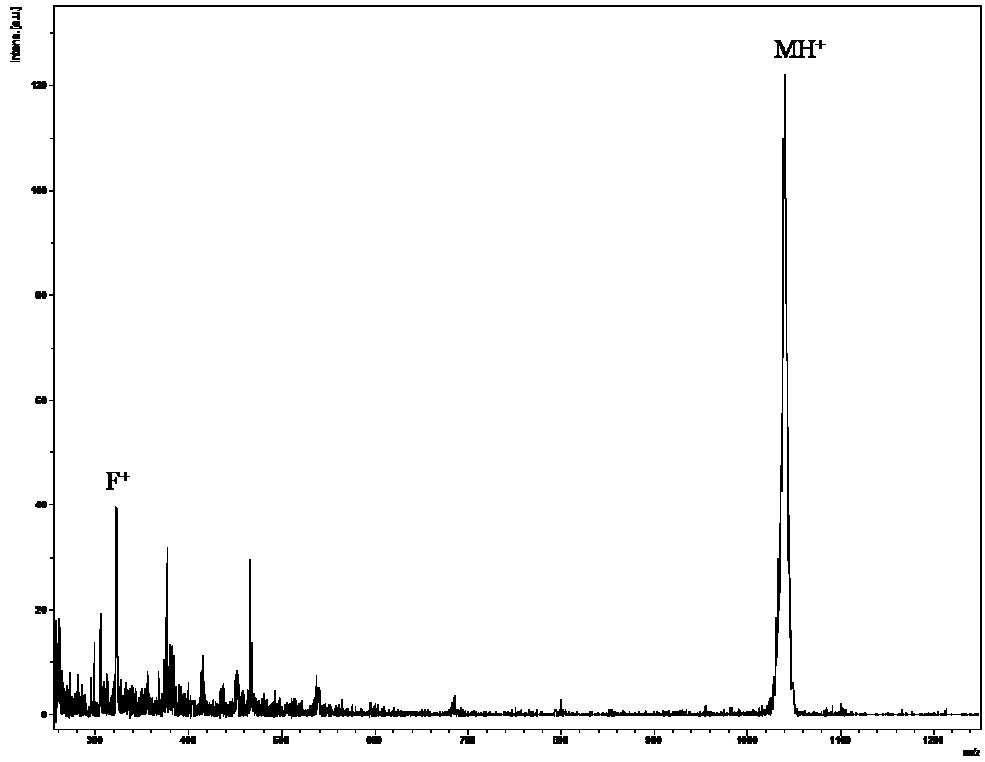


Figure A2.3: Spectre de masse DIAMS-MS du peptide LEIFSEFR pour une solution 10 fois diluée et une puissance laser de 80%.

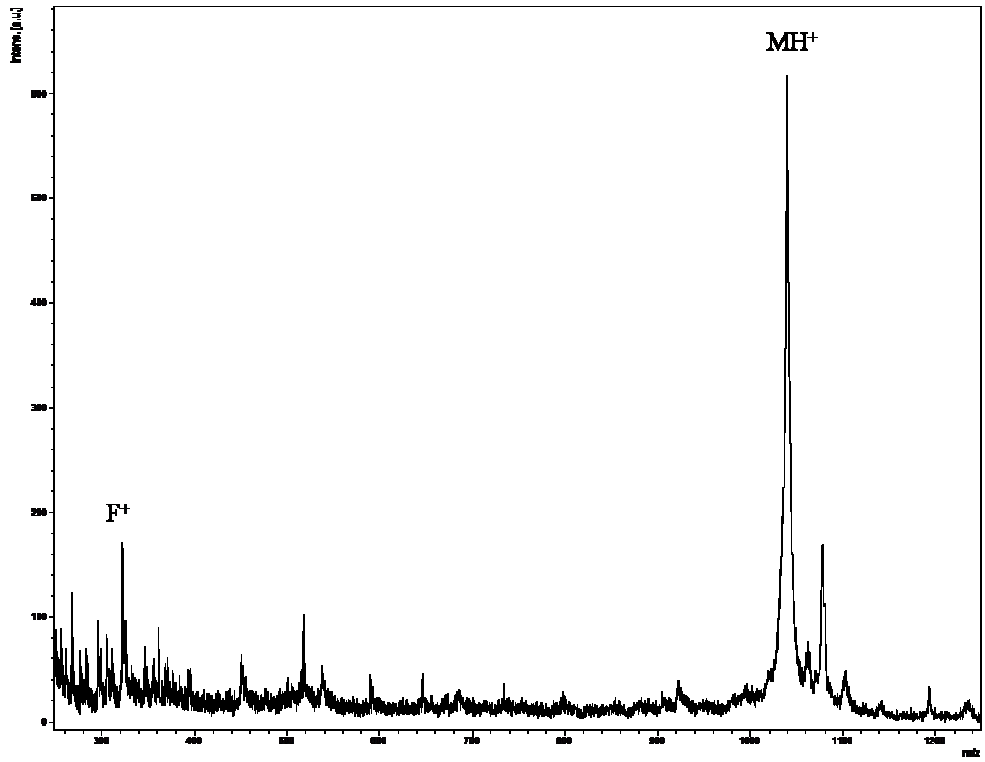


Figure A2.4 : Spectre de masse LDI-MS du peptide LEIFSEFR pour une solution 10 fois diluée et une puissance laser de 80%.

Résumé :

Résumé :

Une nouvelle méthode appelée DIAMS (Desorption/Ionization on self-Assembled Monolayer Surface) a été développée pour remédier aux problèmes liés à la présence d'ions de matrice en ionisation MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization). Le principe de la méthode DIAMS est d'obtenir des spectres de masse à partir d'échantillons de faible poids moléculaire directement déposés sur une surface d'or recouverte d'une monocouche organique auto-assemblée (SAM) absorbant à la longueur d'onde du laser (337 nm). Après un rappel sur l'interaction laser/matière en spectrométrie de masse, l'élaboration des cibles DIAMS et leur contrôle par électrochimie sont décrits. La faisabilité de la méthode et sa robustesse sont testées à partir de l'analyse de lipides. Les résultats sont comparés avec d'autres méthodes telles que le LDI sur surface d'or et le MALDI. Une étude mécanistique est ensuite initiée pour apporter des éléments de compréhension au processus DIAMS. Il s'agit de comparer les évaluations de distributions d'énergie interne $P(E_{int})$ des ions produits en DIAMS et LDI sur or. Dans ce but, des molécules thermomètres telles que des sels de benzylpyridinium substitués et des peptides modèles sont utilisées. Les $P(E_{int})$ sont déterminées par la méthode de rendement de survie d'ions et confirmées à l'aide du logiciel MassKinetics. Ainsi, pour une certaine fluence du laser, la distribution d'énergie interne est purement thermique en DIAMS, contrairement à ce qui est mesuré en LDI sur surface d'or. La présence d'un groupement chromophore au sein de la monocouche (bithiophène), constitue un milieu protecteur vis-à-vis du rayonnement laser; cette protection semble augmenter avec la fluence laser. Enfin, une mesure des vitesses initiales des ions de la gramicidine désorbés en DIAMS et LDI sur or, révèle que la nature de la surface n'a pas d'influence sur l'énergie cinétique initiale des ions produits par désorption/ionisation laser.

Abstract

A new method so-called DIAMS (Desorption/Ionization on self-Assembled Monolayer Surface) has been developed for circumventing to the problem of the presence of matrix ions in MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization). The principle of the DIAMS method is to obtain mass spectra from low molecular weight sample directly deposited onto a gold surface coated with self assembled organic monolayer (SAM) that absorbs at the laser wave length (337 nm). After a theoretical part related to laser light materials interaction in mass spectrometry, elaboration and electrochemical control of the target are described. The feasibility of the method, its repeatability and reproducibility are tested through lipid analyses. The results are compared with other methods

such as LDI on gold surface and MALDI. A mechanistic study was then performed in order to better understand the process involved in DIAMS. The aim is to compare internal energy distribution $P(E_{int})$ of ions produced in DIAMS and LDI. This is done through the $P(E_{int})$ evaluation of thermometer molecules such as benzylpyridinium salts and peptides. The $P(E_{int})$ are then determined from the survival yield method and confirmed through the use of the MassKinetics software. For a given laser energy, a thermal energy distribution is evaluated in DIAMS by contrast to the one determined in LDI on gold surface. The presence of chromophore moiety (bithiophene) offers a protecting medium towards the laser light ; such a shield seems to increase with the laser energy. Endly, initial velocities of gramicidine ions desorbed from DIMAS and LDI on gold, disclose the fact the nature of the surface has no effect on the initial kinetic energy of such ions produced in laser desorption/ionization.