



HAL
open science

Contribution à l'étude de la désorption laser in situ de médicaments : cas de l'amiodarone

Nadine Sanchez

► **To cite this version:**

Nadine Sanchez. Contribution à l'étude de la désorption laser in situ de médicaments : cas de l'amiodarone. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Verlaine - Metz, 1990. Français. NNT : 1990METZ010S . tel-01775860

HAL Id: tel-01775860

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775860>

Submitted on 24 Apr 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THESE

présentée

A L'UNIVERSITE DE METZ

U.F.R. SCIFA

pour l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE METZ

Spécialité : Chimie - Physique Chimie

par

Nadine SANCHEZ

Ingénieur Chimiste ENSC Toulouse

**Contribution à l'étude de la désorption laser
in-situ de médicaments.
Cas de l'amiodarone.**

soutenue le 27 septembre 1990 devant la commission d'examen :

Président :

J.F. MULLER

Professeur à l'Université de METZ

Rapporteurs :

A. VAN DORSSELAER

Directeur de Recherche CNRS-STRASBOURG

Directeur de Recherche CNRS-TOULOUSE

Ex

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ



022 420340 7

Docteur es Sciences SANOFI-Recherche

Directeur Centre Public de Recherche du
LUXEMBOURG

S/MZ
90/20
20x

à André et David



BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19900225
Cote	S/M3 90/10
Loc	Magasin

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser de METZ sous la direction de Monsieur **J.F. MULLER** qui m'a fait bénéficier de ses connaissances scientifiques. Je tiens à lui adresser ma très profonde reconnaissance pour sa confiance et le soutien permanent tout au long de ce travail.

La thèse a été financée par **SANOFI-Recherche**. J'exprime tous mes remerciements à **Mrs ROQUES** et **BERGER** pour les conseils qu'ils m'ont prodigués et suis très heureuse que Mr **BERGER** fasse partie du jury.

J'adresse mes respectueux remerciements à Messieurs **VAN DOERSSELAER** et **PROME**, rapporteurs qui ont accepté de juger ce travail.

Je suis très reconnaissante à Mr **SECK** de bien vouloir faire partie de mon jury de thèse.

J'exprime mes vifs remerciements au professeur **HILLENKAMP** pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je ne saurais oublier dans ces remerciements **Gabriel KRIER**, ingénieur de Recherche au LSMCL pour sa collaboration technique efficace et sa constante disponibilité, ainsi que tous mes collègues pour leur aide amicale et tous les bons moments passés ensemble.

A **Francis SCANLAN**, j'exprime toute ma reconnaissance pour son amitié tout au long de ces années passées à Metz et le remercie tout particulièrement pour les expériences de spectrométrie de masse qu'il a effectuées pour moi à Lausanne.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
PARTIE I : L'AMIODARONE	6
INTRODUCTION	6
A. LA MOLECULE ET SES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	6
1) Solubilité dans l'eau	7
2) Solubilités dans différents solvants organiques	7
3) Stabilité en solution organique	7
B. LE MEDICAMENT	8
1) Introduction	8
2) Propriétés pharmacocinétiques	8
a - Les méthodes analytiques utilisées	9
b - L'absorption	10
c - L'élimination	10
d - Le métabolisme	12
e - La pharmacocinétique du plasma	14
f - La distribution	14
3) Les effets secondaires	18
a - Les effets cutanés	18
b - La toxicité pulmonaire	19
c - La toxicité hépatique	19
d - Les dépôts cornéens	19
e - Fréquences d'apparition des effets secondaires	20
4) La toxicité	21
a - Toxicité aiguë	21
b - Toxicité chronique	21
C. CONCLUSIONS	21
PARTIE II : PARTIE INSTRUMENTALE	23
CHAPITRE I : LA TECHNIQUE LAMMA	23
A. GENERALITES	23
B. INSTRUMENTATION	24
1) La chambre d'échantillonnage	25
2) Le microscope optique	26
3) Le laser de puissance	26
4) Le spectromètre à temps de vol (TOF)	28
5) Le détecteur	30
C. PERFORMANCES ET LIMITES DE LA MICROSONDE LAMMA	31
1) Plage de masse	31
2) Résolution de masse	33
3) Limites de l'enregistreur transitoire rapide	34
4) Etablissement de l'échelle des masses	35

D. CONCLUSIONS	36
CHAPITRE II : LA TECHNIQUE FTMS	37
A. GENERALITES	37
B. PRINCIPE DE LA RESONANCE CYCLOTRONIQUE DES IONS	38
C. LA MICROSONDE FTMS 2000	39
1) Principe	39
2) Instrumentation	40
a - Champ magnétique	40
b - Cellule d'analyse	41
c - Séquence expérimentale	42
3) Paramètres analytiques importants	49
D. AVANTAGES ET LIMITES DU FTMS	50
PARTIE III : RAPPEL SUR LES DIFFERENTES TECHNIQUES DE DESORPTION DES SOLIDES	51
INTRODUCTION	51
A. FDMS (Field Desorption Mass Spectrometry)	52
B. SIMS ET FAB (Secondary Mass Spectrometry et Fast Atom Bombardment)	53
C. PDMS (Plasma Desorption Mass Spectrometry)	56
D. ELECTROSPRAY ET THERMOSPRAY	57
1) Electrospray	57
2) Thermospray	58
E. IONISATION LASER	58
1) Les lasers	59
2) Le temps d'interaction laser-matière	59
3) La longueur d'onde	60
4) Mécanisme	61
PARTIE IV : RESULTATS	64
INTRODUCTION	64
CHAPITRE I: LA DESORPTION/IONISATION LASER	66
A. CARACTERISATION ET FRAGMENTATION DES COMPOSES ORGANIQUES PAR DESORPTION LASER	66
B. LA FRAGMENTATION DE L'AMIODARONE	70
1) Avant-Propos	70
2) Spectre LAMMA de l'amiodarone	70
3) Résultats IE	72

4) Spectre FTMS de l'amiodarone	73
a - Site de première ionisation sur la fonction amine	76
b - Site de première ionisation sur la fonction carbonyle	76
c - Site de première ionisation sur la fonction éther	76
C. DISCUSSION ET CONCLUSIONS	81
CHAPITRE II : ANALYSE IN-SITU DE MOLECULES ORGANIQUES : CAS DE L'AMIODARONE	84
A. INTRODUCTION	84
B. BIBLIOGRAPHIE SUR L'ANALYSE ORGANIQUE IN-SITU	85
C. PARTIE EXPERIMENTALE : MICROSONDES LAMMA ET FTMS	92
1) Préparation des échantillons	92
a - LAMMA 500	92
b - FTMS	93
2) Optimisations des paramètres instrumentaux	93
a - LAMMA 500	93
b - FTMS	94
3) Calibration des spectres LAMMA et FTMS	97
a - LAMMA 500	97
b - FTMS	97
4) Spectres LAMMA et FTMS de l'amiodarone pure	99
a - Spectres LAMMA 500	99
b - Spectres FTMS	100
D. ANALYSES DES POLYMERES DOPES A L'AMIODARONE	102
1) Présentation du travail	102
2) Les échantillons	102
3) Réactivité de l'amiodarone vis à vis du monomère	103
4) Analyses LAMMA des polymères dopés en ions positifs et négatifs	104
a - Analyses LAMMA de la résine épon seule	104
b - Analyses LAMMA en ions positifs des polymères dopés	105
c - Analyses LAMMA en ions négatifs des polymères dopés	107
5) Analyses FTMS des polymères dopés	109
a - Présentation des tests	109
b - Dans la résine Epon	110
c - Dans la résine Technovit	110
6) Conclusions sur l'analyse des polymères	112
E. ANALYSES LAMMA DES COUPES HISTOLOGIQUES	112
1) Introduction	112
2) Généralités sur la préparation des coupes	113
a - Introduction	113
b - Fixation	114
c - Déshydratation	115
d - Inclusion	115
e - Contraste des coupes	115
f - Cryo-ultramicrotomie	116
3) Préparation des coupes histologiques	117
4) Protocole d'analyse	118
5) Analyses par microsonde LAMMA	121
a - Analyses des tissus enrobés dans l'épon	121
b - Analyses des cryocoupes	129
c - Bilan	130
F. CONCLUSION DU CHAPITRE II	131

CHAPITRE III : ETUDE DE LA CODESORPTION EN IMPACT LASER	134
A. INTRODUCTION	134
B. ESSAIS AVEC LA MICROSONDE LAMMA 500	143
1) Préparation des grilles	143
2) Composés testés	144
3) Essais de co-désorption	145
4) Cas de TCA et Csl : influence des paramètres	147
a- Contrôle par spectroscopie UV	147
b- Influence de la longueur d'onde	148
c- Influence de la concentration du codésorbant	150
d- Influence de différents iodures	151
5) Essais avec addition de saccharose	153
a- Mélange d'amiodarone et de saccharose	154
b- Dépôt de saccharose sur polymère dopé	154
c- Dépôt de saccharose sur une cryocoupe	154
d- Bilan	155
6) Essais LAMMA avec la nitrocellulose	155
7) Conclusions	157
C. ESSAIS AVEC LA MICROSONDE LAMMA 1000	158
1) Remarques préliminaires	158
2) Instrument et préparation des échantillons	159
a - Description de la microsonde LAMMA 1000	159
b - Echantillons	161
3) Résultats	162
a - Exemple type selon Hillenkamp	164
b - Tests de désorption de l'amiodarone	164
c - Alcool NitroBenzylique (NOBA)	166
d - Acide Nicotinique	167
4) Discussions	171
5) Conclusions	174
D. TESTS AVEC LA MICROSONDE FTMS	175
1) Remarques préliminaires	175
2) Echantillons	176
3) Expérimentation	177
a - Influence du support	177
b - Optimisation de la séquence de désorption	177
4) Comparaison LAMMA 1000 / FTMS	178
5) Influences de la matrice et de la longueur d'onde	181
a- Influence de la matrice à 193 nm	182
b- Influence de longueur d'onde	184
c- Bilan	188
6) Conclusions sur les tests de désorption FTMS	189
E. BILAN ET PERSPECTIVES	190
CONCLUSIONS GENERALES	192
BIBLIOGRAPHIE	196
ANNEXES	

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau I : Absorption de l'amiodarone reportée dans la littérature en fonction de la dose administrée
- Tableau II: Comparaison inter-espèces des niveaux relatifs d'amiodarone et du mono-N-déséthylamiodarone dans le plasma et dans le myocarde
- Tableau III : Longueurs d'onde accessibles par couplage du laser Nd-YAG avec la rhodamine 590
- Tableau IV : Gammes de masses (uma) accessibles sur le LAMMA 500 en fonction du retard et du temps d'échantillonnage
- Tableau V : Limites de détection absolue et relative de quelques éléments par la technique LAMMA 500 (dans une matrice épon)
- Tableau VI: Quelques exemples de matrices et leurs applications en FAB
- Tableau VII: Intensité relative du pic de masse $m/z=127$ en fonction de la concentration en amiodarone dans le polymère dopé
- Tableau VIII : Analyses LAMMA des coupes histologiques en fonction de l'épaisseur et de l'énergie sur l'échantillon
- Tableau IX : Masses présentes en fonction de la nature polymérique ou tissulaire de la zone irradiée sur la coupe biologique
- Tableau X : Moyennes des intensités absolues du pic moléculaire $m/z=646$ et du pic de base $m/z=518$ de l'amiodarone en fonction des codésorbants
- Tableau XI : Moyennes des intensités absolues du pic moléculaire $m/z=646$ et du pic de base $m/z=518$ de l'amiodarone, en présence d'acide trichloroacétique et d'iodure de césium, en fonction de la longueur d'onde
- Tableau XII : Moyennes des intensités absolues du pic moléculaire $m/z=646$ et du pic de base $m/z=518$ de l'amiodarone en fonction de la quantité d'acide trichloroacétique
- Tableau XIII : Moyennes des intensités absolues du pic moléculaire $m/z=646$ et du pic de base $m/z=518$ de l'amiodarone pour différents sels iodés
- Tableau XIV : Désorption assistée de l'amiodarone par l'acide nicotinique sur LAMMA 500
- Tableau XV : Tests de désorption réalisés sur la microsonde LAMMA 1000 avec différentes matrices
- Tableau XVI : Tests de désorption réalisés avec l'alcool nitrobenzylique
- Tableau XVII : Tests de désorption réalisés avec l'acide nicotinique
- Tableau XVIII : Protocole de préparation des dépôts pour l'analyse par microsonde FTMS

Tableau XIX : Commentaires des spectres FTMS obtenus pour l'amiodarone mélangée ou non avec l'acide nicotinique et en fonction de la défocalisation

Tableaux XXa : Moyennes des intensités absolues du pic moléculaire $m/z=646$ et des fragments connus de l'amiodarone relevées sur les spectres en fonction de la longueur d'onde et pour plusieurs matrices

XXb: Rapports $R_i = (\text{Intensité fragment } m/z=i / \text{Intensité fragment } m/z=518)$ correspondants

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Niveaux moyens d'amiodarone □ et de monoN-déséthylamiodarone ■ observés dans des tissus prélevés sur des rats (n=8) après administration intrapéritonéale répétée de 50 mg/kg d'amiodarone
- Figure 2 : Niveaux d'amiodarone □ et de monoN-déséthylamiodarone ■ trouvés dans des tissus prélevés sur un chien traité oralement pendant 14 jours à la dose journalière de 50 mg/kg d'amiodarone
- Figure 3 : Fréquences d'apparition des effets secondaires en rapport avec la dose journalière
- Figure 4 : Fréquences d'apparition des effets secondaires en rapport avec la dose cumulée
- Figure 5 : Diagramme schématique de la microsonde LAMMA 500
- Figure 6 : Fixation de l'échantillon sur le porte-échantillon
- Figure 7 : Courbes d'émission de différents colorants utilisés pour les lasers
- Figure 8 : Principe d'un spectromètre de masse à Temps de Vol
- Figure 9 : Diagramme schématique de la source ionique et de la géométrie des lentilles ioniques de la microsonde LAMMA 500 montrant le parcours des ions
- Figure 10 : Parcours des ions dans la chambre d'échantillonnage a) sans et b) avec le système optique ionique
- Figure 11 : Représentation schématique de l'effet du réflecteur d'ions utilisé dans la microsonde LAMMA 500
- Figure 12 : Schéma descriptif de la microsonde FTMS 2000
- Figure 13 : Élément supraconducteur du FTMS
- Figure 14 : Schéma de principe de la cellule du FTMS
- Figure 15 : Schéma descriptif de la cellule
- Figure 16 : Séquence expérimentale
- Figure 17 : Principe du piègeage des ions dans la cellule
- Figure 18 : Excitation des ions par application de radiofréquences
- Figure 19 : Modes direct et hétérodyne

Acronymes et abréviations

EE⁺ : Even Electron (ion à nombre pair d'électrons)

FAB : Fast Atom Bombardment

FTMS : Fourier Transform Mass Spectrometry

ICR : Ion Cyclotron Resonance

IE : Impact électronique

ITMS : Ion Trap Mass Spectrometer

LAMMA : Laser Mass Microprobe Analyzer

LASER : Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

LDMS : Laser Desorption Mass Spectrometry

Nd-YAG : Néodyme-Yttrium Aluminium Garnet

OE⁺ : Odd Electron (ion à nombre impair d'électrons)

PDMS: Plasma Desorption Mass Spectrometry

SIMS : Secondary Ion Mass Spectrometry

TOF : Time of flight

TR : Transient Recorder

Quelques grandeurs photométriques

Quantité de lumière Q en Joules

Flux lumineux ϕ en Watt

Eclairement E en Watt par m².

Irradiance I en Watt par cm²

INTRODUCTION
GENERALE

L'analyse in-situ de molécules organiques dans un tissu biologique reste aujourd'hui un réel problème. Les sites d'accumulation d'un médicament sont déterminés par des techniques longues à mettre en oeuvre. Le médicament doit contenir dans sa structure un élément non présent dans les tissus. Sinon, il devra être marqué. Notre objectif est d'apporter une contribution à *l'analyse in-situ de molécules organiques dans une matrice organique ou biologique par une technique d'analyse rapide*. Pour cela, une méthodologie a été recherchée qui permette, grâce à la microsonde LAMMA, de réaliser la localisation subcellulaire dans un tissu biologique d'un médicament administré à un animal par voie intraveineuse ou par ingestion.

Le médicament, sur lequel se sont focalisés nos efforts, est un benzofuranne substitué contenant deux atomes d'iode par molécule. Il s'agit de l'amiodarone, commercialisée par les laboratoires Labaz sous le nom de Cordarone. Ce médicament est couramment utilisé depuis une dizaine d'années en Europe pour ses propriétés antiarythmiques et antiangineuses. Un stockage phospholipidique (sous forme d'inclusions lamellaires dans les macrophages) a été mis en évidence lors d'un traitement prolongé à l'amiodarone (1,2,3,4).

Une publication récente (5) rend compte de la microanalyse quantitative de l'amiodarone dans des macrophages, obtenue *en dosant par rayons X l'iode* introduit dans l'organisme par la molécule cible. Dans ce type d'analyse, les cellules sont extraites et il ne s'agit alors que d'une analyse élémentaire globale. En effet, rien ne permet d'affirmer l'appartenance de l'iode dosé (à l'amiodarone ou à l'un de ses métabolites), ni sous quelle forme il existe (lié à une molécule organique ou sous forme minérale I^-).

La localisation proprement dite de l'amiodarone dans les différents tissus a été étudiée par une technique de marquage isotopique radioactif spécifique : l'autoradiographie (6). Le médicament (dilué avec sa forme marquée au tritium radioactif ^3H) est administré à des rats pendant neuf jours, période au bout de laquelle la dose radioactive accumulée atteint un curie. L'amiodarone se concentre dans les macrophages et dans les structures lysosomales ayant un contenu lipidique. Cette technique d'analyse présente les inconvénients suivants:

- le laps de temps entre le prélèvement du tissu et l'obtention des résultats est assez important. Il faut que les atomes marqués impressionnent les papiers révélateurs ; étant donné le niveau de radioactivité, cela prend un certain temps.
- il s'agit d'une technique de marquage d'atomes. Il existe toujours le risque que l'atome marqué soit échangé lors du métabolisme du médicament.

Le but de notre travail a consisté à explorer les possibilités qu'offre la spectrométrie de masse pour localiser l'amiodarone dans une matrice biologique, en l'identifiant directement par son pic quasimoléculaire $(\text{M}+\text{H})^+$ ou par un fragment caractéristique de haute masse. La microsonde à impact laser LAMMA est en effet une technique très séduisante par sa simplicité d'utilisation et la rapidité avec laquelle les spectres sont obtenus.

Le spectromètre de masse, appelé LAMMA 500 et configuré en transmission, a été conçu originellement pour l'analyse des coupes biologiques. Il permet l'identification et la localisation subcellulaire d'éléments dans les tissus. Il possède effectivement une très grande sensibilité dans le cas des éléments à bas potentiel d'ionisation comme les métaux alcalins ou les éléments légers. Les quelques exemples

suivants permettent d'illustrer cette caractéristique à analyser ces éléments : dioxyde de titane (TiO_2) dans la pulpe dentaire (7), plomb dans la moelle osseuse (8), platine dans les reins, aluminium dans le foie (9), sodium, magnésium, potassium, calcium, baryum dans la rétine, lithium dans les tissus cérébraux (10). Ce ne sont là évidemment que des exemples parmi tant d'autres. Moenke-Blankenburg (11) a recensé très récemment les travaux effectués par microsonde à impact laser sur les matériaux organiques et inorganiques.

Quelques publications, encore rares dans la littérature scientifique, mentionnent la détection de **molécules organiques** présentes à l'état de traces dans une matrice par microsonde à impact laser. Par exemple, des molécules organiques cibles suffisamment localisées ont été désorbées directement :

Seydel et Lindner (12) ont obtenu de manière reproductible l'empreinte spectrale du phytalescin glycéollin (molécule organique accumulée par de jeunes plants de soja traités par un fongicide). Cette empreinte peut être utilisée pour identifier l'espèce sans pour cela connaître la structure chimique des ions responsables des pics observés.

De la même façon, des cristaux de "lichexanthone" (13) ont été mis en évidence par micrographie sur du lichen tropical et analysés sélectivement par microsonde LAMMA.

En fait, on constate rapidement que ces rares exemples rendent compte de la détection de molécules organiques se présentant sous forme de dépôt microscopique sur/dans un substrat donné. Leur analyse n'a été possible qu'en focalisant avec précision le faisceau laser. Un processus de désorption douce à faible énergie est mis en jeu. La performance de l'analyse tient avant tout de la sélectivité spatiale de la microsonde laser.

Kauffmann (14), quant à lui, a injecté le dérivé fluoré d'un médicament cardioactif (Vérapamil) dans un tissu animal. En ions négatifs, le spectre de masse révèle la présence de fluor. Il s'agit alors, dans ce cas particulier, véritablement d'un repérage par détection d'un atome marqueur dans une matrice biologique par la technique LAMMA 500.

Wink et col. (15) rendent compte en 1984 d'une première application du LAMMA 1000 pour étudier la distribution de composés organiques dans une matrice biologique. Deux alcaloïdes (sparteïne ($m/z=233$) et lupanine ($m/z=247$)) sont localisés dans les cellules périphériques des tiges de *Lupinus Polyphyllus* et *Cytisus scoparius*. Toutefois l'analyse est faite dans la masse et les quantités volatilisées sont très importantes. Pour qu'un composé organique soit détecté dans une matrice biologique, les auteurs donnent comme concentration locale minimum la valeur de 5 millimoles par kilogramme.

La détection de l'amiodarone dans une matrice organique par spectrométrie de masse a nécessité de résoudre de nombreux problèmes.

D'un point de vue théorique : Bien comprendre le mécanisme de désorption induite par laser du produit pur.

D'un point de vue expérimental : Analyser le médicament enrobé dans une matrice polymérique, puis contenu dans des coupes histologiques. Etudier ensuite les effets de matrice (inclusion polymérique, inclusion cellulaire =cryocoupe).

La préparation des coupes histologiques passe par plusieurs étapes plus ou moins obligatoires : la fixation du tissu, l'emploi d'un cryoprotectant dans le cas des cryocoupes, l'utilisation d'un produit

contrastant pour l'observation en microscopie électronique. Aussi parallèlement et en fonction de nos résultats LAMMA, les techniques de préparation des coupes fines ont été adaptées afin de minimiser certains effets de matrice (la conservation des coupes dans un support polymère induit des effets de matrice qui gênent la détection des molécules).

Pour lever les difficultés que nous avons rencontrées lors de l'analyse de l'amiodarone dans une matrice polymérique ou biologique, nous avons recherché le moyen d'augmenter la formation des pics caractéristiques de l'amiodarone par désorption assistée. Aussi, lui avons-nous additionné des molécules donneuses de proton ou de cation alcalin ou des molécules absorbant sélectivement les photons pendant l'irradiation laser et transférant ainsi l'énergie sous forme d'énergie vibrationnelle. L'inclusion directe d'un composant qui aiderait l'amiodarone à désorber et s'ioniser, ou l'utilisation d'une nouvelle matrice sont évidemment l'objectif fixé.

PARTIE I

AMIODARONE

Introduction

A- La molécule et ses propriétés
physico-chimiques

B- Le médicament

C- Conclusions

INTRODUCTION

L'amiodarone est un médicament qui a été synthétisé par le Centre de Recherches des laboratoires LABAZ ; ces services avaient axé leurs préparations et leurs ciblage pharmacologiques sur des molécules appartenant à la série des substances benzofuraniques et ainsi retenu :

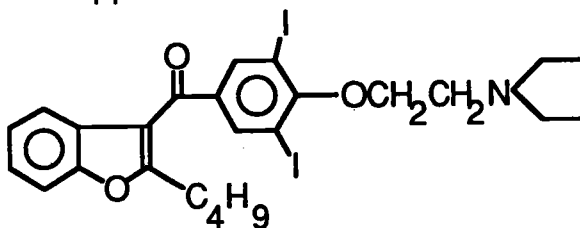
- des dérivés ayant des effets sur les systèmes capillaire et veineux (Benzarone, Etabenarone)
- des dérivés actifs sur le système cardio-vasculaire (Benziodarone, Amiodarone)
- des dérivés ayant des propriétés hypo-uricémiantes (Benziodarone, Benzabromarone)

L'amiodarone (L3428) a été sélectionnée parmi une grande série de dérivés benzofuraniques possédant un effet relâchant sur le muscle lisse du coeur, prédominant au niveau du système vasculaire.

A - LA MOLECULE ET SES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

[2-butyl-3-(3,5-diiodo-4-(b-diéthylaminoéthoxy))benzoylbenzofurane] est le nom normalisé de cette molécule. Elle a été synthétisée selon le schéma réactionnel reporté en annexe.

- Sa formule brute est : $C_{25}H_{29}I_2NO_2$ et son poids moléculaire : 645
- Sa formule développée :



Cette molécule possède la particularité d'associer une partie hydrophobe (benzofurane et benzène diiodé) à une partie hydrophile (amine tertiaire). Cette caractéristique lui confère des propriétés de solubilité particulières (16).

1) Solubilité dans l'eau

L'amiodarone se présente le plus généralement sous forme de chlorhydrate d'amiodarone (AH^+, Cl^-). Il s'agit d'une poudre blanche soluble dans l'eau seulement à très forte concentration (de 2 à 5% en chauffant). La solution obtenue est sursaturée et ne doit sa stabilité qu'aux propriétés tensioactives intrinsèques de la molécule. La dilution à température ambiante d'une solution à 5% ou moins provoque une opalescence ou une précipitation.

2) Solubilités dans différents solvants organiques

Les limites de solubilité de l'amiodarone sont de 100 g/l dans le méthanol, le chloroforme, le carbure de méthylène, de 40 g/l dans l'éthanol et 10 g/l dans l'isopropanol. Sa solubilité est inférieure à 1% dans l'acétone, le tétrachlorure de carbone, la dipropylcétone et le dioxanne.

3) Stabilité en solution organique

Les solutions sont en général stables en l'absence de lumière pendant au moins une semaine. A 20°C, en présence de lumière, la stabilité de l'amiodarone est inférieure à 24 heures, tandis que le chlorhydrate reste stable environ 48 heures.

B - LE MEDICAMENT

1) Introduction

Depuis sa commercialisation en 1967 pour le traitement de base de l'insuffisance coronaire, l'amiodarone a fait l'objet de nombreux travaux. Par ce fait, son effet antiarythmique a été remarqué et reconnu. L'amiodarone est maintenant de plus en plus utilisée pour le contrôle des arythmies atriales et ventriculaires, spécialement celles qui résistent aux agents antiarythmiques classiques (17) ; toutefois, sa vente est restée longtemps interdite aux Etats-Unis en raison des effets secondaires parfois observés (voir paragraphe B-3). En effet, des manifestations de pneumonie interstitielle à l'amiodarone ont été relevées (18). Le poumon, de part l'importance de sa circulation sanguine, est souvent le révélateur de maladies provoquées par un traitement médical prolongé (19).

2) Les propriétés pharmacocinétiques

L'étude de la pharmacocinétique d'un médicament consiste à explorer les différentes étapes qu'il parcourt dans l'organisme :

- **absorption par l'organisme**
- **distribution dans les différents organes et tissus, dans le sang**
- **élimination par les voies urinaires, biliaires, lacrymales.**

Tous les résultats exposés dans le paragraphe B, dont la référence n'est pas explicitement précisée, sont extraits du même ouvrage (20). La compréhension du métabolisme de l'amiodarone est un véritable

casse-tête pour les chercheurs ; en effet, ce médicament est fortement métabolisé par le foie. A ce jour, les différentes phases du métabolisme ne sont pas toutes connues, mais la plupart d'entre elles ont pu être identifiées sur des animaux et sur l'homme.

a - Les méthodes analytiques utilisées

Les premières analyses sur les fluides biologiques et les tissus ont été réalisées dans les années soixante en utilisant le traceur radioactif ^{131}I et par la suite le traceur ^{14}C .

Le développement des techniques de Chromatographie Liquide Haute Pression (HPLC) et la mise au point de procédures d'extraction et d'analyse des fluides et tissus variés (21) ont permis de déterminer les concentrations en amiodarone ainsi que celles de ses métabolites. Ainsi, Storey (22) présente, en 1982, une méthode *rapide, reproductible* pour mesurer *dans le plasma* les concentrations atteintes en amiodarone et en son principal métabolite, le MonoDesEthylAmiodarone (MDEA) pendant une thérapie normale. Afin de caractériser la distribution tissulaire du médicament, le même auteur (23) a développé une méthode permettant de travailler sur de petits échantillons tissulaires (20-100 mg) collectés par biopsie ou nécrose. La technique utilise la digestion enzymatique des échantillons. Le digestat obtenu est dilué dans du plasma humain débarrassé de ses ions. Après addition d'un standard interne, le mélange est extrait par du méthyl ter-butyl éther. Un aliquot de la phase organique est ensuite analysé par HPLC avec détection UV à 240 nm.

Plomp (24), quant à lui, propose une technique d'analyse de l'amiodarone et du MDEA applicable aussi bien aux tissus (100 mg) qu'au plasma (1 ml). L'échantillon est homogénéisé avec 50 % d'éthanol ; la déprotéinisation est améliorée avec de l'acétonitrile contenant un

standard interne (Benzothiophène bromé). Le surnageant obtenu après centrifugation est injecté directement dans le chromatographe.

Ces techniques longues à mettre en oeuvre aident à suivre l'amiodarone dans les différents organes afin de savoir comment le médicament est absorbé, comment il s'élimine, à quels endroits il se fixe préférentiellement et dans quelles quantités.

b - L'absorption

En comparaison avec celle que l'on observe chez les animaux, l'absorption de l'amiodarone chez l'homme est plus lente. Le temps nécessaire pour atteindre une concentration maximum en amiodarone dans le plasma varie de 3 à 10 heures (temps moyen : 5 heures) en fonction de l'individu :

Nbre de sujets	Dose (mg)	Temps Max		Conc. Max	
		Moyenne	Plage	Moyenne	Plage
4	200-400	4,5	3 - 6	-	-
7	400	7,3	-	-	-
8	800	5,2	3 - 7	1,7	0,58-3,12
12	200	3,3	2 - 6	0,27	0,21-0,67
6	400	5,1	1,5-8,5	0,44	0,30-0,68
6	1400-1800	4,9	3-6,2	6,9	3,1-14,2
7	400	4,8	2,7-6,5	0,37	0,15-0,70
12	400	4,7	3 - 6	0,54	0,21-1,13
3	400	-	2 - 10	-	-

Tableau I : Absorption de l'Amiodarone reportée dans la littérature en fonction de la dose administrée (temps en h. et conc. en mg/l)

c - L'élimination

Pour toutes les espèces étudiées, y compris l'homme, l'élimination par les voies biliaires et fécales représente environ 65 à 75 % du médicament ingéré, celle par la voie urinaire étant tout à fait mineure.

L'amiodarone est fortement métabolisée avant son élimination biliaire. Ainsi chez le rat, on a pu constater de façon expérimentale qu'environ 40% du carbone-14 contenu dans la dose administrée par voie intraveineuse est récupéré dans les prélèvements de bile collectés pendant 12 heures et que seulement 0,27% de cette dose est éliminée sous forme non métabolisée.

Les cinétiques d'élimination sont très différentes selon les espèces étudiées. Chez l'homme, une fonction exponentielle en 4 parties est suggérée :

- L'administration du médicament est caractérisée par une distribution rapide (temps de demi-vie* : 4 à 7 minutes),
- Elle-même suivie de 2 phases intermédiaires (temps de demi-vie : 3,4 +1 heures et 22,5 + 8,6 heures).
- La phase terminale d'élimination est très lente (temps de demi-vie : 18,0+4,6 jours ou 24,8+11,7 jours selon les auteurs) ; ceci est dû au déstockage phospholipidique lent de l'amiodarone fixée.

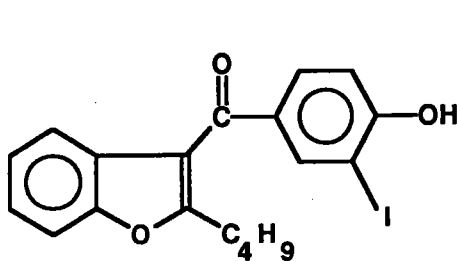
La première phase d'élimination est très variable d'un individu à l'autre ; son importance tend à diminuer progressivement lors d'une médicalisation plus longue. Cette modification n'a pas été observée chez les animaux en traitement chronique et n'est pas encore expliquée.

L'un des effets secondaires induit par le traitement étant l'apparition de dépôts cornéens, l'élimination par les voies lacrymales a été étudiée : sur les 25 patients recevant quotidiennement 400 mg d'amiodarone, la quantité de 3,4 µg récupérée à la même fréquence est une fraction négligeable par rapport à la dose ingérée. De même, les concentrations dans la salive sont de 3 à 30 fois moins importantes que dans le plasma.

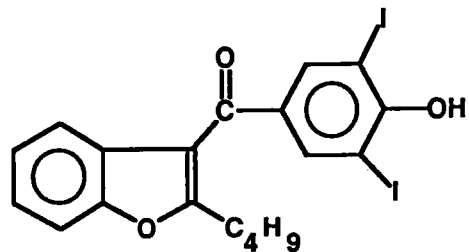
*le temps de demi-vie est le temps au bout duquel la concentration en médicament est égale à la moitié de la concentration maximale.

d - Le métabolisme

Le métabolisme très complexe de l'amiodarone conduit à différents produits de biotransformation. Les premiers métabolites identifiés ont été recherchés dans les larmes humaines. Il s'agit des deux composés suivants:



M=420



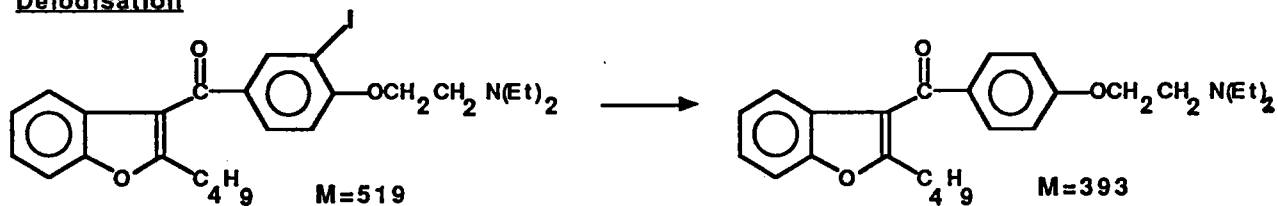
M=546

Toutefois une réserve est à formuler car l'amiodarone est une molécule photosensible et il n'est pas certain que ces composés soient réellement des métabolites in-vivo mais plutôt des molécules photochimiquement modifiées.

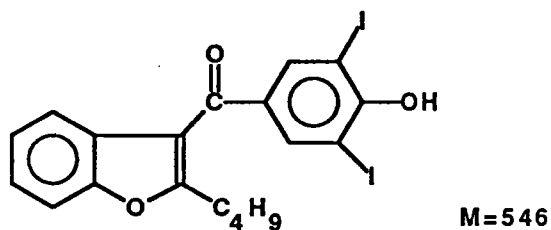
Le métabolisme de l'amiodarone est quantitativement différent selon les espèces, mais dans tous les cas on retrouve 4 grandes voies de métabolisme, outre la glucuroconjugaison (voir page suivante). Le principal métabolite est le **MonoDésEthylAmiodarone** (MDEA) (m/z=617). Le rapport concentration en médicament sur concentration en métabolite varie énormément en fonction de l'espèce et du tissu étudié.

PRINCIPAUX METABOLITES
DE L'AMIODARONE

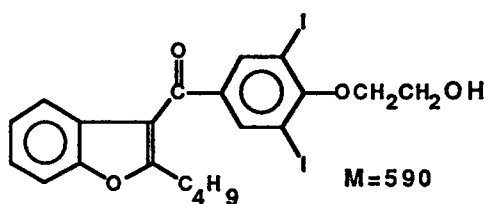
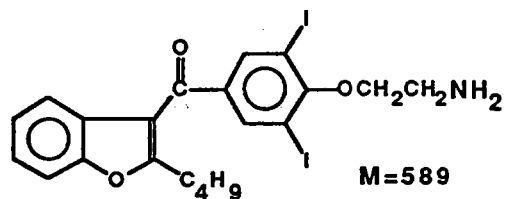
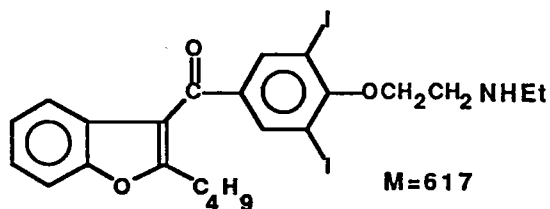
Déiodisation



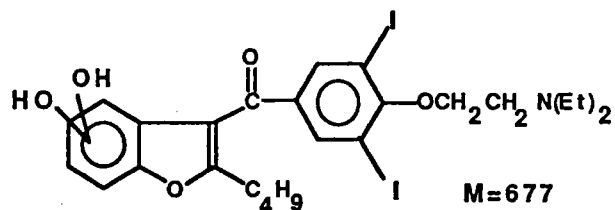
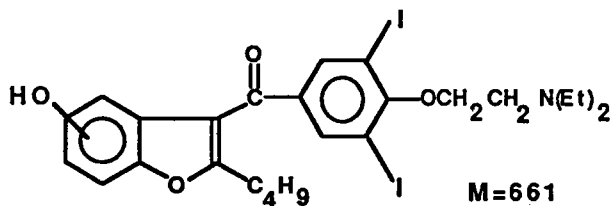
O-déalkylation



N-déalkylation



Hydroxylation :



e - La pharmacocinétique du plasma

Les premières études sur du sang prélevé sur un rat traité par l'amiodarone radioactive montrent que les niveaux de radioactivité atteignent leur maximum 4 à 6 heures après l'administration orale (10mg/kg), correspondant à 0,460 mg d'amiodarone par litre. Ensuite cette radioactivité diminue avec un temps de demi-vie égal à 13 heures, pour finalement devenir nulle après 96 heures. Une relation linéaire a été établie entre la concentration en amiodarone dans le plasma et la dose ingérée (ceci pour des doses supérieures à 100 mg/kg). Le MDEA n'est détectable dans le plasma que pour les doses les plus élevées : $[MDEA]=0,30 + 0,14 \text{ mg/l}$ pour $[A]=4,08 + 1,23 \text{ mg/l}$.

Toutes les espèces ont un volume de distribution du sang très important. Aussi les échanges sang/tissu sont très favorisés. Pour l'homme, après 20 minutes de perfusion de l'amiodarone, environ 93% de la dose totale a déjà quitté le plasma et est distribuée dans les tissus. **La rapidité du processus de distribution implique que le médicament est d'abord fixé sur les organes les mieux perfusés comme le coeur, les poumons, le foie et les reins. Les tissus adipeux et certains organes faiblement perfusés permettent un stockage de l'amiodarone du fait de leur forte affinité avec les composés solubles dans les lipides.**

f- La distribution

Les remarques précédentes ont permis de constater que, seule, une fraction de l'amiodarone est éliminée. Le reste est fixé. Le caractère hydrophobe très marqué de l'amiodarone fait qu'elle a une action

action identique au cholestérol, aux acides gras, aux alcools à longue chaîne. L'interaction hydrophobe avec les chaînes carbonées des lipides conduit à un stockage phospholipidique dans les macrophages.

i) étude sur les animaux

A l'exception des tissus adipeux, l'amiodarone quitte les organes dans lesquels elle était fixée (foie, rein, coeur, cerveau, muscle) avec un taux de décroissance similaire ou plus rapide que dans le sang. Le rapport $[Amiodarone]_{tissu} / [MDEA]_{tissu}$ est indépendant de la dose administrée et a une valeur moyenne égale à $1,5 \pm 0,1$.

Après administration intrapéritonale répétée (de 1 à 10 jours) à des doses allant de 25 à 200 mg/kg, l'accumulation de l'amiodarone et du MDEA chez le rat est dépendante de la dose. Vingt quatre heures après la dernière dose, ces deux composés sont préférentiellement distribués par ordre décroissant dans les tissus adipeux, le poumon, le foie, le rein, la glande thyroïde, le coeur et les muscles.

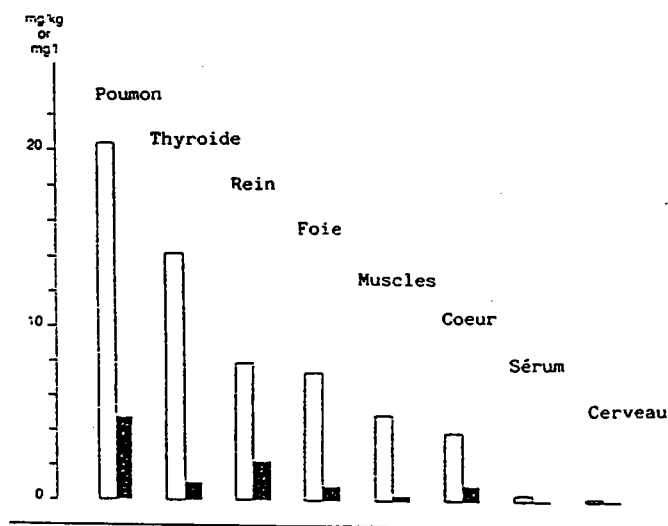


Figure 1 : Niveaux moyens d'amiodarone \square et de mono N-déséthyl amiodarone \blacksquare observés dans des tissus prélevés sur des rats (n=8) après administration intrapéritonale répétée de 50 mg/kg d'amiodarone.

Le rapport $[\text{Amiodarone}]_{\text{tissu}}/[\text{Amiodarone}]_{\text{sang}}$ est exceptionnellement élevé dans le cas des tissus adipeux (1000 à 4000) et plutôt moyen à haut dans les autres tissus (5 à 90), et très faible dans le cerveau (0 à 0,4). On trouve en moyenne 15% de MDEA dans les tissus (en réalité de 1 à 48 % selon les doses et les tissus) par rapport à la quantité d'amiodarone.

La distribution de l'amiodarone dans le myocarde a été extrêmement étudiée chez le chien. Le rapport $[\text{Amiodarone}]_{\text{tissu}} / [\text{MDEA}]_{\text{tissu}}$ est dans ce cas très différent de celui obtenu pour le rat (4,8 + 0,6).

Sur divers tissus prélevés après décès, les niveaux de concentration en amiodarone et en MDEA ont été établis (figure 2). Le traitement a duré 14 jours à 50 mg/jour/kg. Les plus hautes concentrations sont observées dans les graisses et dans le poumon, les plus basses dans le cerveau, l'estomac, les petit et grand intestins, les muscles.

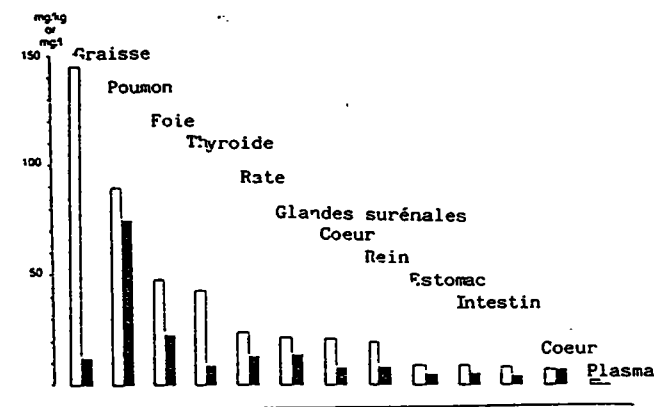


Figure 2 : Niveaux d'amiodarone □ et de mono-N-déséthylamiodarone ■ trouvés dans des tissus prélevés sur un chien traité oralement pendant 14 jours à la dose journalière de 50 mg/kg d'amiodarone.

Le métabolite MDEA est toujours dilué et en concentration inférieure à celle du médicament. Toutefois le taux "médicament sur

métabolite" est du même ordre de grandeur dans les graisses et dans le plasma (11,6 et 9,4 respectivement). Ce rapport est beaucoup plus bas dans les autres tissus (2,0 + 0,9).

Plomp (24) a observé des taux de concentrations en amiodarone plus hauts que ceux du métabolite MDEA dans les tissus adipeux. Il explique ceci par une solubilité du composé parent plus grande chez l'homme. Cette différence dans le caractère lipophile serait une conséquence de la différence des polarités des chaînes secondaires pour ces deux composés.

ii) étude sur l'homme

Le tableau II permet de faire une comparaison inter-espèces. Les rapports [Amiodarone]/[MDEA] dans le plasma sont du même ordre de grandeur chez l'homme et chez le chien. Chez l'homme, les concentrations en MDEA sont plus élevées que celles en amiodarone dans les tissus du myocarde. Toutefois, ce métabolite apparaissant très lentement, ceci peut simplement refléter le fait qu'un traitement dure environ un mois chez l'animal et plusieurs chez l'homme.

ESPECES	Conc. Myocarde/Conc. Plasma (kg/l)		Conc. Amiodarone/Conc. Métabolite	
	Amlodarone	N-déséthyl-amlodarone	dans plasma	dans myocarde
RAT	7,4 +/- 1,7	50 +/- 26	6,8 +/- 4,4	1,7 +/- 0,8
COBAYE	13,9	?	?	?
LAPIN	5,7	7,4	3	2,2
CHIEN	41 +/- 26	116 +/- 68	0,8 +/- 0,4	1,1 +/- 0,8
HUMAIN	35	91	0,76	0,29

Tableau II : Comparaison inter-espèces

3) Les effets secondaires

Estrada (25) note que, administrée aux doses requises pour contrer des arythmies mortelles, l'amiodarone produit des effets secondaires dans 80 % des cas.

Malgré tout, de nombreuses études cliniques ont montré que l'amiodarone provoque des effets secondaires faibles si les doses prescrites sont maintenues en dessous de 600 mg quotidiens.

Lors de la prise d'amiodarone par voie orale, les effets secondaires les plus importants, nécessitant l'arrêt ou la diminution du traitement, sont des dysfonctionnements thyroïdiens, neurologiques, des problèmes hépatiques, pulmonaires ou une photosensibilité importante. D'autres effets comme la photosensibilité légère, la bradycardie, l'apparition de micro-dépôts oculaires, des dérèglements gastro-intestinaux peuvent nécessiter un changement dans le traitement en cours. Tous ces effets indésirés sont, malgré tout, réversibles à l'arrêt du traitement.

a - Les effets cutanés

- L'incidence de la photosensibilité est très variable d'un individu à l'autre. Il s'agit d'un effet phototoxique et non photoallergique pour les longueurs d'onde allant de 320 à plus de 400 nm. La fréquence d'apparition de ce phénomène sur la totalité des sujets étudiés est d'environ 5 %.
- La décoloration de la peau peut apparaître après un traitement prolongé (supérieur à 2 ans) et seulement si les doses cumulées excèdent 140 g. Ce phénomène dépend donc de l'accumulation de l'amiodarone et de la durée du traitement. La fréquence d'apparition est donnée à 1 % dans les études cliniques. Il a été montré que les

concentrations en amiodarone et en MDEA sont supérieures dans les zones cutanées affectées par rapport aux zones intactes (26).

b - La toxicité pulmonaire

L'apparition d'une toxicité pulmonaire due à l'amiodarone ne peut être prédite simplement en considérant le dosage cumulatif de l'amiodarone ou la durée du traitement. On a constaté, à postériori, que la concentration en amiodarone dans le poumon d'un patient présentant une toxicité pulmonaire est considérablement plus élevée que celle trouvée chez un patient non affecté. En général, la toxicité pulmonaire est plus fréquente pendant l'administration de plus fortes doses maintenues un certain temps (600 à 800 mg/jour). L'auteur (26) suggère que les accumulations dans le poumon s'effectuent chez des patients prédisposés au développement d'une toxicité pulmonaire.

c - La toxicité hépatique

La cirrhose du foie est une complication rare dans le traitement par l'amiodarone. Shepherd rapporte l'étude de deux cas (27).

d - Les dépôts cornéens

Bjerregaard (28) a observé les dépôts subépithéliaux gris bruns apparus chez certains patients. L'extension et la densité des dépôts sont suivies tandis que les larmes et le sérum sont simultanément analysés. Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les changements cornéens et les concentrations en amiodarone déterminées au même instant. Par contre, l'auteur trouve des relations significatives entre les changements cornéens et, d'une part la durée de

la thérapie, et d'autre part la dose totale administrée.

e - Fréquences d'apparition des effets secondaires

Les figures 3 et 4 présentent les fréquences d'apparition des effets indésirés en fonction de la dose journalière et de la dose cumulée

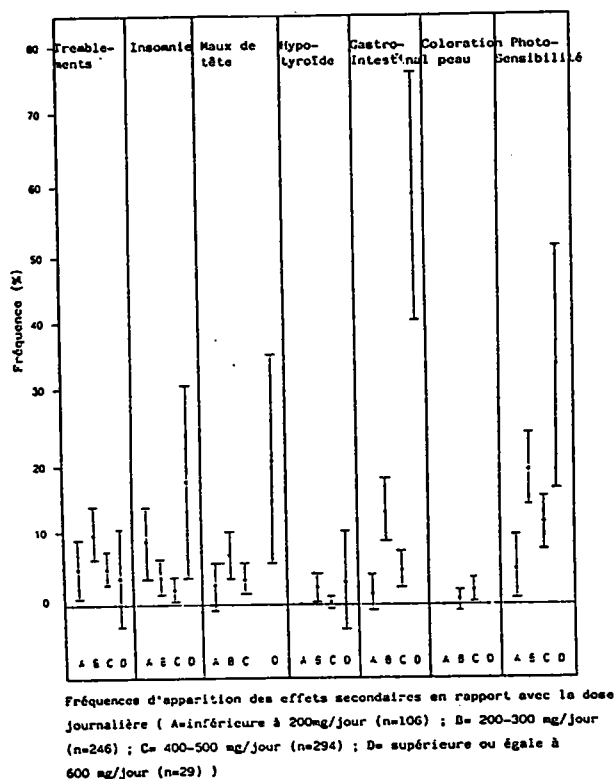


Figure 3 : Fréquences d'apparition des effets secondaires en fonction de la dose journalière.

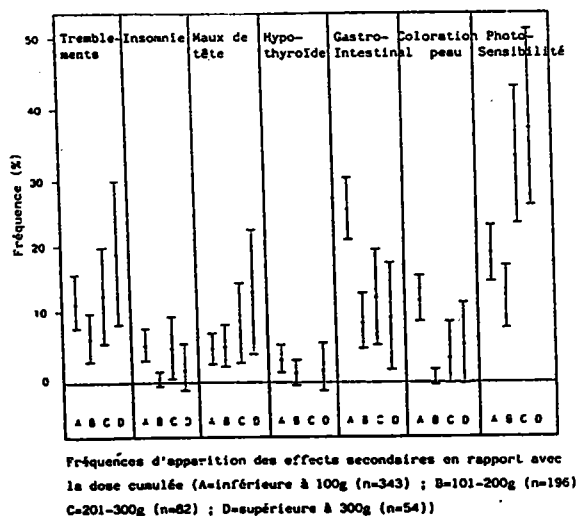


Figure 4 : Fréquences d'apparition des effets secondaires en fonction de la dose cumulée.

4) Toxicité

a - Toxicité aigüe

- L'injection d'amiodarone à des doses d'environ 150 mg/kg par voie intraveineuse entraîne la mort des rats, des souris et des chiens.
- Par voie intrapéritonale, la dose létale est de 600 à 950 mg/kg pour les rats et de 450 mg/kg pour les souris.
- Par voie orale, elle est supérieure à 3000 mg/kg pour tous les animaux étudiés.

b - Toxicité chronique

La toxicité chronique de l'amiodarone, administrée dans la moelle osseuse, a été étudiée sur une période de 12 mois chez le rat et de 2 mois chez le chien. On constate ni mortalité, ni déficit pondéral, ni modification des constantes biologiques.

C- CONCLUSIONS

L'amiodarone est une molécule organique bien connue des médecins pour ses propriétés médicales, mais également parce qu'elle a été énormément étudiée comme molécule modèle lors des études de pharmacocinétique, de pharmacologie, de toxicité. Du fait de sa fixation phospholipidique et de la présence d'atomes d'iode dans la molécule, l'amiodarone est une molécule idéale pour étudier la faisabilité d'une localisation in-situ de principes actifs dans des coupes histologiques par spectrométrie de masse à impact laser.

PARTIE II

PARTIE INSTRUMENTALE

Chapitre 1 : La technique LAMMA

Chapitre 2 : La technique FTMS

Cette partie a pour but de présenter les deux appareils équipant notre laboratoire et sur lesquels nos expérimentations de spectrométrie de masse par impact laser ont été principalement réalisées.

Dans un premier temps, la microsonde **LAMMA** (**L**aser **M**icroprobe **M**ass **A**nalyzer) est décrite. Ses performances et ses limites sont précisées, ainsi que ses domaines d'application.

La microsonde **FTMS** (**F**ourier **T**ransform **M**ass **S**pectrometer) est ensuite présentée. Le principe de la résonance cyclotronique des ions est rappelé. Les nombreux paramètres gouvernant les analyses sont définis. De la même façon, notre intérêt s'est porté sur les avantages et les inconvénients de cette technique.

Chapitre I

LA TECHNIQUE LAMMA 500

A - GENERALITES

Actuellement sur le marché, il existe trois types de microsondes à ionisation laser comprenant les deux analyseurs LAMMA (LAsER Microprobe Mass Analyzer) commercialisés par la société Leybold-Heraeus dès 1978 ainsi que le LIMA (LAsER Ionisation Mass Analysis) commercialisé par Kratos Analytical pour Cambridge Mass Spectrometry Limited :

LAMMA 500 Analyse *en transmission* de microparticules, de lames minces, de coupes histologiques (29, 30).

LAMMA 1000 Analyse *en réflexion* d'échantillons massifs (31).

LIMA Microsonde polyvalente - *réflexion et transmission* - avec une optique de focalisation et de visualisation différente comportant en option la post-ionisation. Microsonde concurrente (32), pour laquelle il existe actuellement peu d'applications publiées dans la littérature scientifique.

De nombreuses publications dans des domaines aussi variés que la chimie générale, la chimie organique, la minéralogie, la géologie, la criminalologie, la toxicologie, la métallurgie, la recherche environnementale...sont les témoins d'un élargissement du champ d'action de ces microsondes à impact laser (33-40).

B - INSTRUMENTATION

La microsonde LAMMA 500 est un spectromètre de masse à temps de vol (TOF-MS) couplé à un laser à colorant. Cet appareil peut se décomposer en cinq parties distinctes que l'on retrouve sur le diagramme figure 5 :

- * les lasers ionisant et pilote
- * la chambre d'échantillonnage
- * le microscope optique de visualisation de l'échantillon
- * le spectromètre à temps de vol (Time-Of-Flight)
- * le détecteur et le système d'acquisition des données.

Le temps total d'acquisition d'un spectre est inférieur à 100 μ s.

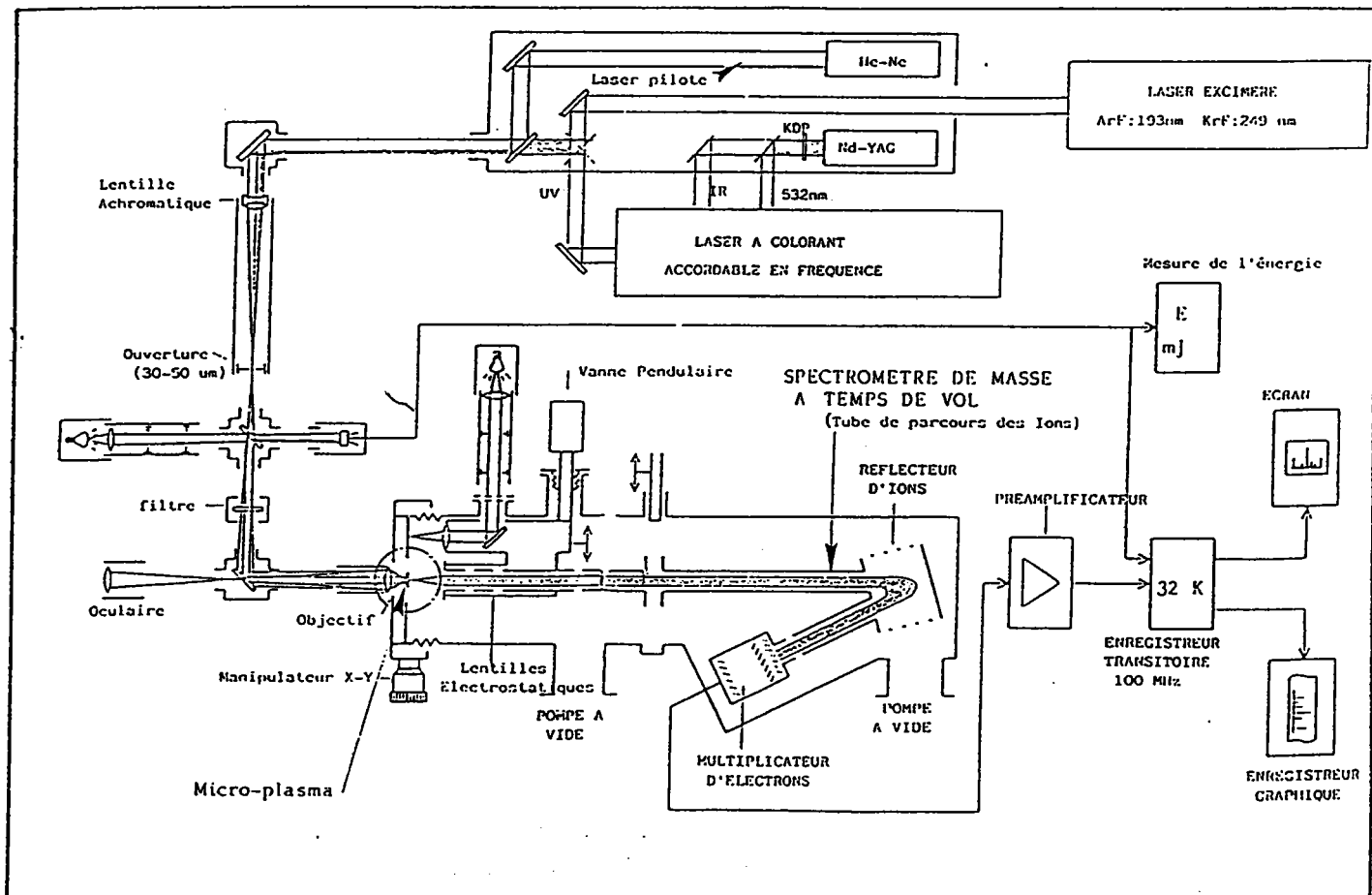
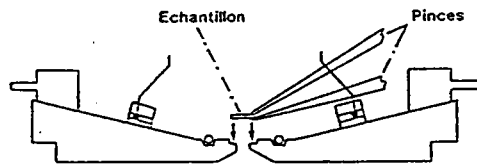


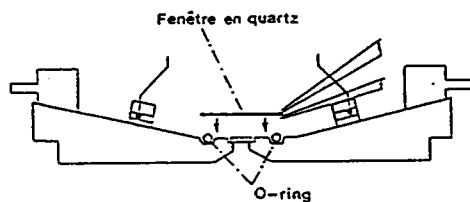
Figure 5 : Diagramme schématique de la microsonde LAMMA 500

1) La chambre d'échantillonnage

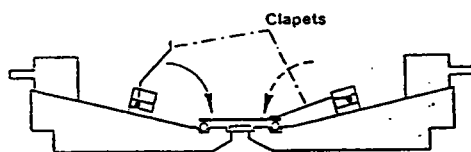
Elle est séparée du spectromètre de masse par une vanne pendulaire asservie à la pression régnant dans la chambre. Ce système permet le changement très rapide des échantillons. La configuration en **transmission** du LAMMA 500 induit une limitation au niveau de l'épaisseur de l'échantillon : elle doit être nécessairement inférieure ou égale à 5 μm . En effet, la perforation par le rayon laser est en principe obligatoire pour que les ions formés soient extraits et analysés. L'échantillon est déposé sur une grille utilisée classiquement en microscopie électronique. Celle-ci est ensuite placée sous un opercule de quartz ; ce dernier sert en même temps de fenêtre optique et de joint d'étanchéité lors de la mise sous vide (figure 6).



L'échantillon placé sur une grille de microscope électronique est fixé en face de l'orifice au centre de la platine.



Un joint O-ring assure l'étanchéité entre la fenêtre et la platine.



La fenêtre est maintenue en position à l'aide de deux clapets.

Figure 6 : Fixation de l'échantillon sur le porte-échantillon

2) Le microscope optique

Un microscope optique d'observation, à immersion, muni de trois objectifs différents (X10-X32-X100), permet d'adapter la vision de l'échantillon à sa nature. Le point d'impact (diamètre de 1 à 5 μm) du faisceau laser est concrétisé par le point rouge d'un laser pilote Hélium-Néon de faible puissance colinéairement aligné sur le laser de puissance. Ce laser Hélium-Néon permet également de visualiser le degré de focalisation du laser ionisant. Celui-ci est dirigé sur l'échantillon à travers un système optique intermédiaire comprenant essentiellement une lentille achromatique et un trou circulaire ("pin hole") d'un diamètre de 70 μm . L'endroit exact d'analyse sur l'échantillon est choisi en agissant sur des vis micrométriques selon des axes X et Y. Pour passer de l'observation à l'analyse, le condensateur de lumière est remplacé par la lentille extractrice par un asservissement électropneumatique.

3) Le laser de puissance

Le laser de puissance est un laser accordable en fréquence (41). Il délivre une impulsion de 10 nanosecondes, qui induit la formation d'un microplasma par élévation brutale de la température (plusieurs milliers de degrés). Ce microplasma contient des fragments neutres, des ions atomiques et moléculaires représentatifs de l'échantillon.

L'harmonique 532 nm du laser Nd-Yag pompe le laser à colorant. Le colorant (*Rhodamine 590 (Excitron)*) lase alors entre 565 nm et 604 nm. Le doublage et/ou le mixage de ce faisceau laser résultant avec le laser Nd-YAG permet d'accéder à une gamme étendue de longueurs

d'onde. Le tableau III rassemble ces diverses possibilités.

Les courbes, présentées sur la figure 7, illustrent la possibilité d'accéder à d'autres gammes de longueurs d'onde par changement du colorant.

	Laser à colorant Rhodamine 590	Laser Nd-YAG	Plage longueur d'onde	Longueur d'onde utilisée (*)
Doublage de fréquence	282,5-302 nm	-	282,5-302 nm	286,5 nm
Mixage Visible/IR	Visible 565-604 nm	Infra-Rouge 1064 nm	369-385 nm	(372,4 nm)
Mixage Uv/IR	Harmonique doublée 282,5-302 nm	Infra-Rouge 1064 nm	223,2-235 nm	225,7 nm
Quadruplage de fréquence	-	quadruplé 266 nm	266 nm	266 nm

Tableau III : Longueurs d'onde accessibles par couplage du laser à colorant (Rhodamine 590) avec un laser Nd-YAG.

(*) la Rhodamine émet avec une énergie maximale à 573 nm

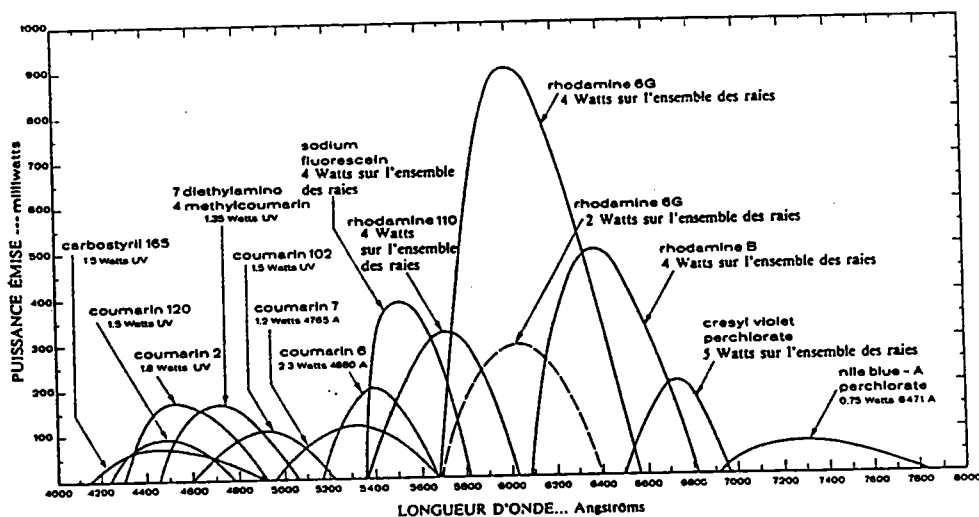


Figure 7 : Courbes d'émission des différents colorants utilisés pour les lasers (42) - Les valeurs typiques de pompage (par un laser à argon ionisé) nécessaires sont indiquées.

Remarque : le mixage de deux faisceaux de longueurs d'onde λ_1 et λ_2 donne naissance à un faisceau de longueur d'onde $\lambda_{mixé}$:

$$1/\lambda_{mixé} = 1/\lambda_1 + 1/\lambda_2$$

4) Le spectromètre à temps de vol

Le principe du spectromètre à temps de vol (Time-Of-Flight) est illustré par la figure 8. Les ions générés lors de l'irradiation laser sont extraits par la lentille extractrice et transférés dans le tube. Ils sont accélérés grâce à la différence de potentiel entre le porte-échantillon (terre) et l'électrode d'accélération (± 3 kV). Le signe de ces potentiels détermine l'extraction des ions positifs ou négatifs.

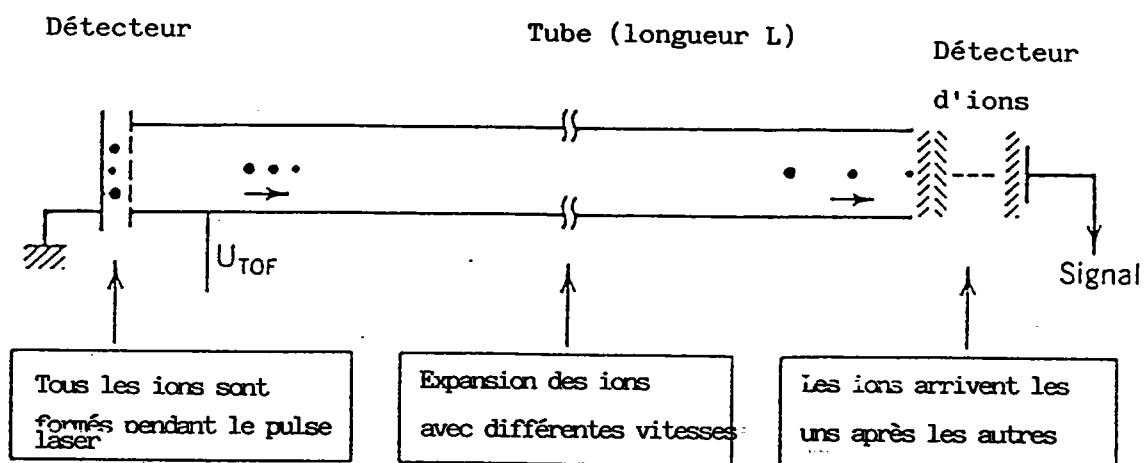


Figure 8 : Principe d'un spectromètre de masse à temps de vol.

Un flux d'ions est accéléré et projeté dans le tube jusqu'au détecteur. Le temps de vol de chaque ion est une fonction de sa masse. Le spectre de masse est obtenu en reliant les courants du détecteur en fonction du temps.

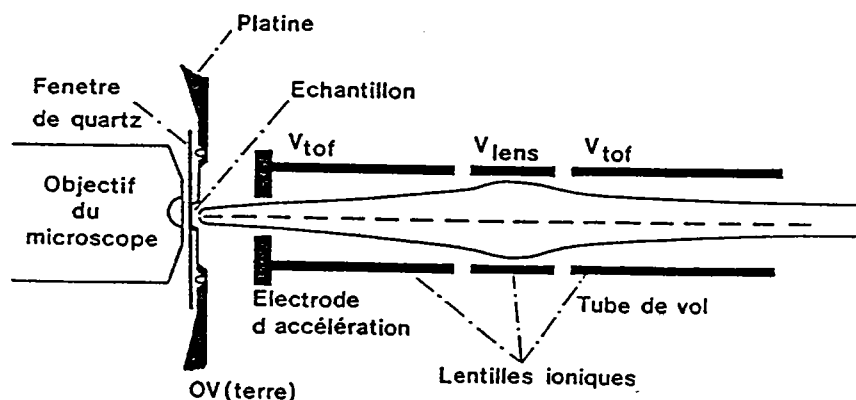


Figure 9 : Diagramme schématisé de la source ionique et de la géométrie des lentilles ioniques de la microsonde LAMMA 500 montrant le parcours des ions.

Pour ajuster les trajectoires des ions et produire un courant d'ions parallèles à l'axe du spectromètre, un potentiel intermédiaire (U_{lens}) inférieur aux deux autres est appliqué (figure 10).

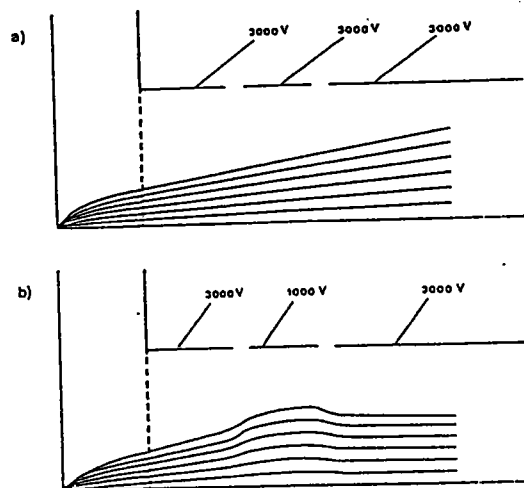


Figure 10 : Parcours des ions dans la chambre d'échantillonnage a) sans et b) avec le système optique ionique.

Le principe du spectromètre à temps de vol est basé sur l'accélération d'un ion (de masse m et de charge ze dans un fort champ électrique (V_{ACC} , classiquement 3 kV)). Comme l'énergie cinétique impartie est constante, la vitesse v d'une espèce individuelle dépend du ration m/z :

$$ze \cdot V_{\text{ACC}} = \frac{1}{2} mv^2$$

Les ions parcourent la distance totale L du tube pendant le temps t à leur vitesse initiale propre.

$$q \cdot V_{\text{ACC}} = \frac{1}{2} mv^2 = \frac{1}{2} m L^2 T^{-2}$$

V_{ACC} : potentiel d'accélération
 $v = L/T$ (v : sa vitesse et T : son temps de vol)
 $q = Z \cdot e$ (z : charge de l'ion et $e = 1,6 \cdot 10^{-19} \text{C}$)

L : longueur du tube (1,8 mètres)
 m : sa masse

Le temps de vol de l'ion est directement proportionnel à la racine carrée du rapport m/z (et donc de sa masse dans le cas d'un ion monochargé).

$$t = k \cdot \sqrt{\frac{m}{z}}$$

Le réflecteur permet de compenser les différences d'énergies cinétiques pour des ions de même masse (figure 11).

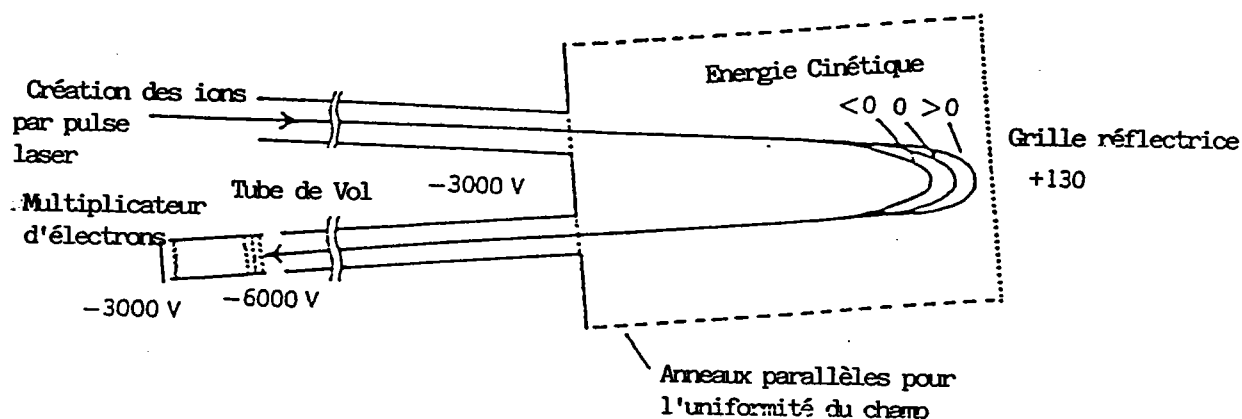


Figure 11 : Représentation schématique de l'effet du réflecteur d'ions utilisé dans la microsonde LAMMA 500.

5) Le détecteur

Le détecteur placé en fin de parcours est un multiplicateur d'électrons à 17 dynodes en alliage Cuivre-Béryllium. Le potentiel appliqué au collecteur d'ions (± 6 kV) assure la réduction des effets de discrimination de masse lors de la conversion ion-électron. Chaque rafale d'ions de même masse déclenche un signal électrique. Un gain de 10^6 est obtenu. L'enregistreur transitoire rapide (Transient Recorder [TR] de marque Biomatron de taille mémoire 2K) échantillonne alors le spectre de masse à une fréquence au maximum de 100 MHz (soit, au

mieux, un point toutes les 10 nanosecondes). Il le numérise en unité égale à $U/2^n$ (U étant la tension d'entrée et n le nombre de bits). A présent, la microsonde LAMMA est interfacée avec un autre enregistreur transitoire rapide plus performant : l'oscilloscope digital NICOLET 4994 C (200 MHz, mémoire 16K).

Les spectres sont constitués de l'enregistrement temporel des différents temps de vol des ions. Les données sont acquises sous forme d'un diagramme en bâtons : représentation discontinue d'une fonction discontinue. Le spectre est visualisé sur l'écran de l'oscilloscope et peut être directement sorti sur papier. L'oscilloscope NICOLET est lui-même interfacé avec un ordinateur MacIntosh. Des logiciels permettent de traiter ainsi les données brutes : inversion, linéarisation et calibration des spectres de masses, sortie papier.

C - PERFORMANCES ET LIMITES DU LAMMA

1) Plage de masse

En principe, avec un spectromètre de masse à temps de vol, la plage de masse n'est pas limitée : le tube permet la transmission de tous les ions indépendamment de leurs masses. Effectivement, Seydel et Lindner ont pu détecter des masses à 2000 uma (12). Toutefois, de tels pics à des masses adjacentes ne peuvent être séparés. En conséquence, la plage de masse est en pratique limitée par la résolution de masse et/ou les caractéristiques du transient recorder (TR). Le réflecteur améliore les résultats par rapport aux TOF linéaires, mais les ions de masse moléculaire élevée n'arrivent pas avec assez d'énergie jusqu'au détecteur. Hillenkamp et son équipe ont trouvé une

parade en appliquant au détecteur des potentiels de 20 kV (43). Ils ont pu ainsi obtenir les ions M^+ , $2M^+$, $3M^+$,... de molécules organiques de très hauts poids moléculaires.

Le zéro de l'échelle des masses correspond à l'instant t_0 où est déclenchée l'impulsion laser. Après amplification, le signal électrique délivré par le détecteur est converti en signal analogique-digital (a.d.c.). La plage dynamique est de 8 bits. Les signaux digitaux sont stockés par l'analyseur multicanal rapide (2048 canaux). Avec le temps d'échantillonnage de 10 nanosecondes, le temps de vol maximum enregistré est d'environ 20 microsecondes, ce qui correspond à une plage de masse de 0 à 24 uma. La plage de masse peut être étendue en utilisant des temps d'échantillonnage plus grands (un point noté toutes les 20 ou 50 nanosecondes) ou en introduisant un retard entre le moment où est déclenché le laser et le moment x où l'on commence à enregistrer les signaux arrivant sur le détecteur (tableau IV). Dans ce dernier cas, seuls les signaux des ions correspondant à la plage intéressante sont enregistrés :

temps total = retard + temps de vol de l'ion

$$t_{\text{total}} = t_{\text{retard}} + k \cdot (m/z)^{1/2}$$

$$t_{\text{total}} = C_1 + C_2 \sqrt{m}$$

GAMME de MASSES	TEMPS D'ECHANTILLONNAGE (ns)			
	RETARD (μ s)	10	20	50
0		0 - 24	0 - 100	0 - 600
2		22 - 95	100 - 400	600 - 2300
4		95 - 220	400 - 1000	2300 - 5400
6		220 - 380	900 - 1600	5400 - 9600

Tableau IV : Gammes de masses (uma) accessibles sur la microsonde LAMMA avec le transient recorder BIOMATON en fonction du retard et du temps d'échantillonnage (dans les conditions standard d'utilisation).

La calibration des spectres de masse reste un souci permanent. Il faut déterminer les valeurs des constantes C_1 et C_2 de façon certaine car la moindre erreur provoque des décalages très importants.

2) La Résolution de Masse

Elle est définie, en spectrométrie de masse, par le rapport de l'intervalle de temps Δt entre deux masses adjacentes sur la largeur du signal ∂t :

$$R = \frac{\Delta t}{\partial t}$$

On sait que :

$$\Delta t = \left(\frac{dt}{dm} \right) \Delta m$$

$$t = k \cdot \sqrt{\frac{m}{z}}$$

donc :

$$\Delta t = \frac{1}{2} \left(\frac{k}{\sqrt{z}} \right) \left(\frac{\Delta m}{\sqrt{m}} \right)$$

Pour la largeur du pic ∂t , deux paramètres sont à considérer :

- la largeur de bande limite du système de détection
- la plage des énergies cinétiques initiales

$$\text{ainsi } \partial t = (C_A^2 + dE_0^2)^{1/2}$$

avec C_A : largeur minimum de pic donnée par le système de détection

dE_0 : élargissement du pic du fait de l'énergie initiale

La résolution de l'appareil dépend de l'énergie initiale des ions formés. Grâce au réflecteur d'ions, qui permet de s'affranchir de la distribution énergétique des ions (au premier ordre), les résolutions

sont comprises entre 600 et 800. Les isotopes stables de tous les éléments du tableau périodique peuvent être séparés. L'énergie cinétique initiale E_0 est compensée par le réflecteur : $dE_0=0$, aussi peut-on écrire l'égalité suivante : $\partial t = C_A$

$$R = \frac{\Delta t}{\partial t} = \frac{k}{2\sqrt{z}} \frac{1}{C_A} \left(\frac{\Delta m}{\sqrt{m}} \right)$$

Remarque : Des masses supérieures à 10 000 amu ont été atteintes avec une résolution égale à 10 000 à la masse 106 sur le spectromètre de masse TOF-1 fabriqué par la société Brücker. Il est équipé d'un nouveau réflecteur permettant d'améliorer de façon considérable les performances des temps-de-vol (44,45). Ces résultats sont extrêmement encourageants pour l'avenir des spectromètres de masse à temps de vol car ils supprimeront une des limitations principales des TOF.

3) Limites de l'enregistreur transitoire rapide BIOMATON

Les expériences rapportées dans ce mémoire ont été essentiellement effectuées sur la microsonde LAMMA 500 équipée de l'enregistreur transitoire BIOMATON qui offre beaucoup moins de possibilités que le nouvel appareil NICOLET 4994 C. Les limites du BIOMATON, avec lesquelles nous avons travaillé, sont données dans ce paragraphe.

* La fréquence d'échantillonnage du signal est de 100 MHz. En supposant qu'un pic soit bien défini par 10 points, cela impose une largeur de pic au moins égale à 100 ns. Cette condition peut être respectée sans problème pour les basses masses, alors qu'en hautes masses, l'échelle

des temps étant en racine carrée de la masse, les ions arrivent sur le détecteur avec des intervalles de temps beaucoup trop courts pour pouvoir être séparés.

* La taille mémoire (2K) permet de couvrir seulement une partie du spectre total. Ce dernier peut être recomposé en recollant les spectres fractionnés, obtenus à chaque fois avec un nouvel impact laser...

4) Etablissement de l'échelle des masses avec le TOF

Le temps de vol d'un ion est :

$$t = k \cdot \sqrt{\frac{m}{z}}$$

Aussi, quelle que soit la manière d'obtenir le spectre (sur papier ou sur ordinateur), l'exploitation des spectres passe nécessairement par la calibration du spectre. Sur spectre "brut" édité sur papier, la lecture des masses se fait grâce à une règle, fabriquée au laboratoire, graduée en racine carrée de la masse. Cette règle n'est utilisable que pour les valeurs standard des potentiels. Si l'un des potentiels d'extraction des ions est modifié par rapport à ces normes, il est nécessaire de recalculer les constantes...Le logiciel utilisé sur l'ordinateur MacIntosh fait ces calculs avec deux masses de référence précisées par l'utilisateur. Ces calculs sont détaillés en annexe.

D - CONCLUSIONS

Les différents avantages et inconvénients de cette technique peuvent être résumés ainsi :

- Les analyses sont extrêmement rapides ; le changement d'échantillons est très facile.
- L'analyse en ions positifs ou négatifs se fait par simple inversion des signes des potentiels appliqués. La grande qualité de cet appareil est de posséder une excellente **résolution spectrale** en basses masses : les isotopes de tous les éléments stables du tableau périodique peuvent être séparés. Sa **résolution spatiale** est également un atout (1 à 5 μm). Sa configuration en transmission est idéale pour l'analyse des coupes histologiques.

Les principaux inconvénients sont que le spectromètre de masse LAMMA 500 est un appareil d'analyse destructive et que les très hautes masses ne sont pas accessibles sur l'appareil non modifié.

Chapitre II

LA TECHNIQUE FT-ICR-MS

A - GENERALITES

Les premiers appareils basés sur le principe de la Résonance Cyclotronique des Ions (Ion Cyclotronique Resonance ICR) ont été lancés dès 1965. Ils sont longtemps restés au stade du laboratoire (46) et ont pris énormément d'essor avec l'utilisation de la transformée de fourier.

Le marché de la spectrométrie de masse à transformée de fourier est couvert par les sociétés Extrel (ex-Nicolet S.M.) et Bruker.

- Bruker commercialise le spectromètre de masse à transformée de fourier CMS 47X qui combine l'analyse des données par transformée de fourier à l'utilisation d'un élément supraconducteur. Les ions sont générés à l'extérieur de la cellule de détection.

- Nicolet a développé une gamme de spectromètres de masse : FTMS 1000 et 2000 qui allient les techniques modernes de résonance cyclotronique des ions au traitement des données par transformée de fourier. Il existe à l'heure actuelle deux FTMS 2000 en Europe. En France, notre laboratoire messin de spectrométrie de masse et chimie laser est doté de l'un de ces spectromètres de masse plus correctement nommés "à résonance cyclotronique des ions et à transformée de fourier" (FT-ICR-MS). En Grande-Bretagne, la société British Petroleum possède également un appareil. Aux Etats-Unis, il en existe actuellement une vingtaine.

Les développements technologiques de plus en plus performants dans les différents domaines concernés comme les aimants supraconducteurs, la microélectronique, l'informatique et l'ultravide rendent ces spectromètres tout à fait compétitifs vis à vis des spectromètres dits conventionnels.

B - LE PRINCIPE DE LA RESONANCE CYCLOTRONIQUE DES IONS

La spectrométrie de masse par résonance cyclotronique des ions (ICR) utilise la propriété suivante : un ion placé dans un champ magnétique uniforme adopte une trajectoire hélicoïdale. La projection de ce mouvement dans un plan perpendiculaire aux lignes du champ B est un mouvement circulaire uniforme. Si aucune énergie n'est acquise ou perdue par cet ion, la force exercée sur lui par le champ magnétique est compensée par la force centrifuge de son mouvement (47) :

$$mv^2/r = Bev$$

avec m : masse (en Kg)
 e : charge de l'ion (en C)
 v : vitesse (en m/s)
 B : valeur du champ magnétique (en T)
 r : rayon de l'orbite de l'ion (en m)

On obtient les relations suivantes :

$$w_c = v/r = eB/m \quad w_c : \text{vitesse angulaire en rad/s}$$

$$F = w_c / 2\pi \quad F : \text{fréquence naturelle cyclotronique (en Hertz) de l'ion de masse m}$$

En pratique, la masse (en uma) d'un ion donné chargé une fois est inversement proportionnelle à sa fréquence cyclotronique :

$$m = 1,5357 \cdot 10^7 \cdot \frac{B}{F}$$

La technique de spectroscopie à résonance cyclotronique ionique (ICR) a pour objet la génération des ions dans des conditions de champ magnétique homogène et la détermination du spectre de masse sous la forme de spectre de fréquences cyclotroniques.

C - LA MICROSONDE FTMS 2000

1) Principe

Les ions créés sont exposés au champ magnétique intense du solénoïde supraconducteur et piégés dans la cellule conçue spécialement et placée dans des conditions de vide très poussé. Ils sont détectés ensuite en appliquant un balayage de fréquences qui induit un mouvement cyclotronique cohérent.

L'appareil de l'Université de Metz a subi de nombreuses transformations dans le cadre d'un contrat ANVAR donnant lieu au dépôt de brevets français (48), qui permettent de travailler soit classiquement en impact électronique, soit en microsonde à impact laser. Une description de l'appareil plus détaillée a été publiée (49). Dans la suite du texte, nous nous intéresserons particulièrement à l'analyse des solides par impact laser et donc au FTMS en configuration microsonde. Les optiques qui conduisent le faisceau laser sont calculées pour obtenir la focalisation sur la cible. Le diamètre du spot laser est d'environ 20 μm . L'irradiance peut alors atteindre environ $10^{10}\text{W}/\text{cm}^2$. Le système de visualisation utilise une optique de Cassegrain inversée qui permet d'atteindre un grossissement de 60 à 240 fois. La surface complète de l'échantillon peut être analysée grâce à un micromanipulateur.

2) Description

Le schéma général de la microsonde FTMS est présenté figure 12. Les différents éléments de l'appareil sont détaillés dans la suite du paragraphe.

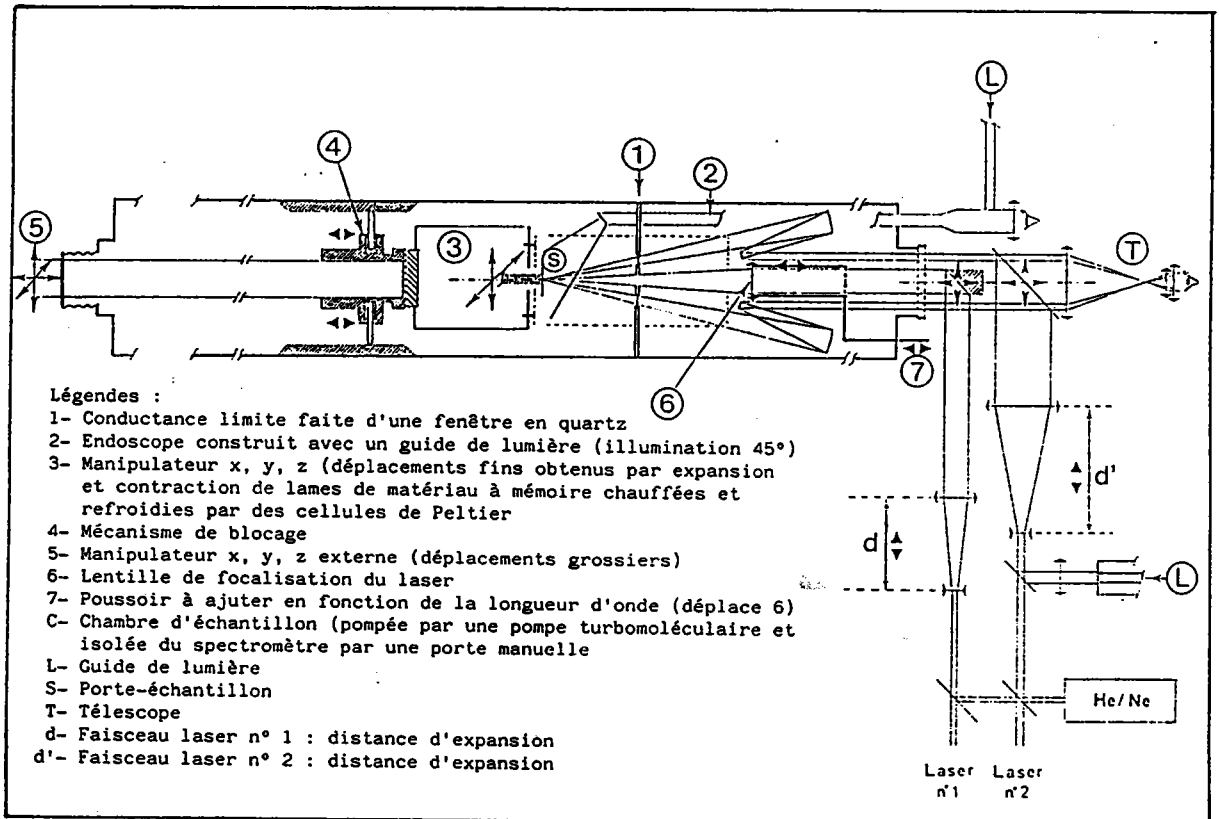


Figure 12 : Schéma descriptif de la microsonde FTMS 2000

a - Le champ magnétique

La double cellule "source-analyse", située dans la chambre sous vide (10^{-8} - 10^{-9} torrs), est placée entre les deux pôles d'un aimant supraconducteur. Celui-ci, maintenu à 4 Kelvins par deux enceintes cryogéniques contenant la première de l'hélium liquide, la seconde de l'azote liquide, permet d'obtenir un champ magnétique uniforme de 3,18 teslas.

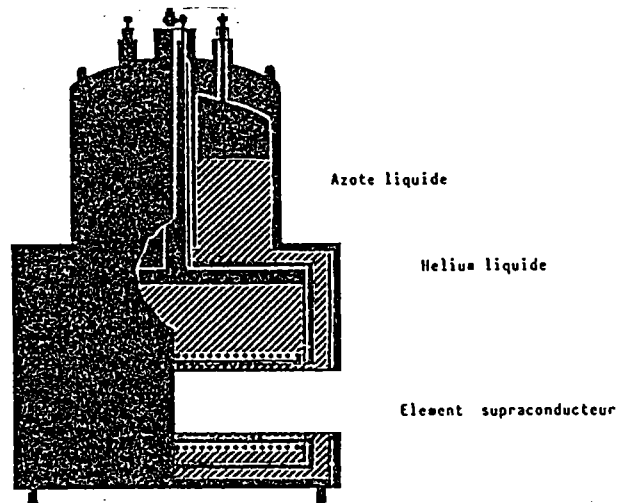


Figure 13 : Elément supraconducteur du FTMS

b - La cellule

La cellule est constituée en réalité de deux parties : une cellule *source* et une cellule *analyse*. Elles sont séparées par une plaque de "conductance limite" spéciale, permettant de maintenir un vide différentiel entre celles-ci et le passage des faisceaux optiques (laser et visualisation de l'échantillon). Ces deux régions indépendantes ont chacune leur propre système de pompage. La pression côté source est obligatoirement plus élevée.

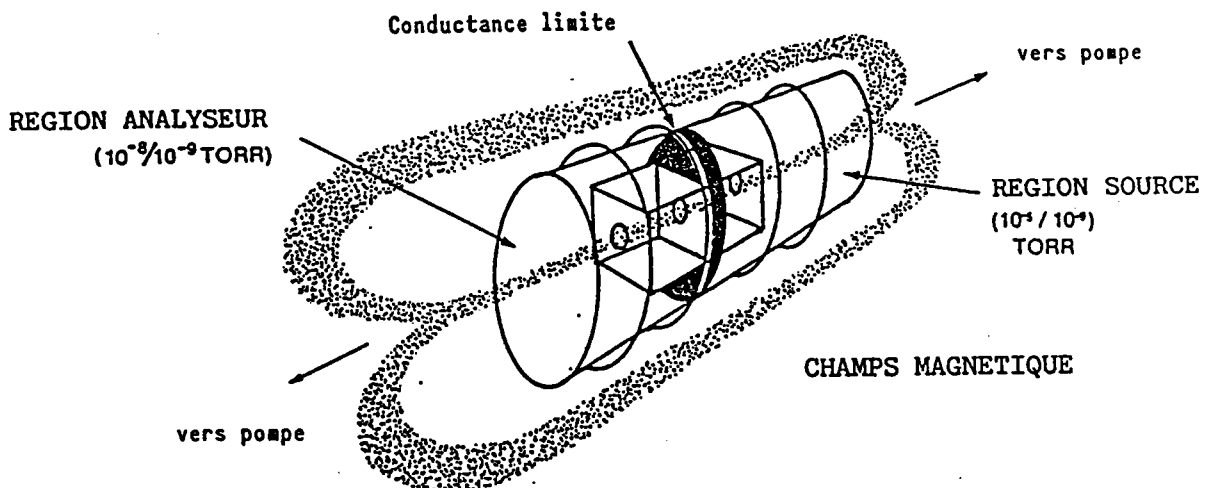


Figure 14 : Schéma de principe de la cellule du FTMS

La cellule est en réalité un parallépipède rectangle délimité par trois paires de plaques isolées électriquement les unes des autres et montées ensemble (figure 15).

Chaque paire a une fonction particulière :

- piègeage des ions, par application d'un potentiel
- excitation des ions par transmission d'une radiofréquence
- réception des courants images.

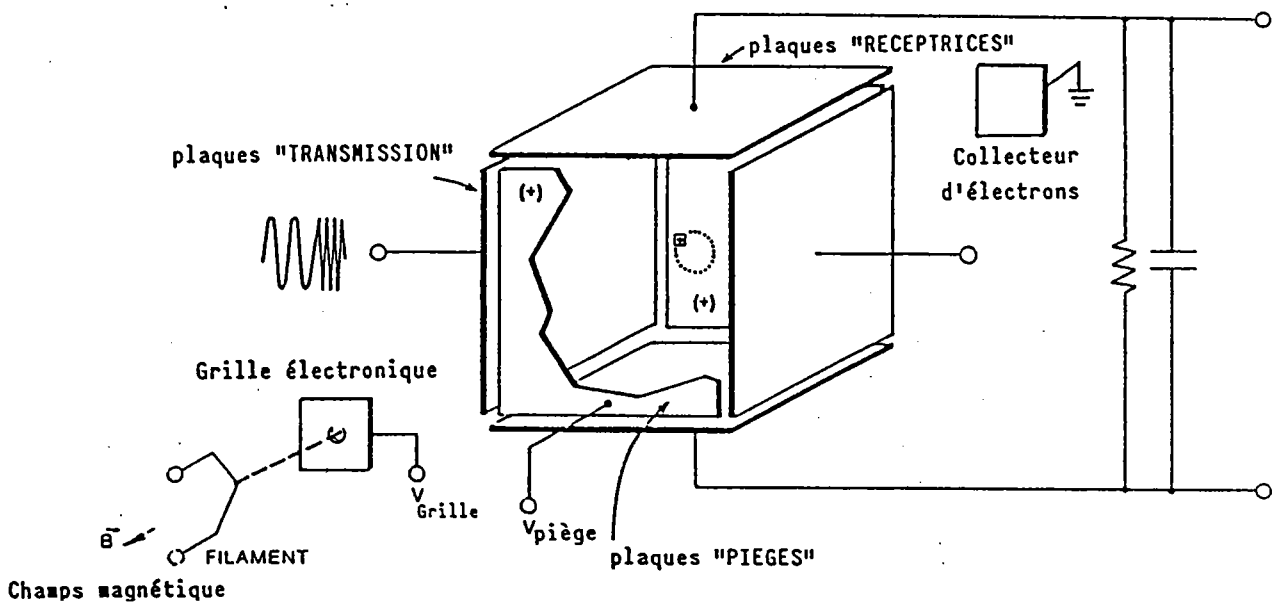


Figure 15 : Schéma descriptif de la cellule du FTMS

c - Séquence expérimentale

Les évènements suivants surviennent pendant la séquence expérimentale (voir figure 16) :

Dans un premier temps, la cellule est purgée de tous les ions résiduels qu'elle pourrait contenir en appliquant un potentiel. Ensuite, les ions sont formés par l'irradiation laser dans la cellule source (BEAM).

Pendant cet évènement, la conductance limite est soit maintenue à la même valeur que le potentiel de piégeage (V_{trap}) afin de confiner les ions du côté source de la cellule, soit au contraire mise à la masse pour que les ions soient transférés immédiatement du côté analyse.

Une période d'attente variable (DL3) suit pendant laquelle les réactions ion-molécule peuvent survenir. En même temps, des balayages de fréquence particuliers permettent d'éjecter des ions majoritaires gênants afin d'augmenter les signaux d'ions minoritaires (EJT1 et 2).

Les ions sont excités par le balayage de fréquence (ITX) puis détectés (TRX), amplifiés, digitalisés. Pour finir, ils subissent la transformée de fourier pour produire le spectre de masse.

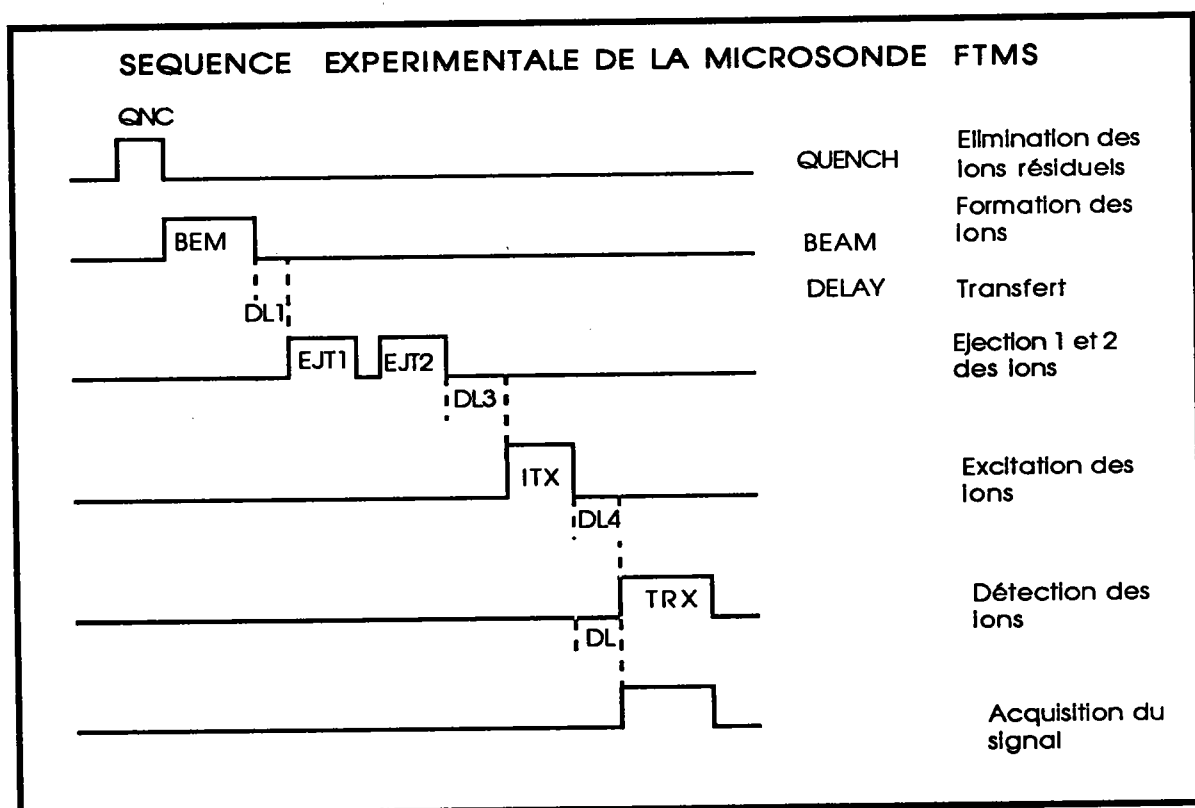


Figure 16 : Séquence expérimentale

Les principales étapes de la séquence d'analyse sont expliquées dans la suite du paragraphe.

i) Création des ions

Les ions sont créés dans la région source lors de l'interaction laser-matière. Par un choix judicieux de la valeur de la conductance limite, les ions peuvent être confinés dans la région source ou passer dans la région analyse.

ii) Piégeage des ions

Pour éviter la fuite des particules chargées le long des lignes de champ magnétique, un potentiel ($V_{\text{trapping}} [V_{\text{Tr}}] = V_{\text{piège}}$) est appliqué aux deux plaques perpendiculaires au champ. La particule, ainsi piégée dans un puits de potentiel, adopte un mouvement de va et vient. Ce type de piégeage permet la conservation des ions pendant les quelques fractions de secondes nécessaires à l'établissement des équilibres thermiques ou chimiques entre les ions et les molécules.

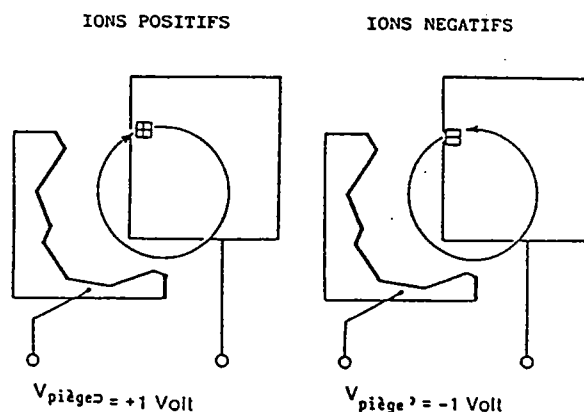


Figure 17 : Principe du piègeage des ions dans la cellule

iii) Excitation et détection des ions

En ICR, le phénomène d'absorption d'énergie par les ions est à la base de la détection et des expériences de double résonance. L'absorption d'énergie cinétique se fait sur le mouvement cyclotronique en excitant l'espèce ionique par une source extérieure.

En ICR conventionnel, la détection se fait à l'aide d'un oscillateur travaillant à fréquence fixe w_d et en mesurant la puissance absorbée par les ions lorsque la fréquence cyclotronique de ces derniers w_c est égale à w_d . La mesure d'un spectre de masse nécessite donc le balayage du champ magnétique afin que chaque espèce ionique entre à tour de rôle en **résonance** avec l'oscillateur de détection. Pour des raisons pratiques (bruits électriques), les zones de formation et de détection des ions sont séparées spatialement : le transit d'une zone à l'autre est assuré par l'établissement d'un champ électrique perpendiculaire à B qui confère aux ions un mouvement cycloïdal.

En FTMS, une seule cellule est utilisée. La séparation entre les opérations d'ionisation, d'excitation et de détection est faite temporellement. L'absorption d'énergie a lieu durant la période d'excitation. L'analyse des ions du mélange gazeux dans la cellule est obtenue en appliquant un champ alternatif de radiofréquences perpendiculaires au champ magnétique. Lorsque la fréquence appliquée est égale à la fréquence naturelle cyclotronique des particules chargées de masse m , il y a **RESONANCE**. Les particules absorbent donc de l'énergie et le rayon de leur orbite augmente.

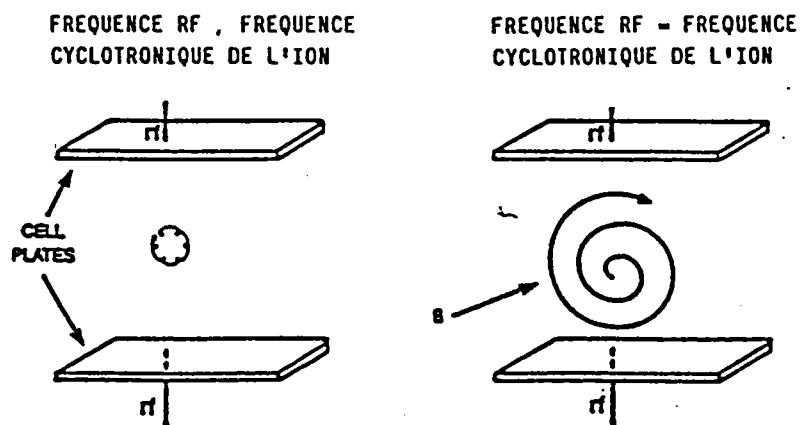


Figure 18 : Excitation des ions par application de radiofréquences

A l'arrêt de la radiofréquence d'excitation, le signal produit par l'ensemble des ions excités est recueilli : il s'agit de la période d'écoute. La détection est basée sur le phénomène de courant image : les ions animés de mouvements cyclotroniques induisent de petits courants alternatifs dans le circuit constitué par les deux plaques réceptrices reliées à une résistance et une capacité.

Les courants-images induits donnent naissance, à travers la résistance, à des voltages alternatifs de même fréquence que les ions excités. Ces signaux sont une superposition de courants oscillants. L'opération de transformée de fourier transforme la fonction temporelle en fonction de fréquence. Le spectre de fréquence est traduit en spectre de masse par une table de conversion. Ce type d'analyse est appelé **mode direct ou large bande**. L'addition et la soustraction d'un signal sinusoïdal de référence avec une fréquence proche de la résonance de la plage de masse étudiée ainsi que le filtrage des autres fréquences donnent un interférogramme de basses fréquences qui, après transformation de Fourier, fournit un spectre de masse de meilleure résolution que dans le mode direct. Il s'agit du **mode hétérodyne** (figure 19).

A mesure que l'énergie cinétique stockée par les ions se dissipe principalement par collision avec les molécules neutres présentes, le signal s'affaiblit : c'est la **relaxation**.

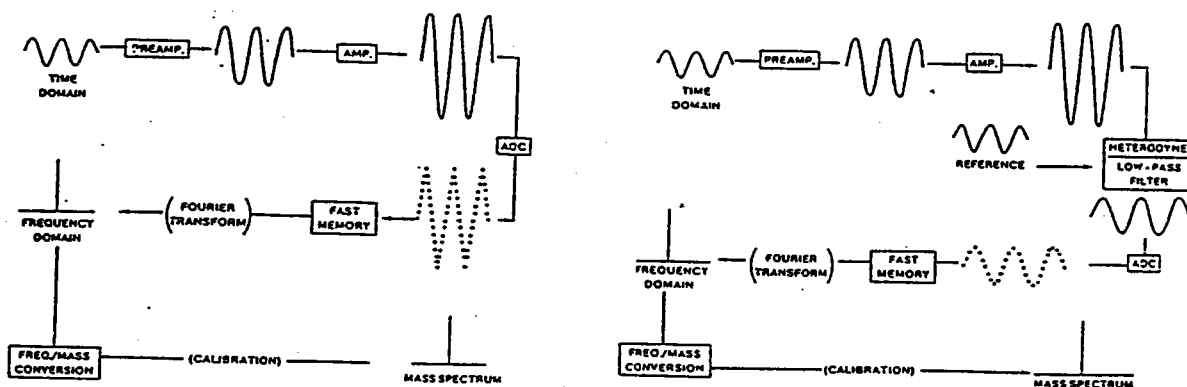


Figure 19 : Modes direct et hétérodyne

iv) Acquisition du signal et traitement

Le signal induit par le déplacement d'une particule chargée à proximité d'un conducteur plan dépend de la projection de sa vitesse sur la perpendiculaire au plan défini par le conducteur. La présence d'un champ magnétique parallèle au plan du conducteur impose un mouvement circulaire uniforme (cyclotronique) dont la fréquence se retrouve dans le signal sinusoïdal induit par la particule.

De cette manière, chacun des ions formés dans une cellule ICR constituée de plaques conductrices contribue à générer un signal complexe. Pour extraire une information par l'analyse spectrale de ce signal, il est nécessaire de forcer les ions à se mouvoir avec une certaine cohérence. Cette cohérence est obtenue par résonance, en soumettant les ions à un champ électrique alternatif de fréquence égale à celle du mouvement cyclotronique. Dans la séquence des impulsions définissant les événements permettant une mesure, on distingue l'impulsion d'excitation qui précède directement l'impulsion associée à la période de détection.

Jusqu'au moment de l'excitation, le mouvement des ions est aléatoire et aucun signal ne résulte de leur interaction avec les plaques détectrices de la cellule. Une brève période d'interaction avec un champ électrique est suffisante pour obtenir la cohérence nécessaire à la détection d'un signal, en mettant en jeu, une puissance nettement inférieure à celle conduisant à l'éjection des ions.

Au moment de l'excitation, les plaques émettrices de la cellule sont soumises à une tension alternative soit de fréquence fixe, soit dont la fréquence varie linéairement avec le temps. Dans le premier cas, le processus d'excitation n'affecte que les ions dont la fréquence se situe dans une bande étroite autour de la fréquence du signal appliqué sur la cellule. Cette bande est définie par le spectre de puissance du signal d'excitation, sa largeur étant inversement

proportionnelle à la durée d'excitation. Dans le deuxième cas, les bornes sont fixées pour couvrir le domaine de fréquence correspondant au spectre à mesurer. La vitesse de balayage est généralement choisie pour que la durée de l'excitation soit négligeable par rapport à la constante de temps du signal induit par les ions. Cette condition est nécessaire pour permettre la détection simultanée de tous les ions excités.

Le processus d'acquisition est défini par deux paramètres :

- la fréquence d'échantillonnage
- le nombre de points, dont le maximum est déterminé par la taille de la mémoire.

Ces paramètres sont choisis en respectant le théorème d'échantillonnage et pour obtenir la résolution souhaitée. La résolution est directement proportionnelle à la constante de temps du signal induit par les ions et il est admis que les conditions expérimentales (en particulier la pression) sont optimisées pour garantir la persistance et la stabilité du signal nécessaire à l'obtention d'un bon résultat. Ces conditions étant remplies, c'est la durée de l'acquisition et par conséquent le nombre de points qui déterminent la résolution finalement obtenue.

Selon le théorème d'échantillonnage, le signal doit être digitalisé avec une fréquence supérieure à deux fois la fréquence la plus élevée présente dans le signal : $f_{\text{échant}} \geq 2 f_{\text{max}}$.

Par un artifice consistant à multiplier le signal par une référence de fréquence fixe et à extraire la composante basse fréquence avec un filtre passe-bas, il est possible de s'en tenir à une version moins restrictive du théorème d'échantillonnage.

Le traitement du signal par la transformée de Fourier permet de passer d'un signal mesuré en temps en sa représentation dans le domaine de fréquences. Le signal digitalisé est alors caractérisé par sa

largeur spectrale (égale à $f_{\text{échant}}/2$) et le nombre total des points N. Ces deux paramètres définissent la résolution digitale qui caractérise la finesse de la représentation discrète du spectre.

3) Paramètres analytiques importants

* Le laser de puissance

L'ionisation est réalisée grâce à un laser excimère. Les longueurs d'onde accessibles sont 193 ou 249 nm en fonction du mélange gazeux réalisé (ArF et KrF respectivement).

* La pression à l'intérieur de la cellule

La résolution spectrale est proportionnelle à la durée d'acquisition du signal. Celle-ci sera d'autant plus élevée que la pression à l'intérieur de la cellule sera plus basse (environ 10^{-9} torr). Une basse pression réduit le nombre de collision χ des ions par unité de temps et augmente de ce fait leur durée de vie :

$$\frac{m}{\Delta m^{1/2}} = \frac{\omega}{2\chi} = \frac{qB}{2\chi m}$$

La résolution est également inversement proportionnelle à la masse. Cependant, en mode hétérodyne une résolution voisine de 100 000 a pu être atteinte pour le pic moléculaire de la gramicidine.

* Le nombre de points d'acquisition du signal

* La vitesse de balayage de la radio-fréquence excitatrice et son amplitude

* Le temps de détection et son niveau d'amplification

D - AVANTAGES ET LIMITES DU FTMS

L'introduction d'échantillons dans la cellule a toujours pour effet d'augmenter la pression. Cette limitation est compensée par la double cellule dont est équipée notre microsonde FTMS. La plaque percée d'un trou sépare le côté analyse du côté source. Ainsi les ions créés dans la cellule source où règne une pression de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-8} torr peuvent être transférés dans la cellule analyse (pression de 10^{-8} à 10^{-9} torr).

Outre la possibilité de coupler de multiples sources d'ions, la FTMS offre de nombreuses possibilités : l'ionisation chimique, la self-ionisation chimique par augmentation du temps entre l'ionisation et l'excitation/détection, l'étude des réactions ions-molécules, l'isolement d'un ion par éjection de tous les autres puis son excitation résonante afin d'activer ses collisions avec un autre gaz. L'identification des ions fragments constitue un procédé élégant de MS/MS.

La détection des ions positifs ou négatifs est possible simplement en changeant la polarité des potentiels appliqués aux plaques de la cellule.

PARTIE III

Rappel sur les TECHNIQUES DE DESORPTION

Introduction

A - FDMS

B - SIMS et FAB

C - PDMS

D - Electrospray et Thermospray

E - LD

INTRODUCTION

L'analyse par spectrométrie de masse des solides organiques est en plein développement, en particulier avec la détermination de la masse de composés de poids moléculaires de plus en plus élevés pouvant dépasser les 100 000 uma. Les techniques mises en oeuvre pour désorber les solides sont des méthodes d'ionisation douce, que l'on distingue des autres techniques plus conventionnelles comme l'impact électronique, par leur capacité à produire un nombre significatif d'ions moléculaires à partir de molécules normalement considérées comme insuffisamment volatiles pour la spectrométrie de masse.

Différents modes de désorption permettent d'extraire, par un flux de particules, des molécules et des ions individualisés à partir d'un composé solide ("sputtering") :

- le bombardement par des ions atomiques ou des neutres de faibles énergies de l'ordre de 10 Kev (Cs^+ , Xe^+ ,...).
- le bombardement par des ions de grandes énergies de l'ordre du MeV (produit de fission du californium, faisceau d'accélérateur)
- beaucoup plus récemment, le bombardement par des agrégats d'atomes de poids élevés, supérieurs à 1000 uma (agrégats de CsI ou d'Au)
- et enfin l'utilisation des lasers à des puissances et longueurs d'onde variables.

L'ionisation est un phénomène qui peut être favorisé par l'addition de substances judicieusement choisies appelées matrices.

Les techniques de spectrométrie de masse qui sont associées à ces modes de désorption des solides sont les suivantes :

- *la spectrométrie de masse par désorption de champ*

FDMS : Field Desorption Mass Spectrometry

- *la spectrométrie de masse par bombardement de particules*

SIMS : Secondary Ion Mass Spectrometry

FAB : Fast Atom Bombardment

- *la spectrométrie de masse induite par l'ion Californium*

²⁵²Cf-PDMS : Plasma Desorption Mass Spectrometry

- *la spectrométrie de masse par désorption laser*

LDMS : Laser Desorption Mass Spectrometry

Nous développons succinctement ces différentes techniques d'ionisation douce, exception faite de la désorption laser qui nous intéresse plus particulièrement.

A - FDMS (Field Desorption Mass Spectrometry)

Une des premières techniques d'ionisation douce a été la désorption de champ : en 1969, H.D. Beckey utilise cette technique dans le but d'éviter d'introduire des molécules organiques de haut poids moléculaire dans la phase gazeuse avant leur ionisation (50). L'échantillon mis en solution est déposé sur une anode chauffée (en tungstène, en silicium...). Un champ électrique très intense est appliqué entre cette anode et une contre-électrode située à 2 ou 3 millimètres (10^7 à 10^8 V/cm²) ; ainsi l'échantillon est-il désorbé et des ions moléculaires sont émis. L'arrachement de l'électron n'est pas dans ce cas un processus discontinu, contrairement au processus d'ionisation par impact électronique où l'électron est arraché seulement au dessus

d'une certaine valeur de l'énergie de bombardement parfaitement définie : l'énergie d'ionisation. La désorption de champ est un processus dans lequel la probabilité d'arrachement augmente avec la contrainte de champ : **effet tunnel** (51).

La plupart des applications nécessitent l'utilisation de spectromètres de masse à secteur qui sont compatibles avec les hauts champs électriques. En général, la polarité des échantillons détermine le type d'ions formés. Les molécules non polaires tendent à produire principalement M^+ ou M^- , alors que les molécules polaires produisent plutôt des ions par réaction d'attachement avec des cations Na^+ , K^+ et H^+ .

Le principal succès de cette technique a été liée essentiellement aux résultats obtenus avec les molécules non polaires. Son application principale est la détection, l'identification et la détermination structurale de composés organiques complexes thermolabiles et de matériaux inorganiques comme les métaux (52). Par contre, la limitation principale de cette technique est due à la reproductibilité médiocre des résultats par le fait même des conditions d'activation de l'émetteur. Pour cette raison, cette méthode est plus ou moins abandonnée au profit des autres.

B - SIMS (Secondary Ions Mass Spectrometry) et FAB (Fast Atom Bombardment)

L'ionisation et la désorption de molécules organiques résultent du bombardement par des particules hautement énergétiques. Ces techniques ont supplanté la désorption de champ dans certains cas, particulièrement pour les matériaux biologiques polaires.

Les premières expériences ont été réalisées dans les années soixante dix avec des ions de gaz rares de plusieurs Kev pour l'analyse de surfaces en chimie inorganique. Les sources d'ions par bombardement de particules sont classées en deux catégories :

- les faisceaux d' ions de haute énergie (technique **SIMS**)
(2 à 10 Kev ; ions Ar et Cs)
- bombardement d'atomes accélérés (technique **FAB**)
(3 à 8 Kev ; atomes Ar et Xe).

Ces deux techniques ont des points communs et beaucoup de distinctions dans la terminologie semblent être quelque peu arbitraires. En fait, les mécanismes de désorption dans les deux cas sont similaires : *le faisceau de particules incidentes d'énergie comparable bombarde la surface, solide ou liquide, provoquant ainsi une émission d'ions secondaires, qui sont alors détectés.* Le mécanisme peut se décomposer en deux étapes :

- les particules primaires cèdent leur énergie cinétique à la surface ; elle se dissipe par des processus de collision
- de la surface excitée, sont émis des ions "secondaires", des particules neutres, des photons et des électrons.

Benninghoven (53) a démontré que l'énergie à la surface décroît de façon exponentielle avec la distance au point d'impact. Si les molécules de surface se trouvent trop proches de ce point, elles acquièrent énormément d'énergie interne et se fragmentent. Si, en revanche, elles en sont trop éloignées, elles n'auront pas suffisamment d'énergie pour désorber. Il existe une région autour du point chaud où les molécules intactes désorbent. Le rôle de la matrice en SIMS est prépondérant. Des

spectres de masse de produits organiques purs ont été comparés avec ceux correspondants aux mêmes composés adsorbés en monocouches sur une surface solide. On observe, dans le second cas, une décroissance de la fragmentation ainsi qu'une augmentation de l'efficacité de l'ionisation des molécules adsorbées. En effet, la matrice joue le rôle de tampon vis à vis de l'énergie, en éjectant des clusters préformés en surface. Ce modèle de clusters préformés en surface ne fait toutefois pas l'unanimité.

Un modèle basé sur le concept d'une émission atomique simple suivie d'une recombinaison des particules proches de la surface (54) est également proposé.

La formation des ions par bombardement d'une surface solide ou liquide est régie par le même mécanisme (55). La fragmentation n'en est pas moins différente. Elle est plus importante dans le cas des solides. Le processus de dispersion de l'énergie se fait pour les liquides par excitation vibrationnelle ; des molécules de solvants sont éliminées successivement sans qu'il y ait de rupture de liaisons intramoléculaires.

L'efficacité de l'ionisation des molécules organiques peut être améliorée en cationisant celles-ci, c'est-à-dire en préformant des ions. Des sels alcalins sont souvent utilisés à cet effet (56). Le premier potentiel d'ionisation d'une molécule organique non chargée est de l'ordre de 8 à 10 eV. Dans le cas d'un ion préformé, l'énergie nécessaire pour rompre la paire "anion-cation" est d'environ 6 eV, plus 1 eV pour le désorber soit au total 7 eV.

Dans tous les cas, la matrice la plus utilisée en SIMS liquide et en FAB est le glycérol. On note que la désorption d'espèces ioniques moléculaires protonées est augmentée en acidifiant le glycérol (57) ou en

utilisant plutôt du thioglycérol (58). La matrice la plus performante pour détecter les peptides est une solution de glycérol additionnée d'acide camphorsulfonique (59). L'ajout ou non d'acide trichloroacétique à du glycérol permet de contrôler la fragmentation de l'hydrochlorure de bétaïne (60).

C- PDMS (Plasma Desorption Mass Spectrometry)

Autre technique d'ionisation douce, l'ionisation/désorption induite par plasma est fréquemment utilisée en spectrométrie de masse, particulièrement dans le domaine de la biologie et plus précisément pour les peptides de masses supérieures à 2000 uma.

Elle fut mise au point par MacFarlane et ses collaborateurs (61). Il s'agit d'une ionisation provoquée par le bombardement de particules de hautes énergies (^{105}Tc , 100 Mev) produites par la fission nucléaire spontanée de l'ion Californium.

Différents modes d'ionisation sont observés :

- * transfert d'électron (M^+ et M^-),
- * transfert de proton $(\text{M}+\text{H})^+$, $(\text{M}-\text{H})^-$,
- * cationisation $(\text{M}+\text{Na})^+$.

La principale limite de la désorption induite par plasma a longtemps été d'être couplée à des spectromètres de masse basse résolution comme les temps de vol (TOF), qui ne peuvent distinguer individuellement les hautes masses. Récemment, des TOF "nouvelle génération" ont vu le jour ; ils offrent de meilleures performances d'un point de vue résolution (62). Della Negra et coll. (63) ont présenté récemment un nouveau spectromètre de masse, le SuperDepil (Désorption Par Ions Lourds), équipé d'une source

ionique modulaire (Cf, Cs, Laser) et d'un temps de vol haute résolution. Grâce à un miroir électrostatique qui réalise une compensation de temps de trajectoires des ions secondaires. La résolution en masse est supérieure à 7000 pour une masse 1500.

Une autre expérience, nouvelle en son genre et très prometteuse, a été réalisée en couplant une source d'ions obtenus par désorption induite par plasma avec un spectromètre de masse à transformée de Fourier (FTMS) (64).

L'application principale est l'analyse des peptides. Quelquefois des ions multichargés sont obtenus. Pratiquement cette technique permet en biochimie de déterminer le poids moléculaire de composés organiques et de rechercher la corrélation entre la fragmentation et la structure. Pour de nombreux antibiotiques (glycopeptides, polysines, polyènes cycliques), les ions moléculaires ne peuvent être obtenus que par cette technique.

D - ELECTROSPRAY ET THERMOSPRAY

Ces modes d'ionisation permettent également d'obtenir des ions moléculaires à partir d'échantillons non volatils. L'assistance d'un solvant est nécessaire.

1) Electrospray

Les ions sont extraits directement à partir de solutions en appliquant un champ électrique. Un exemple d'application de cette technique est l'obtention des distributions en poids moléculaires de poly(éthylène glycols) - par exemple de 400 à 3200 uma. Van Dorsselaer (65) a présenté à Rennes des résultats très intéressants sur des protéines par la technique Ion Spray (ou nébulisation). En effet, cette

technique produit des ions moléculaires multichargés ce qui permet de caractériser des protéines et de mesurer leurs masses moléculaires avec une excellente précision jusqu'à 130.000 uma. L'effet de cette charge multiple est d'augmenter la plage de masse d'analyse proportionnellement à la multiplicité de la dite charge.

2) Thermospray

Les ions sont préformés en solution et désorbés par évaporation du solvant (66). Il s'agit d'une technique très fréquemment utilisée comme interface entre un chromatographe et un spectromètre de masse.

E - IONISATION LASER

Dès les années 1960, des scientifiques rendaient compte de l'utilisation d'un laser à rubis afin d'ioniser des matériaux tels que des métaux, des isolants, des semi-conducteurs et de les étudier avec un spectromètre de masse à secteur conventionnel. Ces expériences utilisaient en général un faisceau d'électrons qui provoquait l'ionisation des particules vaporisées par le laser. Vastola et Pirone ont publié, en 1968, leurs premiers résultats sur l'ionisation par irradiation laser de solides organiques (67). Douze années après, Conzénus et Capellen pouvaient déjà publier un bilan très conséquent sur ce nouveau type d'ionisation associé à la spectrométrie de masse : tous les types de spectromètres de masse utilisés y sont référenciés, les paramètres physiques et les applications de ce couplage sont passés en revue (68). En 1987, Cotter a remis à jour ce bilan sur la spectrométrie de masse couplée à l'ionisation laser - LDMS - (69).

Le processus essentiel qui intervient dans la désorption laser est l'interaction laser-matière. Elle dépend de nombreux paramètres (70) :

- l'énergie du faisceau (exprimée en μJ) ou l'irradiance en W/cm^2
- le temps d'interaction laser-matière
- la température du plasma
- la longueur d'onde.

1) Les lasers

En fonction du type d'applications, des lasers CO_2 , Nd-YAG pulsés, Rubis ou Excimères...peuvent être utilisés. Ils permettent de délivrer des impulsions de plusieurs centaines de nanojoules en quelques dizaines de nano ou picosecondes. Au point d'impact, lorsque le faisceau laser est focalisé, l'irradiance peut atteindre des valeurs supérieures à 10^{11} W/cm^2 .

2) Le temps d'interaction laser-matière

Le temps d'interaction est déterminé essentiellement par la durée de l'impulsion laser, mais également par la largeur du point d'impact, de sa profondeur et par le temps de vaporisation (lui-même lié aux paramètres physiques du matériau : énergie de réseau, fusibilité, conductibilité, coefficient d'absorption molaire).

Au point d'impact, s'établit un équilibre thermodynamique local (appelé Local Thermodynamic Equilibrium LTE). Le système est caractérisé par une série de sous-systèmes ayant chacun des températures différentes (température d'atomisation, température

d'ionisation...). Ainsi chaque sous-système vérifie individuellement les lois de Boltzmann, Maxwell et Saha.

3) La longueur d'onde

Au début, la longueur d'onde du faisceau laser est apparue dans la plupart des cas comme un facteur peu influençant sur le nombre et le type d'ions formés lors de l'ionisation laser.

En effet, sur certaines molécules organiques, on a pu mettre en évidence la similitude des spectres obtenus à des longueurs d'onde allant de l'ultra-violet (*la plupart des molécules analysées ont alors une absorption électronique importante*) à l'infra-rouge (*dans ce cas, les molécules organiques ont à nouveau une absorption vibrationnelle forte-bande CO*) en passant par le visible (*l'absorption est alors nulle ou quasi nulle*). Ceci est aussi valable pour les irradiations longues pendant lesquelles l'équilibre thermique a le temps d'être atteint que pour des régimes intermédiaires (les pulsations laser durent environ 30 picosecondes) et, dans ce cas, l'équilibre thermodynamique n'est pas atteint. Une étape décisive dans la formation des ions semblerait donc gouvernée par les propriétés chimiques de l'échantillon analysé (71) : structure moléculaire, stabilité moléculaire, affinité électronique, polarités...

Le processus mis en cause lors de l'ionisation laser est différent selon la longueur d'onde :

- Dans le domaine de *l'infra-rouge ou du visible*, l'ionisation est provoquée par des processus thermiques avec évaporation en surface du solide ; les molécules neutres libérées peuvent réagir avec des

ions dans la phase gazeuse ou s'ioniser en absorbant des photons : *processus multiphotonique*.

- L'ionisation avec un laser irradiant dans *l'ultra-violet* serait provoquée plutôt par des *processus mono ou biphotoniques*.

D'autres travaux ont également mentionné l'influence de la longueur d'onde : Antonov et Egorov ont travaillé sur l'ionisation de solides dans l'ultra-violet. En 1981, ils ont montré (72) que pour une même énergie laser ($2 \cdot 10^5 \text{ W/cm}^2$), le rendement d'ionisation d'un monocristal d'anthracène est 10 fois plus important à 219 nm qu'à 308 nm. En 1985, Verdun et Muller ont montré que les HAP, présents à l'état de traces, pouvaient être désorbés à plus faible irradiance et à plus courte longueur d'onde (73). Cette équipe a également montré (74) qu'il est possible de diminuer la limite de détection d'ions métalliques en ajustant la longueur d'onde sur la longueur d'onde de résonance du métal correspondant.

4) Mécanisme

L'ionisation laser ponctuelle des solides repose sur un principe relativement simple : les ions, générés par le faisceau laser lui-même focalisé sur l'échantillon, sont analysés sous vide par différents types de spectromètres de masse.

Les mécanismes propres à l'interaction solide-laser sont fort complexes et très difficiles à modéliser. Entre le temps zéro où les premiers photons de l'impulsion laser sont absorbés par la surface du matériau et le moment où les derniers ions détectables sont éjectés, un grand nombre de phénomènes physiques ultra rapides se sont succédés : absorption non linéaire des photons avec une émission de photoélectrons, formation d'excitons avec apparition de charges de surfaces, émission

d'ions secondaires, formation et expansion de microplasma avec de multiples réactions ion-molécule.

Il est couramment admis que les processus sont :

- à haute irradiance, une thermalisation
- à faible irradiance ($10^5 - 10^7 \text{ W/cm}^2$), une désorption douce.

Hillenkamp a, le premier, émis des hypothèses concernant le mécanisme de l'interaction laser-matière. Hercules présente ce modèle (75), dans lequel interviendraient quatre processus successifs :

- 1 - L'ionisation directe du solide au point d'impact du laser génère l'émission éventuelle d'ions atomiques ou d'ions fragments de la molécule.
- 2 - Adjacente au point d'impact, la région "couronne" à haut gradient de température est influencée par l'onde de choc du plasma et de l'impact laser. Les molécules de hautes masses et les neutres sont émis de cette zone relativement plus froide.
- 3 - Immédiatement au dessus de cette surface proche du point d'impact, des réactions de formation d'ions ont lieu en phase gazeuse.
- 4 - Dans le plasma, les réactions en phase gazeuse entre les molécules neutres et les ions donnent naissance aux ions quasimoléculaires $(M+Na)^+$.

Kistemaker (76) constate également une émission thermoionique des alcalins au centre du spot laser, ainsi qu'une émission de molécules neutres de sucrose à la couronne du point d'impact.

Hillenkamp (77) introduit la notion de désorption laser "vraie" par opposition à l'évaporation thermique d'ions issus d'un solide. Pour travailler dans ces conditions, l'irradiance doit être juste suffisante pour

désorber les molécules organiques. Toutefois, un survol de la littérature montre que bien souvent cette énergie minimum nécessaire pour produire les ions quasimoléculaires varie énormément d'un système d'échantillonnage et de laser à un autre.

La communauté scientifique semble aujourd'hui s'accorder sur le mécanisme d'ionisation proposé par Egorov (78). Il s'agit d'un mécanisme en deux étapes : **thermalisation de l'échantillon suivie d'une réabsorption des photons dans le microplasma formé**. Ce mécanisme peut également s'appliquer à la plupart des solides organiques. Cependant des processus de désorption d'ions directement à partir du solide pourraient également être envisagés à très faible énergie sans que cela ait été prouvé.

PARTIE IV

RESULTATS

Introduction

Chapitre 1 : Desorption/Ionisation Laser

Chapitre 2 : Analyses in-situ de molécules
organiques : cas de
l'amiodarone

Chapitre 3 : Etude de la codésorption

INTRODUCTION

Notre travail a consisté à explorer la potentialité de la microsonde LAMMA appliquée à la **localisation in-situ de cibles organiques dans des tissus biologiques** enrobés ou congelés. Ceci grâce à la reconnaissance du pic moléculaire ou de ses fragments caractéristiques. Le LAMMA pourrait alors être considéré comme une véritable microsonde organique.

Le choix de cette technique est à-priori prometteur. En effet, le diamètre du laser sur l'échantillon peut varier de 1 à 5 microns ; ainsi une excellente localisation du point d'impact est possible (concrétisé par le point rouge du laser pilote Hélium-Néon, dont le faisceau est colinéaire au laser de puissance). Au sein de notre laboratoire, la résolution spatiale du LAMMA 500 a permis de résoudre de nombreux problèmes : par exemple, du baryum a été détecté in-situ dans les zones carbonées d'un lichen préparé en cryocoupe semi-fine (79). La taille du spot laser est de 1 à 2 microns dans ce cas, et le spectre montre clairement les ions Ba^+ , $BaOH^+$, BaC_2H^+ . Ces ions carbonés permettent de prouver l'existence de la liaison probable des ions baryum avec la matière organique et vraisemblablement avec des polysaccharides. De cette manière, l'identification directe d'un produit organique dérivé de la lichenxenthone a été réalisée.

Toutefois, si la microsonde LAMMA 500 répond aux exigences techniques, elle ne permet pas de s'affranchir d'un problème inhérent à la nature de nos échantillons : le tissu biologique et le polymère d'enrobage induisent inmanquablement des effets de matrice. Le

volume de la coupe biologique irradié contient, outre le polymère d'enrobage, les molécules cibles en faibles proportions dans un mélange complexe (le tissu biologique est une matrice extrêmement inhomogène constituée de macromolécules telles que des protéines, des lipides, etc...). On peut imaginer aisément que ce dernier va modifier les caractéristiques de désorption laser et d'ionisation du composé ou de l'élément à analyser.

Pour mener à bien notre étude, deux stratégies de travail étaient envisageables :

- soit la recherche dans les matrices polymérique et biologique du pic moléculaire de l'amiodarone,
- soit celle des fragments caractéristiques. Dans ce cas, il était nécessaire de bien comprendre les paramètres qui influent sur leur formation.

Quelques exemples extraits de la bibliographie illustreront ensuite comment des composés organiques peuvent être caractérisés par désorption laser.

Puis nous étudierons en détail la fragmentation classique de l'amiodarone par impact électronique, en comparaison avec celle obtenue dans les conditions de la désorption/ionisation laser.

Nos résultats expérimentaux sur l'analyse et la fragmentation de l'amiodarone en milieu polymérique et biologique seront enfin exposés et discutés.

La difficulté à détecter l'amiodarone en matrice complexe nous a amené à modifier notre stratégie de travail. Le bilan de nos expériences d'optimisation du signal du pic moléculaire par codésorption sera finalement présenté.

CHAPITRE I

LA DESORPTION/IONISATION LASER

A - CARACTERISATION ET FRAGMENTATION DES COMPOSES ORGANIQUES PAR DESORPTION LASER

Les analystes, qui utilisent le laser pour désorber et ioniser leurs molécules cibles, savent que la fragmentation du composé organique peut varier d'un impact laser à l'autre, *toutes conditions instrumentales égales*, du fait de la rugosité de la surface, qui peut modifier le rendement d'ionisation. Il est toutefois possible de définir un spectre moyen (en multipliant les spectres individuels), celui-ci étant alors représentatif de la fragmentation du composé pour des conditions expérimentales données.

Hercules (80) s'est penché sur le problème de la reproductibilité des spectres de masse obtenus avec une microsonde LAMMA 1000, fonctionnant en mode **réflexion**. La focalisation du laser, l'énergie fournie à chaque pulsation laser, la préparation de l'échantillon ainsi que les interactions chimiques sont autant de facteurs qui contribuent à modifier le spectre de masse moyen d'un composé organique. Pour illustrer ceci, l'auteur présente, par exemple, le cas de l'acide rétinoïque. Aucun pic moléculaire ou quasimoléculaire n'apparaît *lorsque le laser est focalisé*, quelle que soit la valeur de l'énergie délivrée par la pulsation laser. Seuls les clusters carbonés sont visibles. Ce qui signifie que les conditions de *désorption* ne sont pas encore atteintes. *En défocalisant le laser*, l'irradiance désirée est obtenue. La production des ions organiques

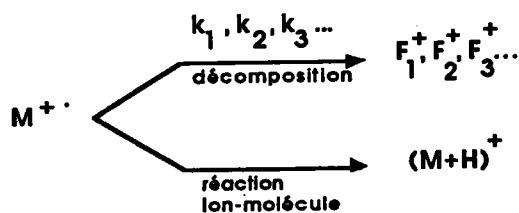
structuralement significatifs augmente et l'ion moléculaire M^+ a une intensité d'environ 50% du pic de base.

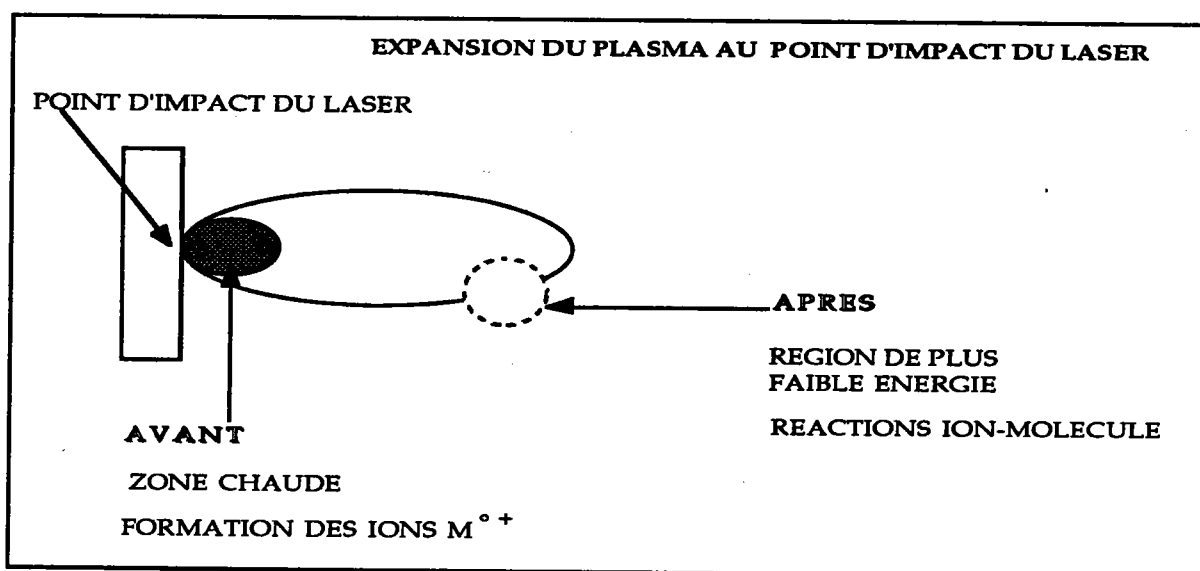
Hillenkamp (81) a réalisé une expérience similaire dans laquelle la désorption d'un décapeptide cyclique, la gramicidine est obtenue en défocalisant le laser. Le concept de l'irradiance limite d'un composé organique est défini : il s'agit de l'irradiance la plus basse nécessaire pour observer les ions spécifiques de la molécule cible. L'intensité de l'ion quasimoléculaire $(M+Na)^+$ augmente avec le diamètre du laser (18, 42 puis 137 μm), approximativement proportionnellement au diamètre. Dans une autre publication, l'auteur (82) propose une caractérisation des spectres de masse en désorption laser d'acides aminés. A 266 nm, tous les acides aminés aromatiques ainsi que des dipeptides contenant au moins un acide aminé aromatique présentent un spectre de masse avec un ion $(M+H)^+$ intense. A l'irradiance limite des composés organiques, aucun ion alcalin n'est observé alors que $(M+H)^+$ l'est parfaitement. En augmentant l'irradiance, le signal du pic $(M+H)^+$ décroît tandis que les pics dûs d'une part aux ions $(M-45)^+$ et d'autre part au fragment aromatique ionisé R^+ deviennent les pics de base. La question se pose de savoir si l'ion $(M-45)^+$ provient du précurseur M^+ selon un mécanisme type impact électronique ou s'il est généré à partir de l'espèce protonée par perte d'acide formique HCOOH . Les auteurs conservent la seconde hypothèse car M^+ n'est jamais observé sur les spectres des acides aminés.

Pour sa part, Van Vaeck s'est intéressé à l'analyse structurale de diverses familles de composés organiques (83,84). Un rapide examen de la littérature révèle qu'il est admis en désorption laser que les ions quasimoléculaires classiquement formés possèdent un nombre d'électrons pairs (EE^+ : even-electron ion).

Les processus les plus fréquents en désorption laser sont le transfert de proton, l'attachement d'un ion alcalin, la désorption d'ions préformés intacts à partir de sels et des réactions en phase gazeuse entre les neutres et les ions alcalins désorbés. L'auteur observe, quant à lui, une similarité très stricte entre les spectres de masse LAMMA et Impact Electronique. Aussi pose-t'il l'hypothèse suivante, à contre-courant donc des principes admis, qu'il se formerait à la fois des ions $(M+H)^+$ et $M^{\cdot+}$. Ces derniers sont pourtant énergétiquement défavorisés (sauf dans le cas des hydrocarbures polycycliques aromatiques et de leurs analogues). Ils se décomposeraient alors selon un processus unimoléculaire avec des constantes de vitesse élevées pour donner les fragments ionisés observés, qui apportent une information structurale de la molécule organique analysée. Cette hypothèse permet à l'auteur d'interpréter les spectres de masse LAMMA par extrapolation des connaissances acquises en impact électronique. Une autre famille de composés (les N-Oxydes) a également été caractérisée par Van Vaeck par microsonde LAMMA 500 (85). Les spectres présentent aussi bien le pic quasimoléculaire $(M+H)^+$ que de nombreux fragments ionisés. Les auteurs proposent, pour expliquer la formation de ces derniers, des chemins de fragmentation qui aboutissent effectivement aux fragments observés, en partant de l'ion radical $M^{\cdot+}$.

En résumé, on aurait donc $M^{\cdot+}$ qui se formerait dans la zone chaude et qui donnerait après $(M+H)^+$ par réaction ion-molécule (voir dessin 1) :





Dessin 1 : Expansion du plasma au point de l'impact laser

Dans une publication récente, Hillenkamp (86) avance le terme de "chimie intermédiaire" pour caractériser les réactions qui surviennent au moment de l'impact laser. A son tour, il n'exclut pas la formation d'ions moléculaires radicaux. L'instabilité de ces ions radicaux, qu'ils soient formés par impact électronique ou en ionisation laser, ne dépend que de l'excès d'énergie interne fournie. Aussi dans le cas de l'ionisation laser, ils seraient formés dans la zone chaude de l'impact laser. Instables énergétiquement, ils se fragmenteraient immédiatement.

Dans les deux précédentes références, les auteurs rapportent des résultats concernant la fragmentation de certaines classes de composés et, pour les expliquer, ils sont amenés à formuler des hypothèses qui, aujourd'hui, n'ont pas été formellement confirmées. En effet, il subsiste une anomalie car si leurs hypothèses sont vraies, dans certaines conditions, l'ion M^+ devrait tout de même être observé.

B - LA FRAGMENTATION DE L'AMIODARONE

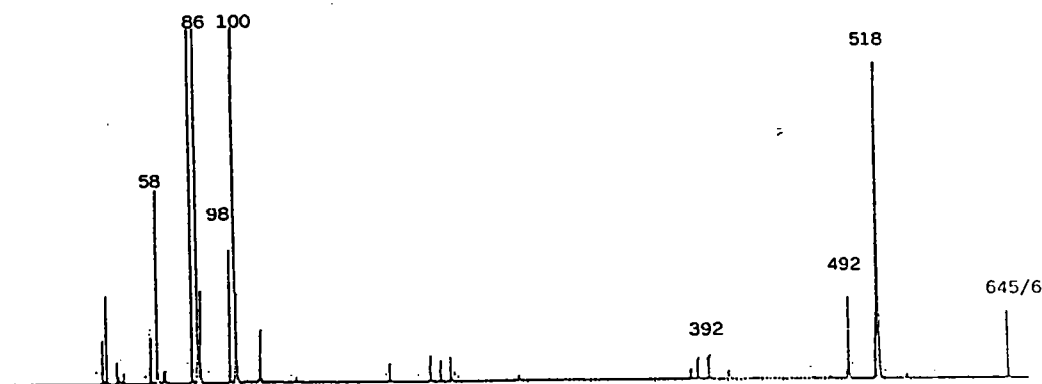
La molécule test est un benzofurane diiodé : l'amiodarone (voir Partie I). L'étude des spectres de masse obtenus en désorption laser et en impact électronique, assortie de quelques expériences de MS/MS, permettent de proposer certains mécanismes de sa fragmentation.

1) Avant-Propos

Les expériences de fragmentation de l'amiodarone et de MS/MS sur ses fragments fils par impact électronique (IE) ont été réalisés à l'Ecole Polytechnique de Lausanne, car notre microsonde FTMS montée en configuration laser n'est pas disponible en configuration impact électronique.

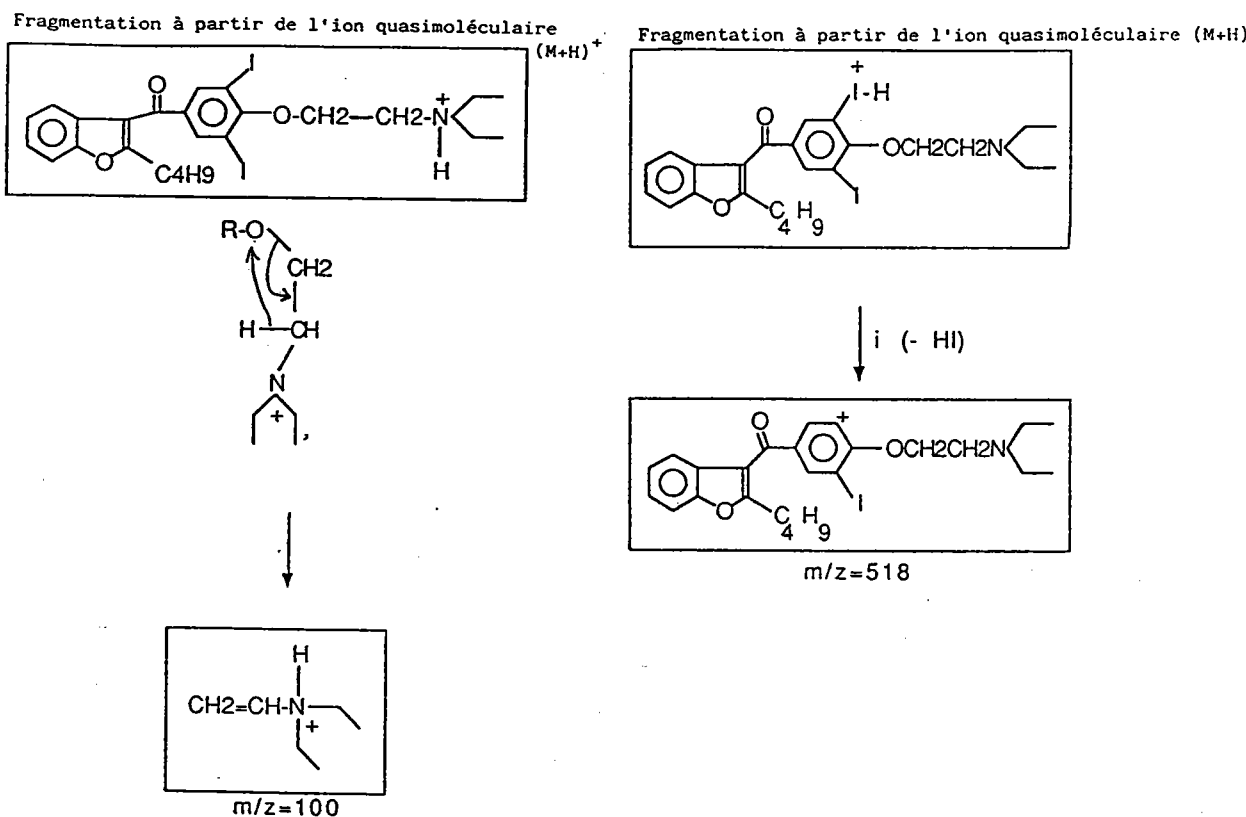
2) Spectre LAMMA de l'amiodarone

L'analyse par microsonde LAMMA de l'amiodarone donne le spectre suivant :



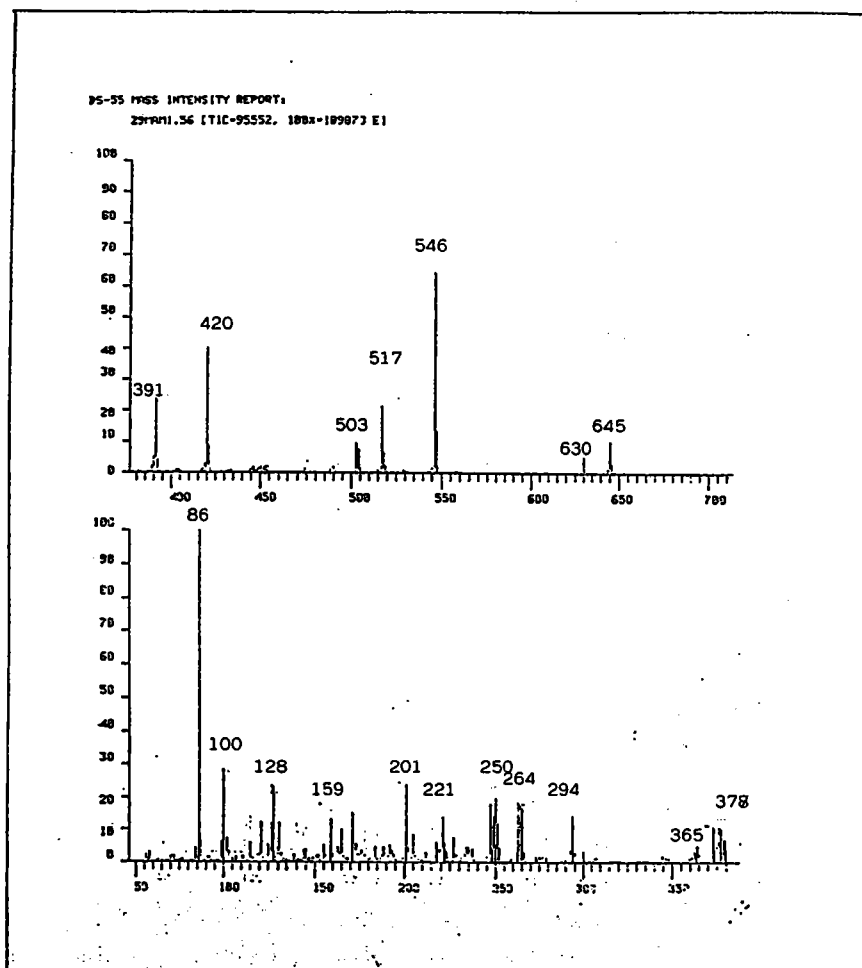
Spectre 1 : Spectre LAMMA de l'amiodarone en ions positifs (286 nm)

La résolution du spectromètre de masse ne permet pas de déterminer avec exactitude la valeur du pic quasimoléculaire : 645 ou 646 ? L'ion majoritaire ou pic de base est l'ion $m/z=518$. Il existe également un autre pic intense qui correspond au fragment $m/z=100$. En augmentant l'énergie, les fragments $m/z=86$, 392, 492 et 630 peuvent exister sur les spectres obtenus sur le LAMMA 500. On constate qu'avec les spectromètres de masse LAMMA 1000 ou FTMS, l'analyse en réflexion d'un dépôt d'amiodarone donne naissance en plus à d'autres fragments $m/z=201$, 365... La formation des deux fragments majoritaires ($m/z=100$ et 518) s'explique par élimination de la molécule HI à partir de l'ion quasimoléculaire $(M+H)^+$.



3) Spectre IE de l'amiodarone

Le spectre de masse classique de l'amiodarone en impact électronique (IE) se présente ainsi (spectre 2) (87) :



Spectre 2 : Spectre de masse IE classique de l'amiodarone (70 eV)

La fragmentation en impact électronique est évidemment beaucoup plus conséquente qu'en désorption laser. Déjà quelques différences sont à noter par rapport au spectre DL présenté précédemment :

- * le fragment $m/z=86$ devient le pic de base,
- * le fragment $m/z=100$ existe mais son intensité est plus faible,
- * les fragments $m/z=392$, 492 et 518 disparaissent au profit des ions $m/z=391$, 420 , 517 et 546 .

4) Spectre ITMS de l'amiodarone

Les expériences de MS/MS sont donc réalisées sur un spectromètre de masse Finningan Mat à piège à ions (ITMS : Ion Trap Mass Spectrometer) (figure 20).

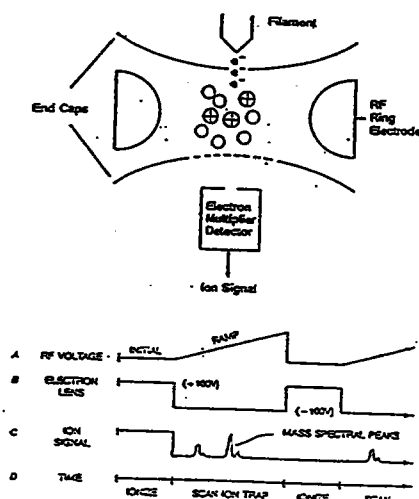
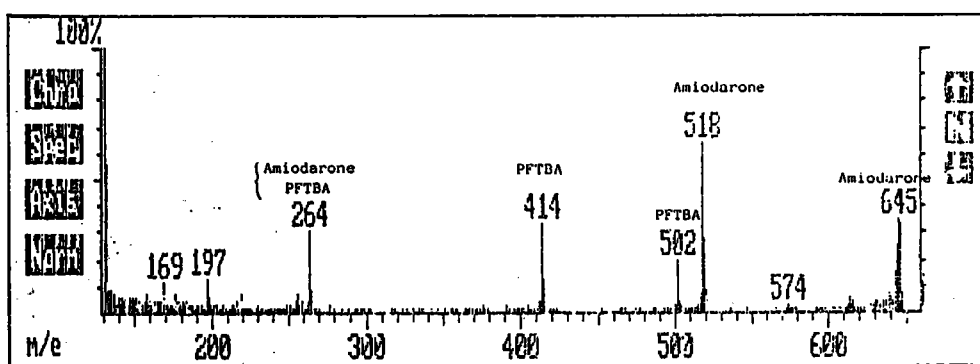


Figure 20 : Principe de l'ITMS

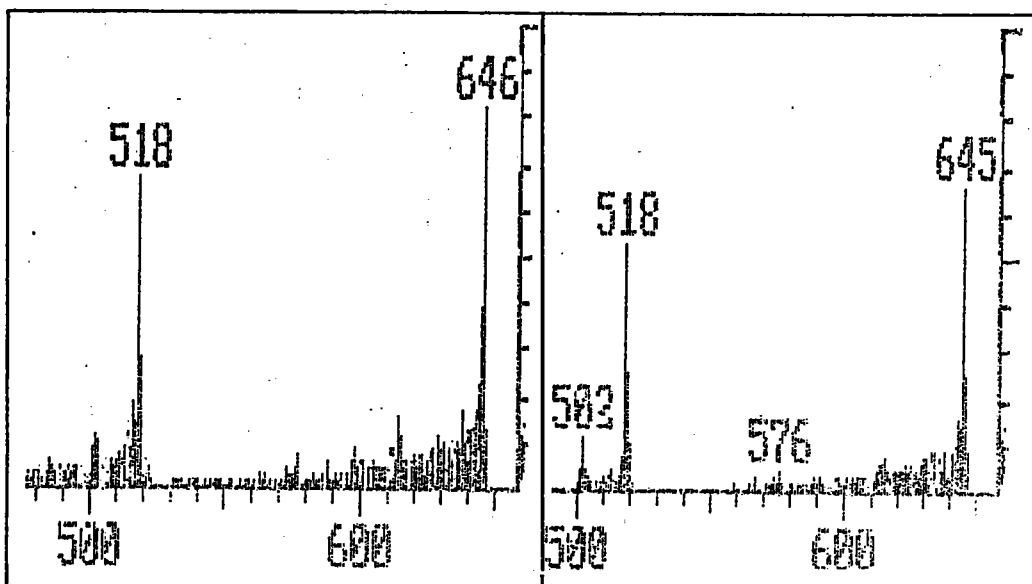
La séquence d'analyse se déroule en trois étapes : ionisation, analyse des masses, détection. Lorsque l'hélium est présent dans la cavité du piège à ions à la pression partielle de 10^{-3} torr, l'échantillon à la pression partielle de $5 \cdot 10^{-6}$ torr et le voltage RF maintenu à une valeur particulière appelée voltage de piègeage, des électrons très énergétiques sont introduits dans la cavité. Ces électrons interagissent avec les molécules d'échantillon et les ionisent. Tous les ions formés ayant un $m/z \geq 10$ sont stockés dans la cavité. Du fait des nombreuses collisions avec les atomes d'hélium, les ions restent au centre du piège. Toutes les molécules d'échantillon non ionisées sont éliminées par pompage. Afin de détecter les ions piégés, le voltage RF est augmenté de manière progressive à partir de la valeur précédemment appliquée pour le piègeage. Ainsi les ions sont peu à peu excités en fonction de leurs

masses m/z ; ils deviennent instables et sont éjectés de la cavité piège. Une partie des ions éjectés entre dans le multiplicateur d'électrons et ils peuvent ainsi être détectés. Un des inconvénients majeurs de cet appareil vis à vis de l'amiodarone, compte tenu de sa masse moléculaire, est que la plage de masse accessible est de 20 à 650 uma.

Dans un premier temps, l'analyse du mélange amiodarone et PFTBA permet de connaître les valeurs exactes des fragments caractéristiques de l'amiodarone en impact électronique. En effet, la fragmentation de la PFTBA (perfluoro tributyl amine) est parfaitement connue : $m/z= 69, 131, 219, 264, 414, 502....$ Sur le spectre 3 optimisé pour obtenir les pics de hautes masses, les pics de masses exactement $m/z= 518$ et 645 sont, entre autres, présents. Il faut noter que, d'un spectre à l'autre, on obtient soit l'ion M^+ , soit l'ion $(M+H)^+$. L'agrandissement de deux spectres permet de constater que les deux ions coexistent toujours, mais que seules les proportions changent (spectre 4).

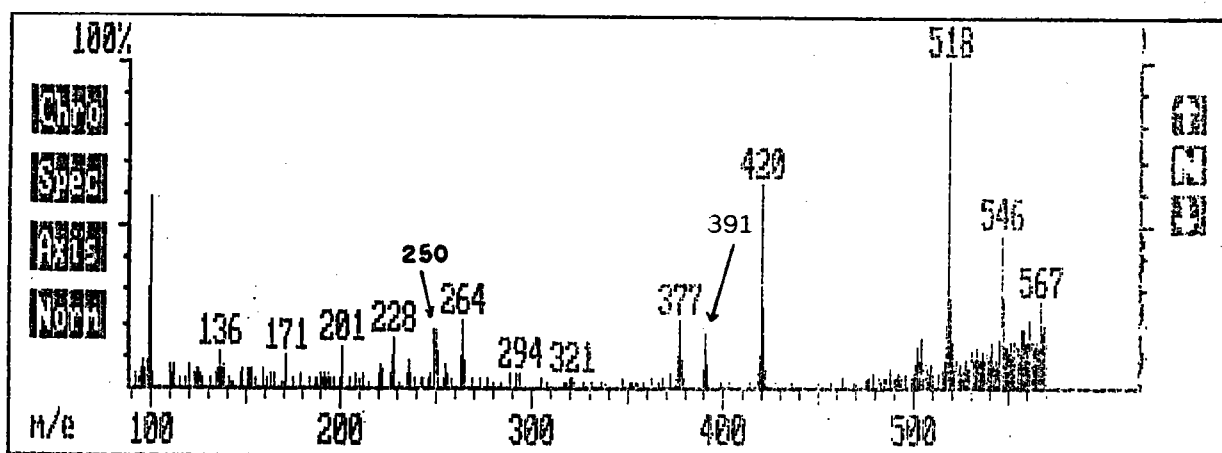


Spectre 3 : Spectre IE du mélange amiodarone et PFTBA (70eV)



Spectre 4 : Formation compétitive de M^+ et de $(M+H)^+$

Sur les spectres ITMS, on retrouve l'ensemble de la fragmentation de l'amiodarone (spectre 5). Les ions de masses supérieures à 570 uma ne sont pas détectés du fait des conditions expérimentales. Cette technique conduit à la coexistence des ions M^+ et $(M+H)^+$, contrairement à la technique IE classique.



Spectre 5 : Spectre complet de l'amiodarone par IE (70eV)

Afin d'élucider les fragments principaux de l'amiodarone, quelques expériences de MS/MS ont été réalisées sur l'ITMS. Les spectres 6 rassemblent l'ensemble de ces résultats de MS/MS, qui sont exploités dans les schémas de fragmentation de l'amiodarone que nous proposons à l'issue (schémas 1a, b, c).

En spectrométrie de masse classique, l'ion moléculaire M^+ donne naissance à des fragments différents selon le site de première ionisation de la molécule. Dans le cas présent, trois sites semblent entrer en compétition :

- l'azote de la fonction amine
- l'oxygène de la fonction carbonyle
- l'oxygène de la fonction éther

a - site de première ionisation : fonction amine

Le processus le plus classique dans ce cas est un clivage de l'azote chargé. Selon le côté de la molécule où survient ce clivage, les ions $m/z=630$ ou 86 sont formés (schéma 1a).

b - site de première ionisation : fonction carbonyle

Le clivage en α de la fonction carbonyle est un mécanisme classique de fragmentation. Selon le côté où survient ce clivage, deux ions différents sont obtenus : les ions de masse $m/z=201$ ou 489 (schéma 1b).

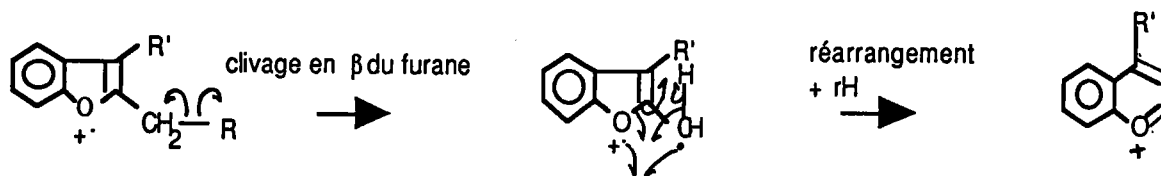
c - site de première ionisation : fonction éther

Le passage d'un hydrogène sur l'oxygène chargé, suivi du clivage de la liaison en β du site de première ionisation conduit à la formation de l'ion de masse $m/z=546$.

L'expérience de MS/MS sur cet ion a montré qu'il possède deux ions

fil. Il faut tout de même noter que cet ion est particulièrement stable ; sa fragmentation nécessite des conditions expérimentales poussées.

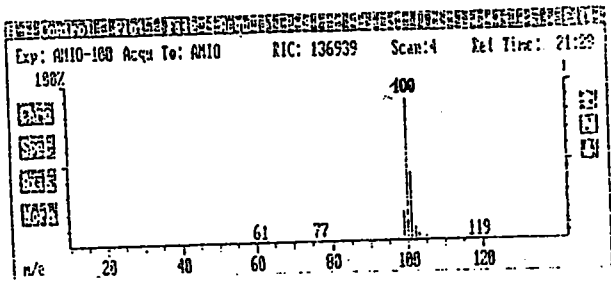
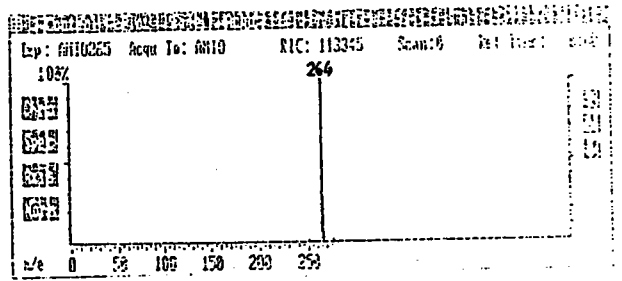
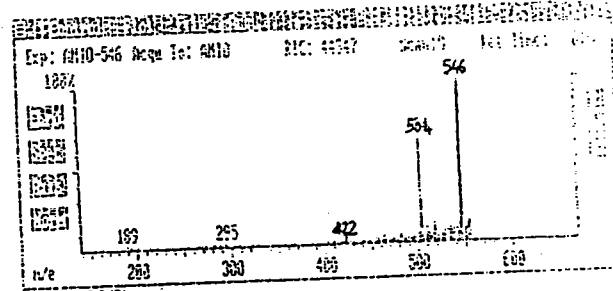
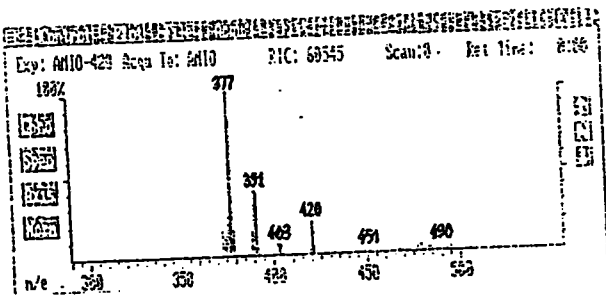
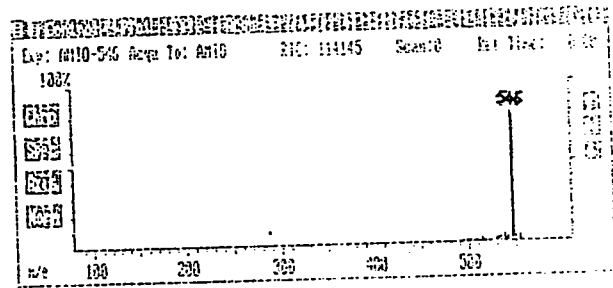
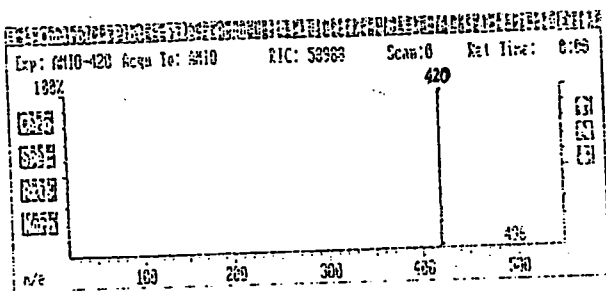
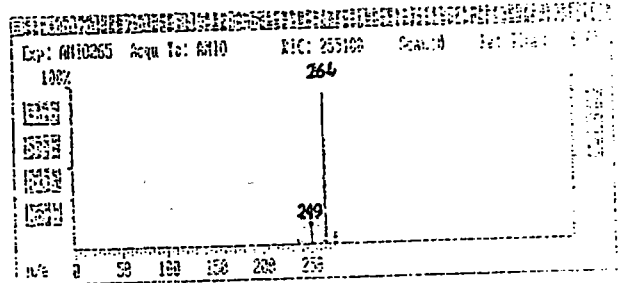
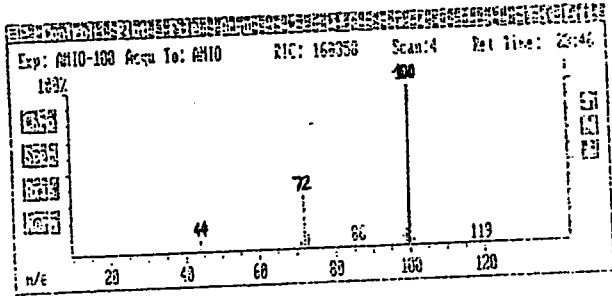
Le premier ion fils ($m/z=503$) est obtenu par transfert de la charge sur l'oxygène du cycle furane, clivage en β de l'oxygène puis réarrangements. En effet, le clivage en β des benzofuranes est une fragmentation dominante et le passage du cycle à 5 du furane à un cycle à 6 est classique (88) :



L'autre ion formé est obtenu par transfert de la charge sur un atome d'iode. Le clivage de la liaison C-I suivie d'une capture d'un proton et d'un réarrangement donne naissance à l'ion de masse $m/z=420$.

Celui-ci est également très difficile à fragmenter. Sa MS/MS a donné aussi trois fragments fils de masses $m/z= 377, 391$ et 403 (schéma 1c). Les fragments 377 et 391 sont formés par transfert de charge sur le furane et par clivage respectivement en α et en β de l'oxygène du furane suivi d'un réarrangement.

Ces expériences de MS/MS sur certains fragments de l'amiodarone ont permis d'obtenir des fragments fils qui, sur le spectre de masse initial de l'amiodarone, sont peu ou pas présents ($m/z= 403, 489, 503$). Ceci s'explique par la stabilité des ions dont ils sont issus et par la difficulté rencontrée pour les fragmenter.

Spectre 4a : Fragment $m/z=100$ isolé et fragmentéSpectre 4b : Fragment $m/z=264$ isolé et fragmentéSpectre 4c : Fragment $m/z=420$ isolé et fragmentéSpectre 4d : Fragment $m/z=546$ isolé et fragmenté

Spectres 6 : MS/MS sur certains fragments de l'amiodarone

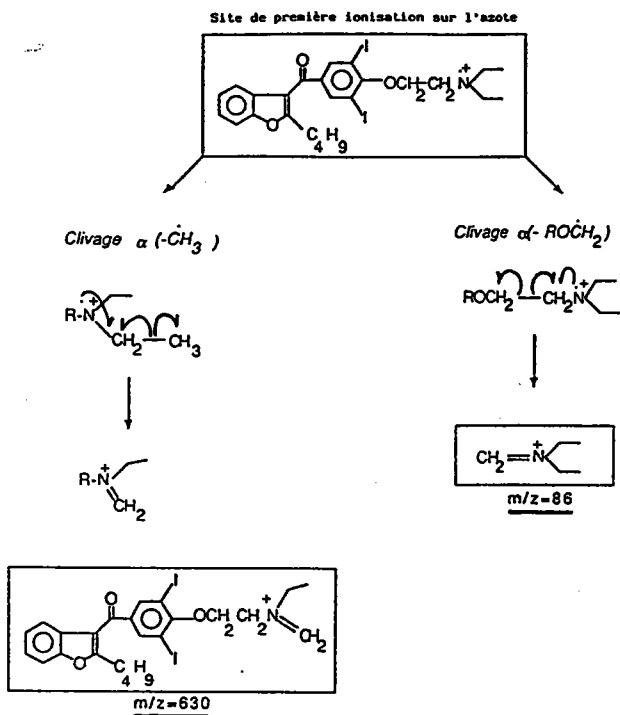


Schéma 1a : Fragmentation de l'amiodarone à partir de l'azote comme premier site d'ionisation.

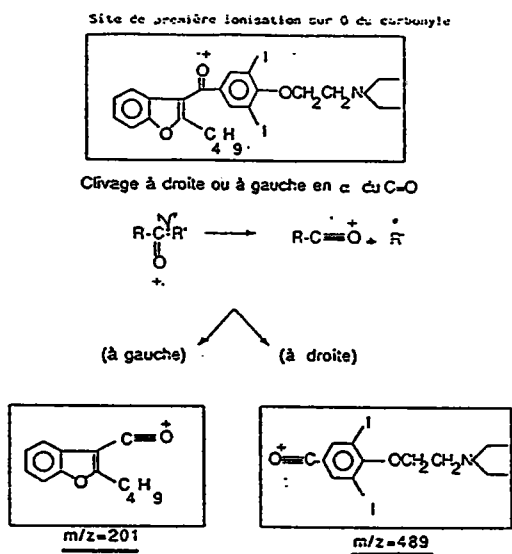
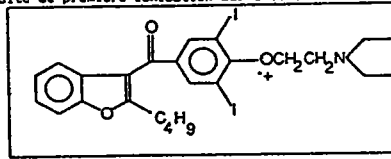
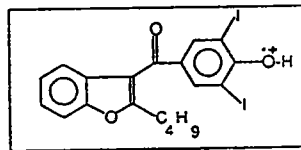
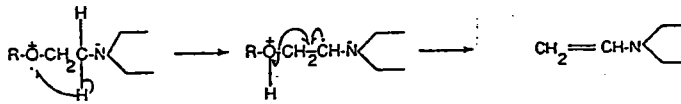


Schéma 1b: Fragmentation de l'amiodarone à partir du O du carbonyle comme premier site d'ionisation

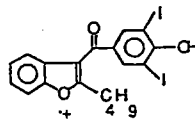
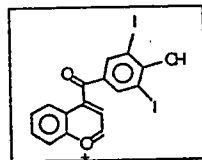
Site de première ionisation sur O de la fonction éther



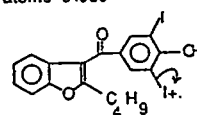
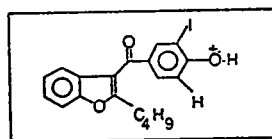
Réarrangement d'hydrogène puis clivage

 $m/z = 546$

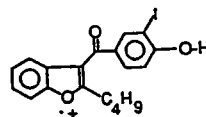
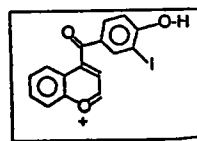
transfert de charge sur le furane

-clivage β
-réarrangement $m/z = 503$

transfert de charge sur un atome d'iode

clivage de la liaison C-I,
capture de H
et réarrangement (?) $m/z = 420$

transfert de charge sur le furane

-clivage
-réarrangement $m/z = 377$

Clivage de la liaison C-OH

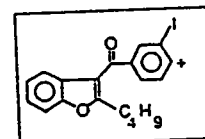
 $m/z = 403$

Schéma 1c: Fragmentation de l'amiodarone à partir du O de la fonction éther comme premier site d'ionisation.

C - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'interprétation des spectres de masse DL et IE a permis de formuler des hypothèses concernant les voies de fragmentation de l'amiodarone.

Ainsi en ITMS :

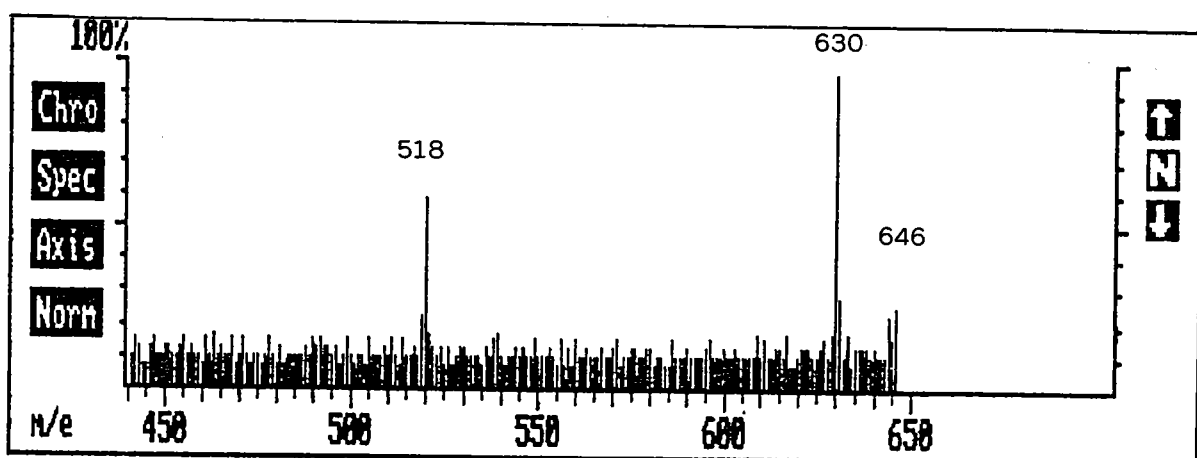
L'ion moléculaire M^+ (OE^+) donne naissance aux fragments de masse $m/z= 546$ (OE^+), 489 (EE^+), 201(EE^+) et 86 (EE^+).

Ensuite le fragment 546 se fragmente en $m/z= 504$ (EE^+) et **420** (OE^+).

A son tour, le fragment 420 donne naissance aux ions de $m/z= 404$ (EE^+) et 378 (EE^+).

La fragmentation du fragment $m/z=100$ donne naissance aux ions de masses $m/z = 72$ et 44.

L'expérience de MS/MS sur l'**ion quasimoléculaire $(M+H)^+$** (masse $m/z=646$) donne, comme fragments fils, les ions de masse $m/z= 630$ (EE^+) et 518 (EE^+).



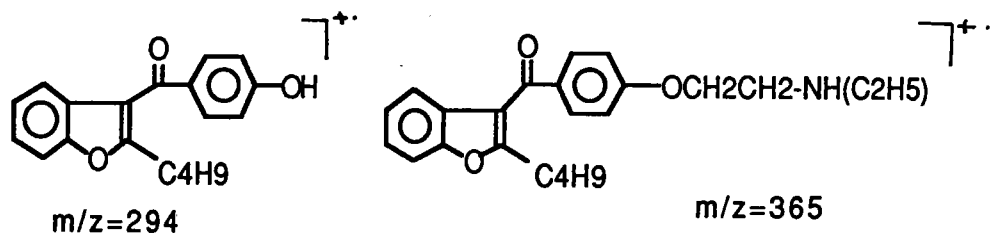
La comparaison des spectres de masse en ions positifs obtenus en **désorption laser** et en **impact électronique** permet de formuler les remarques suivantes :

* Les ions à nombre impair d'électrons OE^+ ($m/z= 645, 546$ et 420) ne sont pas présents sur les spectres de masse (ions positifs) en désorption laser (à 286 nm). En fait, ce constat est conforme aux idées admises sur la fragmentation des espèces organiques en désorption laser, à savoir qu'il se forme préférentiellement les ions à nombre pair d'électrons (EE^+). En revanche, les ions de masses $m/z= 420$ et 546 sont des ions **majoritaires sur le spectre en impact électronique**.

* Sur les spectres de masse de l'amiodarone **en désorption laser**, les deux ions majoritaires sont les ions de masse $m/z= 100$ et 518 (ils sont tous les deux minoritaires sur le spectre classique en impact électronique). Nous expliquons logiquement la formation de ces ions à partir de l'espèce protonée qui apparait préférentiellement en désorption laser (cf p.71).

En conclusion, la comparaison des spectres en impact électronique et en désorption laser *en ions positifs* a permis d'émettre des hypothèses quant aux voies de fragmentation de l'amiodarone. *Notre interprétation de la fragmentation en désorption laser est en accord avec le concept de formation préférentielle des ions EE^+* .

Il existe sur le spectre de masse IE de l'amiodarone des fragments non interprétés. Pour tenter d'en identifier, l'étude des différents métabolites connus de l'amiodarone est une aide précieuse. En effet, certains fragments de l'amiodarone et certains métabolites ont des masses identiques. Ainsi nous proposons pour les fragment $m/z= 365$ et 294 les formules suivantes :



Cette hypothèse tendrait à prouver que, dans certains cas, la fragmentation de l'amiodarone sous l'effet d'un facteur extérieur (photons, électrons) pourrait emprunter les mêmes voies que le processus de métabolisme dans l'organisme vivant.

CHAPITRE II

ANALYSE IN-SITU DES MOLECULES ORGANIQUES CAS DE L'AMIODARONE

A - INTRODUCTION

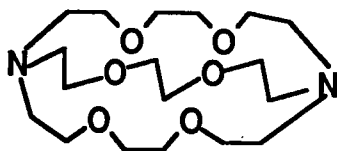
Les analystes ont mis au point depuis longtemps des protocoles permettant de détecter, en spectrométrie de masse, une molécule organique en lui associant un composé organique ou minéral. Un rappel bibliographique permettra de faire le point à ce sujet.

En revanche, l'analyse in-situ de molécules organiques reste encore aujourd'hui un défi. Il reste à établir un lien entre les composés choisis délibérément pour aider la molécule cible à s'ioniser et à mieux se désorber et ces matrices telles que les polymères d'enrobage et les tissus biologiques.

Les expériences ont été réalisées sur les microsondes LAMMA 500 et FTMS équipant le laboratoire. Dans un premier temps, la molécule-test (l'amiodarone) est recherchée dans des polymères dopés (épon, technovit). Ensuite, les résultats des analyses des coupes histologiques préparées à partir d'animaux traités avec de fortes doses d'amiodarone sont présentés. Un premier bilan sur la potentialité de la microsonde LAMMA pour l'analyse in-situ pourra être fait à la lumière de ces tests.

B - BIBLIOGRAPHIE SUR L'ANALYSE ORGANIQUE IN-SITU

Il est fréquent, en chimie analytique, de déterminer pour une technique donnée les limites de détection d'un composé en préparant des gammes de solutions de concentrations connues. Dans le cas particulier de l'analyse par LAMMA, les limites de détection relative et absolue de différents métaux ont été établies avec une résine dopée en sels métalliques. Or la dissolution directe de sels métalliques dans les monomères de la résine est en général impossible. Pour contourner cet obstacle, les métaux sont associés à une molécule organique, un cryptate :



BICYCLO (8.8.8.) HEXACOSANE
"Kryptofix 222"

Le complexe organométallique résultant a alors, de par sa structure, une solubilité plus grande et il peut être dissous dans un minimum de solvant, lequel est ensuite additionné au monomère. Les échantillons standard se présentent sous forme de coupes de 0,3 à 1 μm d'épaisseur, découpées dans les blocs de résines époxy "spurr" dopées.

Le tableau suivant rassemble les résultats (29) :

LIMITES DE DETECTION		
Élément	Absolue en g	Relative en ppm
Li	1.10-20	0,07
Na	2.10-20	0,2
K	1.10-20	0,1
Ca	2.10-19	1
Cu	4.10-18	20
Pb	5.10-20	0,5
Cs	3.10-20	0,3
Sr	4.10-19	20
Ag	4.10-18	1
Pb	1.10-19	0,6
U	2.10-18	20

Tableau v : Limites de détection absolue et relative de quelques éléments par la technique LAMMA (Matrice : épon).

Les limites de détection des différents éléments dépendent du potentiel d'ionisation de chacun. Effectivement, l'équation de Saha et Langmuir donne le degré d'ionisation a_x en fonction du potentiel d'ionisation, et ceci dans le cas simplifié d'un élément de concentration connue ou de concentration relativement homogène sur toute la surface :

$$a_x = \frac{n_e n_i}{n_0} = \frac{Z^+}{Z} \exp \left(- \frac{PI - \Phi}{kT} \right)$$

- a_x : degré d'ionisation
- n_e , n_i et n_0 : populations électroniques, ioniques et neutres du plasma
- k : constante de Boltzmann
- Z et Z^+ sont les fonctions de partition des atomes et des ions
- PI : potentiel d'ionisation de l'élément atomisé
- Φ : fonction électronique d'extraction

Les limites de détection peuvent également varier en fonction de la matrice dans laquelle l'élément est inclus. Dans le cas de composés plus particuliers ou de molécules organiques, la première exigence vis à vis de cette matrice sera qu'elle n'induisse pas, ou le moins possible, d'interférences. Celles-ci peuvent être de deux natures différentes :

- spectrale : si la superposition des spectres de masse du composé cible et de la matrice révèle des pics à des masses identiques,
- matricielle : si la présence de la matrice induit des réactions en phase gazeuse qui aboutissent à la détection plus faible, voire nulle, d'un ou plusieurs pics caractéristiques de la molécule analysée.

Nous avons recherché dans la littérature quels effets pouvaient induire la présence d'une matrice dans l'analyse de composés organiques, en particulier sur la fragmentation. On trouve en général trois types de "matrice" ayant chacun une action différente :

- les matrices induisant un effet surfactant,
- les supports favorisant les dépôts en monocouches,
- les matrices polymériques hétérogènes ou non.

En FAB ou en SIMS, il est fréquent d'utiliser le glycérol pour aider à désorber une molécule organique intacte. Dans le cas particulier des matrices liquides, les interactions avec le soluté sont dynamiques (55), c'est à dire qu'elles induisent des hétérogénéités par diffusion du soluté vers la surface. La matrice se comporte comme un surfactant et un gradient de concentration se développe, ce qui aboutit à un enrichissement en surface du soluté. Le tableau VI présente quelques exemples de matrices utilisées en FAB et les familles de composés qu'elles permettent d'analyser (89).

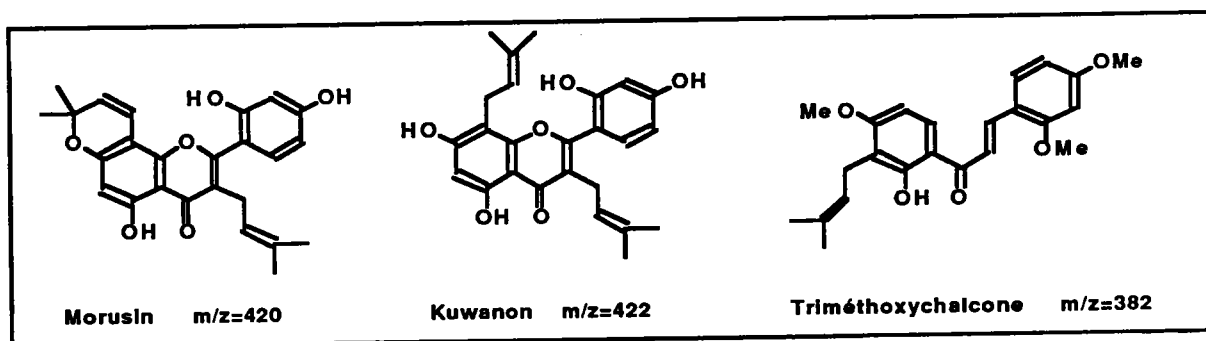
L'exemple suivant illustre comment l'effet surfactant, induit par la matrice, peut varier selon la nature de celle-ci. Par la technique FAB, Takayama et col. (90) ont évalué l'influence de la matrice sur la fragmentation de flavonoïdes (substances extraites des agrumes, utilisées comme tonique veineux et dans le traitement des accidents vasculaires). Les auteurs, afin de quantifier leurs expérimentations, ont

dans un premier temps enregistré les spectres de leurs composés cibles (Morusin, Kuwanon et Triméthoxychalcone) en *impact électronique* en fonction de l'énergie des électrons incidents et le rapport R, défini ci-dessous, est calculé à ces différentes valeurs d'énergie.

$$R = \frac{\sum_i I(m_i)}{I(M^+)}$$

$i = 1, 2, \dots$

- M^+ : pic moléculaire et $I(M^+)$ son intensité (en impact électronique)
- m_i : fragment caractéristique i de masse $m/z = m_i$ et $I(m_i)$ son intensité.



Pour chaque molécule cible *analysée par la technique FAB*, ce même rapport R est calculé en fonction de la matrice utilisée. La comparaison des valeurs de R obtenues par impact électronique en fonction de l'énergie des électrons incidents, et de celles obtenues en FAB permet de quantifier l'effet surfactant de la matrice liquide : plus le facteur est faible, plus l'effet surfactant est important. Ainsi, la fragmentation des composés cibles est plus faible avec les matrices m-NBA (Alcool m-Nitrobenzylique) et m-NBA/DTDE (2,2'-dithiodiéthanol) qu'avec les matrices glycérol, thioglycérol et "Magic Bullet" (cf tableau VI). Au regard de ces résultats, les auteurs suggèrent que les deux premières matrices citées induisent des conditions d'ionisation plus douces en favorisant la formation des ions moléculaires $(M+H)^+$, mais que le processus d'ionisation en FAB peut également être "dur", comme en impact électronique, avec certaines matrices liquides.

MATRICES	Formules	Additifs ou Cosolvants	Composés Analysés
GLYCEROL	HOCH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	DMSO, DMF, HCl, HCOOH, Acide formique, sels de métaux alcalins, sels d'ammonium	Peptides
		DMSO + HCl	Insuline
		NaCl	Carbohydrates
		HCl	Colorants au Xanthane
THIOGLYCEROL	HSCH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	-	Angiotensine et oligopeptides Complexes cationiques de fer et de technitium
		Acide Acétique	Hormone
		Diglycérol	Antibiotique Quinoxaline
AMINOGLYCEROL	NH ₂ CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	-	Certains Glycopeptides
ACIDE THIOGLYCOLIQUE	HSCH ₂ COOH	-	Certains Peptides (par exemple Angiotensine I)
POLYETHYLENE- GLYCOLS (PEG)		PEG 200	Di- et Trisaccharides
		AlkylPhénylPEG (Triton X100)	Porphyrines
TRIETHANOLAMINE	N(CH ₂ CH ₂ OH) ₃	-	Vitamine B12, Acides gras insaturés, Nombreux Surfactants dont les anioniques, certains dérivés de la Pénicilline
DIETHANOLAMINE	NH(CH ₂ CH ₂ OH) ₂	-	Oligosaccharides complexes
1,2,4-BUTANETRIOL	HOCH ₂ CH(OH)CH ₂ CH ₂ OH	-	Phosphatides
		Acide trichloroacétique ou phosphorique	Lecithine
THIO-2,2'-BIS ETHANOL	S(CH ₂ CH ₂ OH) ₂	-	Complexes d'Osmium et de Rhodium
2,4-DI-TERT- PENTYLPHENOL(DPP)	HOC ₆ H ₃ -(C(CH ₃) ₂ C ₂ H ₅) ₂	Acétonitrile	Catalyseur Rh(PPh ₃) ₃ Cl
ETHER-COURONNE		-	Complexes organométalliques
		Tétraglyme	Complexes organométalliques non volatiles
COMPOSES MISCELLAIRES			
- Dithiothreitol et dithioerythritol (3:1) (Magic Bullet)	HSCH ₂ CH(OH)CH(OH)CH ₂ SH	-	Composés organométalliques
-Hydrocarbures (PtEb:620-810K)	-	-	Anthracène et Pyrène
-Acide Phosphorique	H ₃ PO ₄	-	TétraphénylPorphyrines
-Ethyl et Butyl esters de l'acide citrique		(plus généralement, matrices oxydantes)	Complexes du cobalt (III)

Tableau VI : Quelques exemples de matrices utilisées en FAB et les composés pour lesquels elles sont préconisées.

DMSO : diméthylsulfoxyde et DMF : diméthylformamide

Dans le paragraphe précédent, le rôle prépondérant de la matrice, consistant à diminuer les énergies intermoléculaires, est mis en évidence. Les matrices liquides présentent évidemment l'avantage, du fait de la plus grande mobilité dans les liquides, de pouvoir appliquer la chimie classique en solution. Par contre, les échantillons analysés par la technique PDMS, principalement utilisée pour l'analyse des protéines et des peptides, sont "sous forme *solide*". L'équipe de Sundqvist (91) a montré que l'adsorption des molécules cibles sur un tapis de nitrocellulose, plutôt que l'électrospray des molécules, mélangées ou non à la glutathione, favorise la formation des ions moléculaires. Les molécules sont, dans le premier cas, réparties en **monocouches**. Par cette technique, la façon dont les molécules sont distribuées sur le film est importante et induit des différences dans les mécanismes d'ionisation et de désorption.

Le troisième type de matrice, dont il faut parler, est la matrice polymérique. Van Vaeck est à ce jour le seul à avoir publié à propos de la détection de molécules organiques dans une matrice polymérique par désorption laser (92,93). L'enrobage d'une molécule organique dans un polymère peut induire des effets secondaires sur deux plans distincts :

1-sur la préparation des échantillons : créations éventuelles de liaisons entre la cible et la résine et/ou de ségrégation de phase.

2-*pendant l'analyse LAMMA* : une dilution trop importante de la molécule cible par rapport à la matrice peut induire des effets non contrôlés : l'efficacité de l'ionisation n'est plus forcément la même que sur le composé pur et les mécanismes de l'ionisation peuvent être modifiés.

Les auteurs ont réalisé une simulation sur leur microsonde LAMMA 500 en prenant en sandwich une cible organique entre un support en résine épon et divers polymères d'épaisseurs variables (5 à 50 nm).

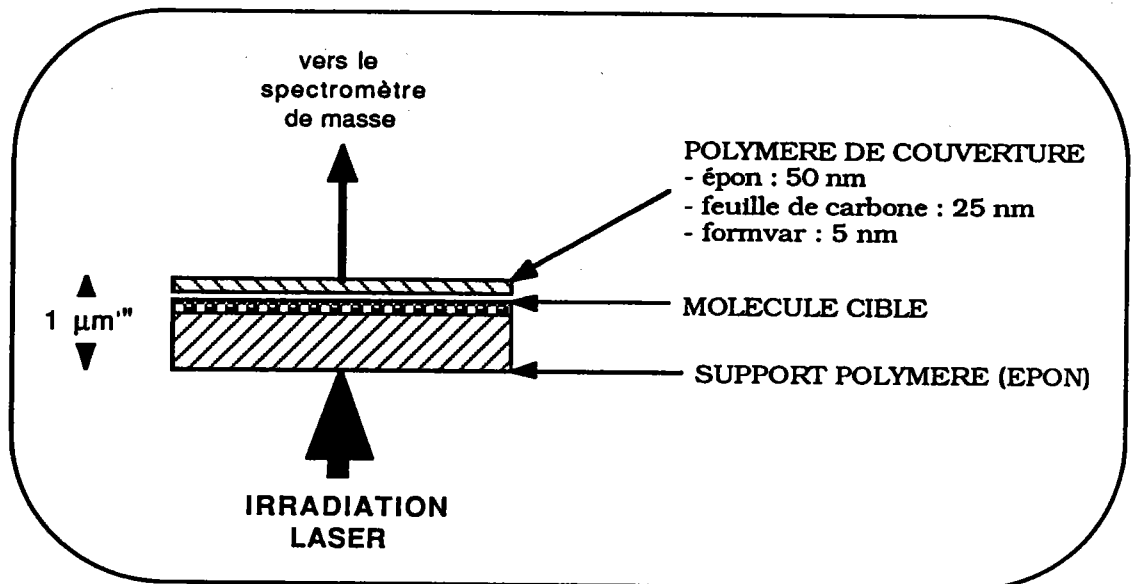


Schéma 2 : Simulation d'échantillons organiques enrobés dans une matrice polymérique.

Ils constatent qu'une limite en épaisseur du polymère de couverture existe au delà de laquelle le composé organique n'est plus détecté. Ce film polymérique, s'il est trop épais, semblerait provoquer, en plus d'une fragmentation importante de l'ion moléculaire, une perte très importante de la sensibilité (120 à 50 fois moins) ainsi qu'une diminution notable de la qualité du spectre.

Ces quelques exemples montrent bien l'influence que peut avoir une matrice sur la détection d'un composé organique. Autant une matrice choisie pour ses propriétés spécifiques (par exemple qui induit un effet surfactant ou qui favorise des réactions acide-base ou d'oxydo-réduction) peut avoir un effet contrôlé sur la désorption d'une molécule et sur sa fragmentation, autant une matrice polymérique quelconque, et à-fortiori biologique, risque de perturber la réponse du composé recherché. Il a fallu tenir compte de ces paramètres limitants pour aborder l'analyse des polymères dopés à l'amiodarone.

C - PARTIE EXPERIMENTALE : MICROSONDES LAMMA ET FTMS

1) Préparation des échantillons

Les deux microsondes diffèrent, entre autres (cf Partie II), par leurs configurations :

- la microsonde **LAMMA 500** opère en **transmission**, c'est-à-dire que l'échantillon est transpercé par le faisceau laser. L'angle entre le faisceau incident et le panache d'ions extraits fait 180 degrés. Le support le mieux adapté, compte tenu de cette géométrie, est la grille conventionnellement utilisée en microscopie électronique.

- la microsonde **FTMS** présente une configuration en **réflexion**. L'analyse des échantillons massifs est possible ; en effet, les ions sont créés et extraits du même côté de l'échantillon.

a) Cas de la microsonde **LAMMA 500**

La préparation des échantillons a nécessité quelques optimisations. En effet, l'irradiation directe des grains d'amiodarone déposés sur la grille en cuivre, elle-même recouverte d'un film de formvar qui augmente l'adhérence, ne donne pas de résultats fiables et reproductibles. Le compromis énergétique est difficile à trouver : l'énergie de réseau est difficile à vaincre alors qu'un excès d'énergie induit forcément une fragmentation excessive du produit. Finalement, l'amiodarone est mise en solution dans le méthanol à raison de 0,65 µg/µl. Un microlitre de cette solution est déposé sur la grille et un film d'amiodarone est obtenu en éliminant le solvant par un flux d'air chaud.

b) Cas de la microsonde FTMS

Le support utilisé est une plaque d'aluminium d'environ un centimètre carré de surface. La plaque est préalablement rincée avec de l'eau permutée puis avec de l'acétone. Un microlitre de la solution méthanolique d'amiodarone à 0,65 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ est déposé au centre de la plaque et le solvant est éliminé à la température ambiante. La difficulté majeure est l'obtention de dépôt homogène.

2) Optimisations des paramètres instrumentaux

a- Cas de la microsonde LAMMA 500

Pour chaque nouveau composé analysé, tous les paramètres instrumentaux sont ajustés. Outre la longueur d'onde et l'irradiance du laser, les plus sensibles sont les potentiels d'extraction des ions (94). Pratiquement, lors des analyses sur le LAMMA 500, les potentiels des lentilles extractrices, du TOF et du réflecteur sont réglés afin d'obtenir un signal d'intensité maximum pour le pic moléculaire (95). Les valeurs précises de ces potentiels, pour le cas de l'amiodarone, n'ont pas une grande importance : elles n'ont une réalité pratique que pour notre propre appareil et ont varié au cours du temps, suite aux diverses opérations de maintenance ou à l'apparition de jeux mécaniques. Les limitations instrumentales de cet appareil sont :

- d'une part, une limitation en masse : l'appareil n'est pas équipé d'une post-accélération suffisante (6 kV). Les ions de hautes masses, créés dans le plasma, n'ont pas assez d'énergie pour arriver jusqu'au détecteur ou pour induire l'émission des électrons.
- d'autre part, une résolution en masse $M/\Delta M$ de l'ordre de 500. Il est alors difficile d'interpréter certains spectres, car la lecture des plus hautes masses s'effectue à une unité de masse près.

b- Cas de la microsonde FTMS

De la même façon que sur la microsonde LAMMA, la longueur d'onde et l'irradiance du laser peuvent être modifiées. Les paramètres instrumentaux sont très nombreux et révèlent la complexité de la technique. Le déroulement d'une séquence d'analyse a été présenté dans la partie II et la signification des paramètres a été donnée. La liste des paramètres tels qu'ils apparaissent sur l'écran du NICOLET est donnée ici :

TTL = NAS 10/17/89	AM10 CONC + NICAC/AL	AMI.309	SLE
MOD = DIR	EXN = SLE	REC = SOURCE	
QNC = 500.000 msec.	QND = 1.000 msec.	VTR = 1.000 V	
BEM = 100.000 \rightarrow sec.	VNS = .000 V	VBM = 125.000 mV	
DL1 = .000 sec.	AT1 = 0. dB		
ES1 = .000 Hz	ET1 = 1.000 msec.		
EL1 = 367.461 KHz	EH1 = 367.461 KHz		←(éjection du césium)
ES2 = .000 Hz	ET2 = .000 sec.		
EL2 = .000 Hz	EH2 = .000 Hz		
DL2 = .000 sec.	AT3 = 0. dB	DL5 = .000 sec.	
ES3 = .000 Hz	ET3 = .000 sec.		
EL3 = .000 Hz	EH3 = .000 Hz		
ES4 = .000 Hz	ET4 = .000 sec.		
EL4 = .000 Hz	EH4 = .000 Hz		
	DL7 = .000 sec.	VCL = 1.000 V	
DL3 = 100.000 msec.	DL4 = 200.000 \rightarrow sec.	DEL = 200.000 \rightarrow sec.	
TTX = 833.333 \rightarrow sec.	TRX = 24.880 msec.	TIM = 1.127 sec.	
NSW = 10.	NIN = 10.	FNC = 10.	
NOP = 131072.	ZFL = 2.		
REF = 2.667 MHz	TP2 = .000 deg.	FDB = .000 Hz	
SWR = 3.200 KHz		AT2 = 0. dB	
BWI = 2.667 MHz	LOF = .000 Hz	HIF = 2.667 MHz	
MFV = 3.181 Tesla	LMA = 80.000 amu	RMA = 2.000 Kamu	
PRS = 1.7×10^0 .	PRA = 1.7×10^0 .		
ECC = .000 A	RPC = .000		

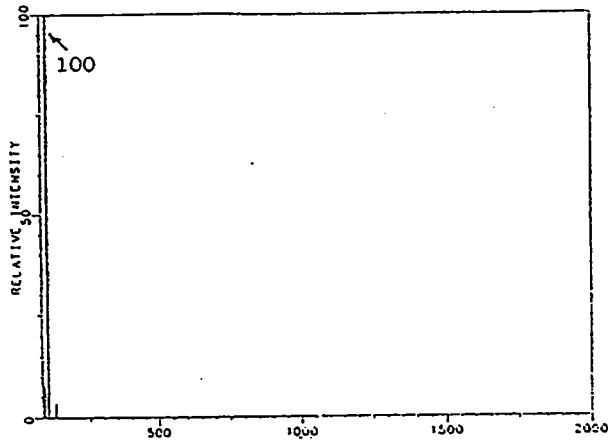
Un bref rappel des paramètres les plus importants est fait :

- Le laser excimère est déclenché au coup par coup. Il est possible d'accumuler les signaux en donnant plusieurs coups de laser successifs (NSW : nombre de coups).
- Entre deux impacts lasers, les phénomènes suivants surviennent dans la cellule :
 - * la cellule est vidée de tous les ions résiduels, en appliquant un potentiel de +/- 15 V (Quench : QNC).
 - * l'irradiation laser désorbe les molécules déposées sur le support (durée de l'irradiation Beam : BEM).
 - * les ions, piégés dans la cellule, sont excités par un

balayage de radio-fréquences. Ils entrent en résonance, créant ainsi un courant image sur les plaques réceptrices.

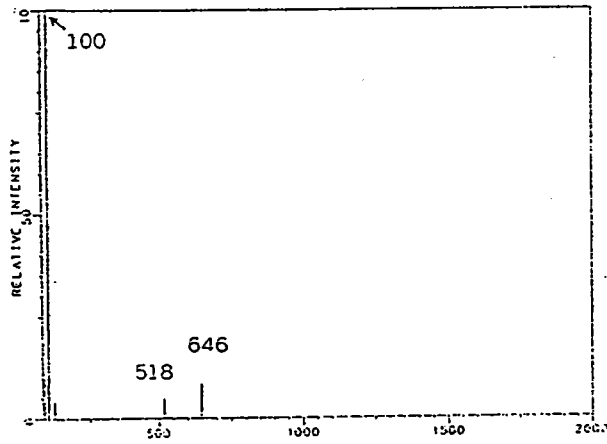
- Les délais entre chacune de ces étapes sont variables (Délais : DL1, DL2, DL3..). La fréquence de balayage de la radio-fréquence (SWR : SWEEP-Rate) peut être ajustée.
- La plage de masse est choisie avec les paramètres LMA (left mass : masse à gauche) et RMA (right mass : masse à droite).
- Des plages d'éjection peuvent être intercalées, pendant lesquelles les ions "indésirables" sont excités suffisamment fort pour que le diamètre de leur trajectoire devienne supérieur aux dimensions de la cellule : ils sont alors éjectés de la cellule (Plages d'éjection : EH1/EL1, EH2/EL2). L'excitation des ions, que cela soit pour les détecter ou pour les éjecter, peut être plus ou moins atténuée (AT1, AT2,..).

Les paramètres d'analyse ont été ajustés pour l'amiodarone. Les spectres 7 montrent effectivement l'influence qu'ils peuvent avoir. Pour favoriser les signaux de hautes masses, il est nécessaire de donner à SWR la valeur de 600 Hz. Le délai avant l'excitation, DL3, reste fixé à 100 ms. Par contre, le potentiel appliqué aux plaques de piégeage, V_{trap} , est ajusté à 0,25 V.



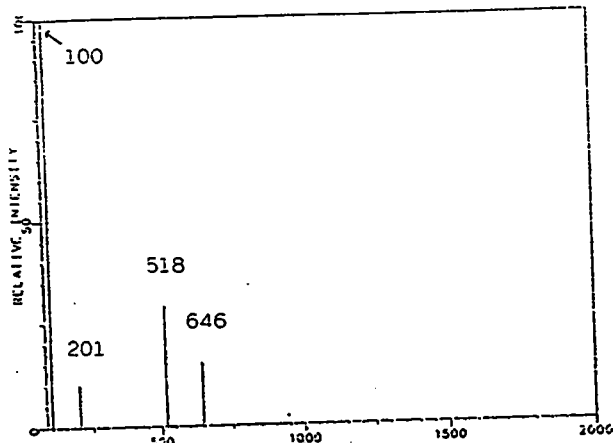
SWR=3,2 KHz

Vtr=1 V



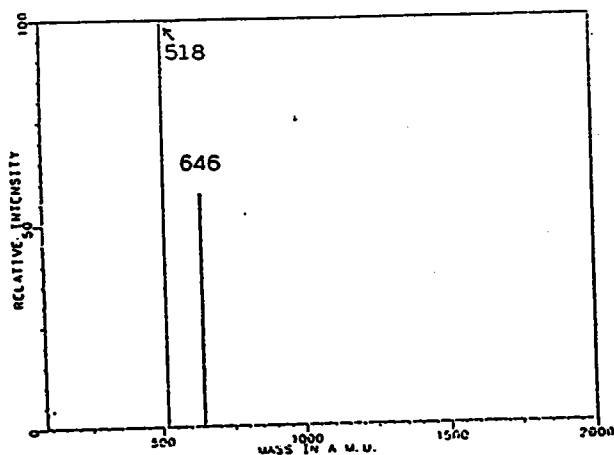
SWR=3,2 KHz

Vtr=0,25 V



SWR=1 KHz

Vtr=0,25 V



SWR=600 Hz

Vtr=0,25 V

Spectres 7 : Influence des paramètres FTMS sur la détection des pics de hautes masses de l'amiodarone additionnée d'acide nicotinique. (193 nm/2.10⁷W/cm²/NDP:64K/DL3:100ms)

3) Calibration des spectres LAMMA et FTMS

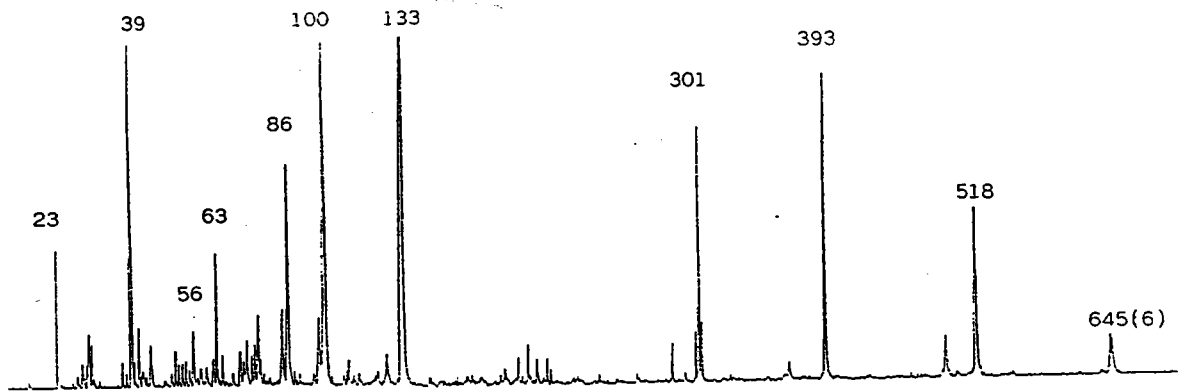
a- Spectres LAMMA

La résolution de masse de la microsonde LAMMA rend délicate l'interprétation des spectres de l'amiodarone en hautes masses. Les masses sont alors lues à une unité de masse près. Le pic moléculaire est à la masse 645 ou 646 (?!). Le moyen mis en oeuvre pour résoudre cette difficulté a été d'analyser un mélange d'amiodarone et d'iodure de césium. Le spectre est obtenu en enregistrant les informations provenant du détecteur toutes les dix nanosecondes, au lieu de cinquante. La plage de masse est effectivement plus restreinte, mais, en appliquant des retards judicieusement choisis, le spectre complet peut être calibré de proche en proche avec les clusters CsCl ($m/z=301$) et Cs₂I ($m/z=393$) (voir page suivante les spectres 8, et annexe 2).

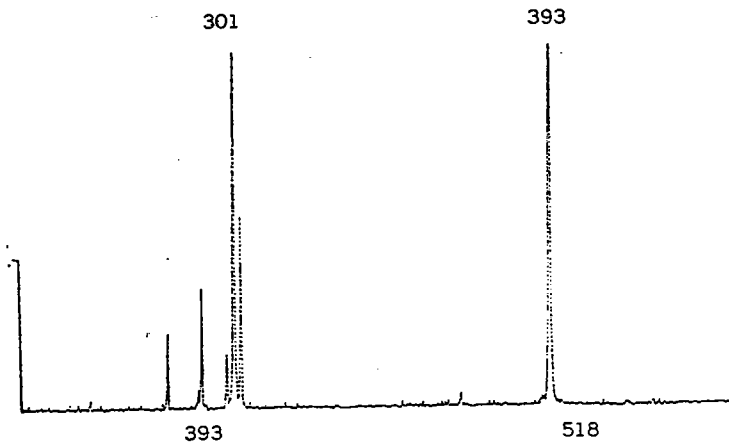
b- Spectres FTMS

Les analyses par microsonde FTMS ne posent pas ce problème de calibration, une des qualités de cet appareil étant justement son pouvoir de résolution. La calibration de l'appareil est réalisée classiquement en analysant la PFTBA (Perfluorotributylamine (C₄F₉)₃N). Sa fragmentation est connue et son pic de plus haute masse est 671 uma.

L'analyse de l'amiodarone *en mode direct (large bande)* dans la cellule source donne une résolution de 5000 à la masse 100, de 1000 à la masse 518 et de 750 à la masse 646. *En mode mixte (hétérodyne)*, la résolution de 200 000 pour le pic 518 sur la plage de masse (516-520) a été atteinte.



a) Spectre complet de l'amiodarone avec CsI
291.48 nm / un point toutes les 50 ns.

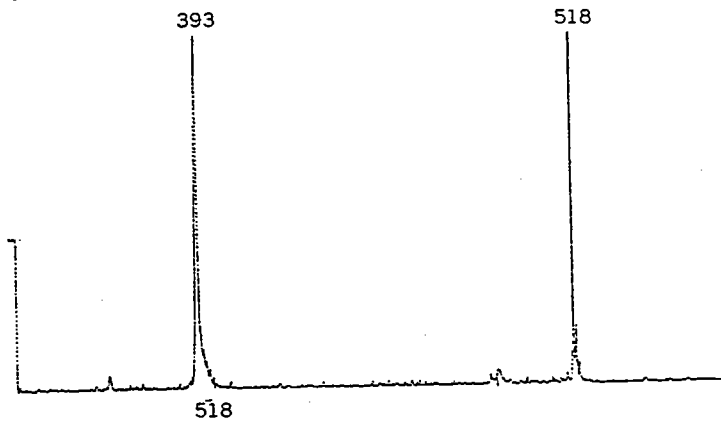


b) Spectre obtenu avec un retard de 6 μ s et un temps d'échantillonnage de 10 ns.

Pics connus : $m/z=301$ (Cs_2Cl)
 $m/z=393$ (Cs_2I)

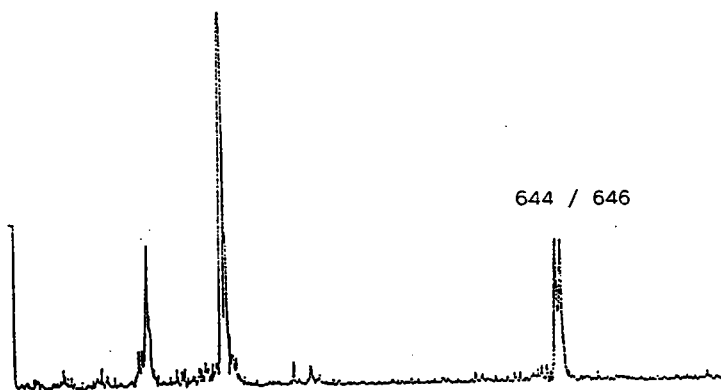
d'où

$$t_1 - t_2 = 29,2944. ((m_1)^{1/2} - (m_2)^{1/2})$$



c) Spectre obtenu avec un retard de 7 μ s et un temps d'échantillonnage de 10 ns.

DETERMINATION DU PIC $M/Z=518$



d) Spectre obtenu avec un retard de 8 μ s et un temps d'échantillonnage de 10 ns.

DETERMINATION DES PICS $M/Z=644$ e
646

Spectres 8 : Calibration des spectres LAMMA dans le cas de l'amiodarone additionnée d'iodure de césium
a-spectre de l'amiodarone sur la plage 0-740 uma
b-calcul de la constante k ($t=k\sqrt{m}$)
c-calibration du pic $m/z=518$
d-calibration du pic $m/z=646$

4) Spectres LAMMA et FTMS de l'amiodarone pure

a- Spectres LAMMA

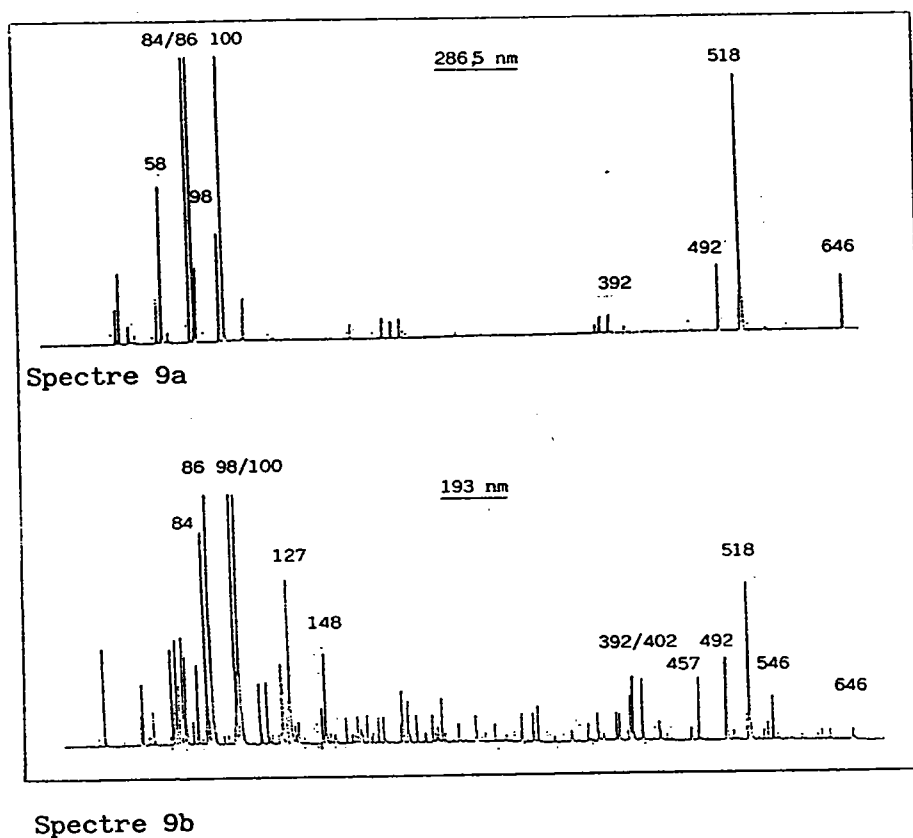
Les spectres LAMMA de l'amiodarone ont été obtenus à deux longueurs d'onde :

- 193 nm (laser excimère amené par fibre optique)
- 286,5 nm (laser à colorant pompé par le Nd-YAG)

A même irradiance, pour les deux longueurs d'onde différentes, les spectres présentent des fragmentations différentes :

à 286,5 nm (4,33 eV), lorsque le laser est focalisé (irradiance = 10^9 W/cm²), la fragmentation est intense et de nombreux clusters carbonés sont obtenus entre 30 et 200 uma. En défocalisant le laser (irradiance = 10^8 W/cm²), le spectre 9a est simplifié et seuls restent les fragments caractéristiques à $m/z = 86, 100, 518$ ainsi que le pic moléculaire (M+H)⁺ à $m/z=646$. A ceux-ci, peuvent venir s'ajouter les fragments de plus faible intensité de masses $m/z= 365, 392$ et 492. L'influence de la défocalisation du laser est indéniable.

à 193 nm (6,42 eV), la fragmentation est plus importante, ce qui est logique en terme de quantum d'énergie : les photons sont plus énergétiques qu'à 286 nm. Le laser excimère est amené par fibre optique. La durée du pulse laser est de 25 ns. L'irradiance optimale pour désorber l'amiodarone est d'environ 1 à $5 \cdot 10^7$ W/cm² (spectre 9b). Pour des valeurs supérieures, la fragmentation n'est pas significative tandis que pour des valeurs inférieures, l'intensité des signaux diminue et le seuil limite de désorption de la molécule est alors atteint. Muller et Verdun (95) avaient d'ailleurs montré que le seuil d'énergie de désorption des composés organiques diminue aux plus basses longueurs d'onde (228,8nm - 5,41 eV).



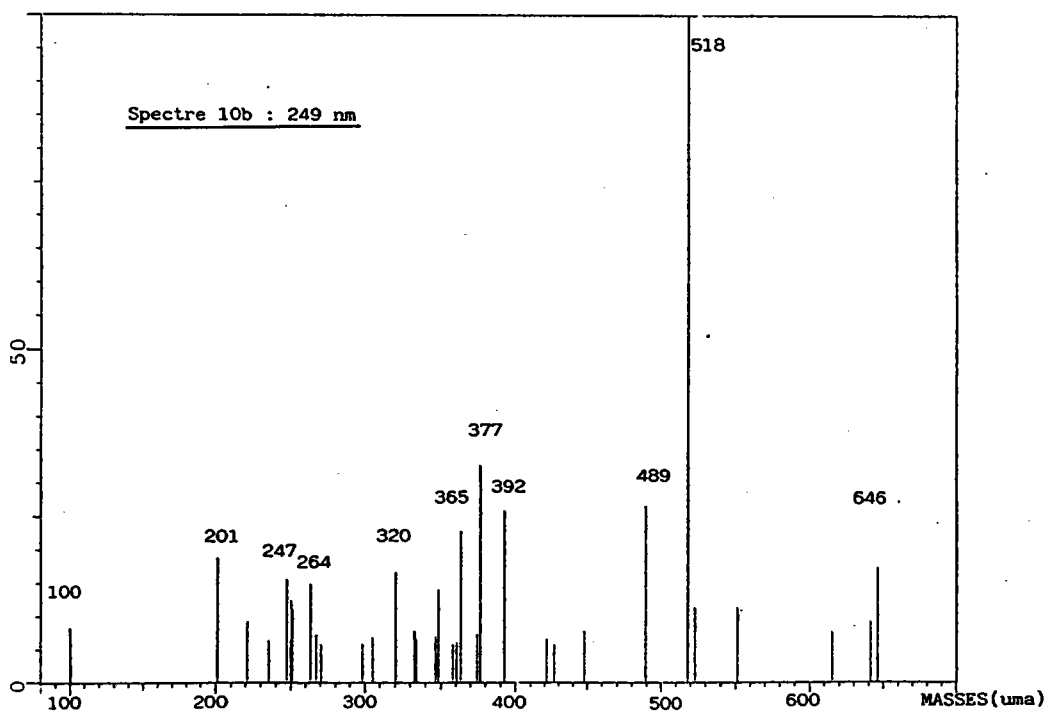
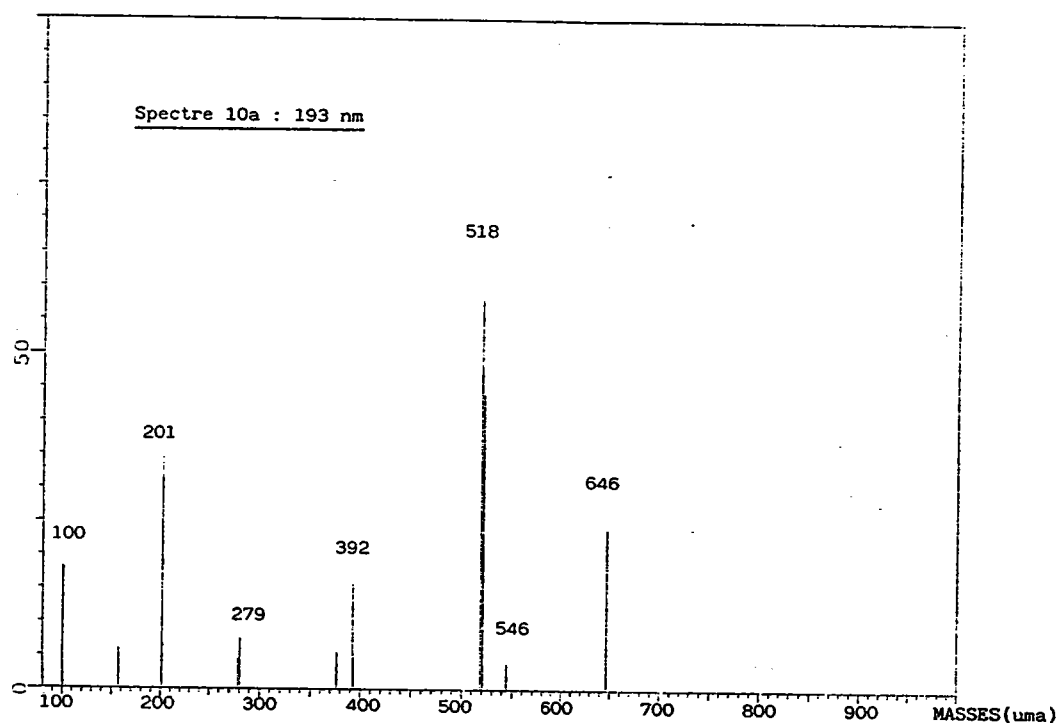
Spectres 9 : Spectres LAMMA de l'amiodarone pure en ions positifs à 286 nm et à 193 nm

b- Spectres FTMS

Les paramètres d'analyses ont été définis ci-dessus. Dans ces conditions, le spectre FTMS de l'amiodarone déposée sur un support aluminium présente une fragmentation typique. Les spectres présentés sont obtenus aux longueurs d'onde 193 et 249 nm. La valeur de l'irradiance dans les deux cas est de 7.10^6 W/cm².

A 193 nm, les fragments de masse $m/z=100$, 518 et 646 sont présents, auxquels s'ajoutent les fragments 158, 201, 392 et 546 (spectre 10a). Les fragments $m/z=201$ et 546 ont déjà été observés sur les spectres LAMMA à cette même longueur d'onde et en impact électronique également.

A 249 nm, le fragment majoritaire est le pic de masse 518. Les autres fragments de l'amiodarone ainsi que le pic quasimoléculaire $(M+H)^+$ sont aussi présents mais ils sont de moindre importance par rapport au pic de base (spectre 10b).



Spectres 10 : Spectres FTMS (a-193 nm b-249 nm)

D - ANALYSES DES POLYMERES DOPES A L'AMIODARONE

1) Présentation du travail

La matrice polymérique est l'étape obligatoire avant de rechercher la molécule cible dans les tissus biologiques. Un test préliminaire a été réalisé afin de s'assurer de la conservation de l'intégrité de l'amiodarone dans le monomère de la résine. Nous avons étudié ensuite les fragments spécifiques du polymère seul, afin d'évaluer les éventuelles interférences spectrales avec l'amiodarone. Puis, sur les spectres LAMMA en ions positifs des polymères dopés, les fragments caractéristiques de la molécule cible ont été recherchés en hautes masses, puis en basses masses. La seule information que nous apporte l'analyse en ions négatifs concerne la détection de l'iode.

2) Les échantillons

L'amiodarone est solubilisée dans un minimum de méthanol, lequel est alors ajouté, avant polymérisation, au monomère. Une gamme de blocs d'épon contenant 200, 500, 1000, 2000 et 4000 ppm d'amiodarone est obtenue. Cette valeur supérieure correspond à la valeur fréquemment admise comme *concentration localisée du composé dans un tissu biologique*, en supposant bien sûr qu'il existe des phénomènes de ségrégation. Des coupes de 0,25 μm d'épaisseur sont débitées à partir de ces blocs sur un microtome et recueillies sur des grilles de microscopie électronique.

3) Réactivité de l'amiodarone vis-à-vis du monomère

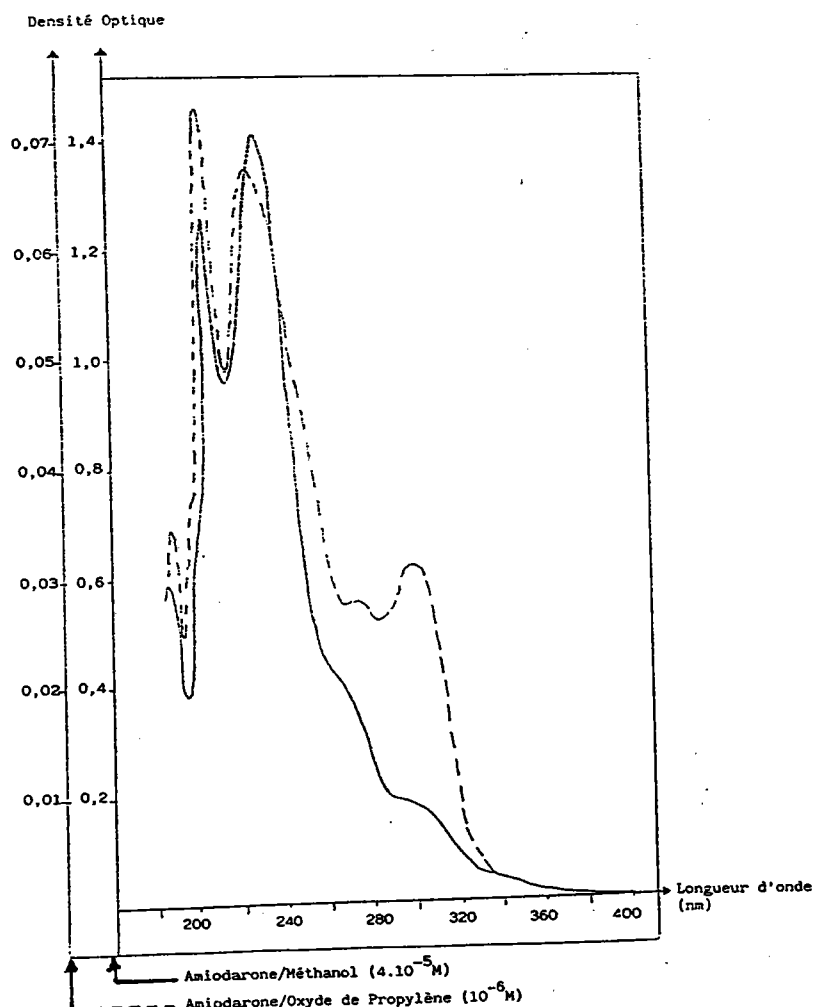
Ce petit test de réactivité a pour but de savoir si l'amiodarone reste intacte lorsqu'elle est mise en solution dans le monomère avant polymérisation. Un des monomères de la résine épon est l'oxyde de propylène :



Nous avons comparé le spectre d'absorption UV-Visible de l'amiodarone dans le méthanol et dans l'oxyde de propylène.

Le spectre d'absorption de l'amiodarone pure présente 5 bandes situées respectivement à 205, 242, 276, 282 et 310 nm, conformément au spectre que l'on trouve dans la littérature (146). La transition à 310 nm a un caractère ($n \rightarrow \pi^*$) et les transitions 276 et 242 nm, un caractère ($\pi \rightarrow \pi^*$) (96). Ces absorptions caractéristiques de l'amiodarone existent toujours sur le spectre UV de l'amiodarone en solution dans l'oxyde de propylène. La bande à 310 nm ($n \rightarrow \pi^*$) (électrons n de l'iode) donne un coefficient d'absorption molaire comparable à celui obtenu lorsque la molécule est en solution dans le méthanol (cf spectre 11).

Ce test de spectroscopie ultraviolette permet de conclure que la molécule organique a conservé son intégrité dans le solvant d'inclusion de la résine.

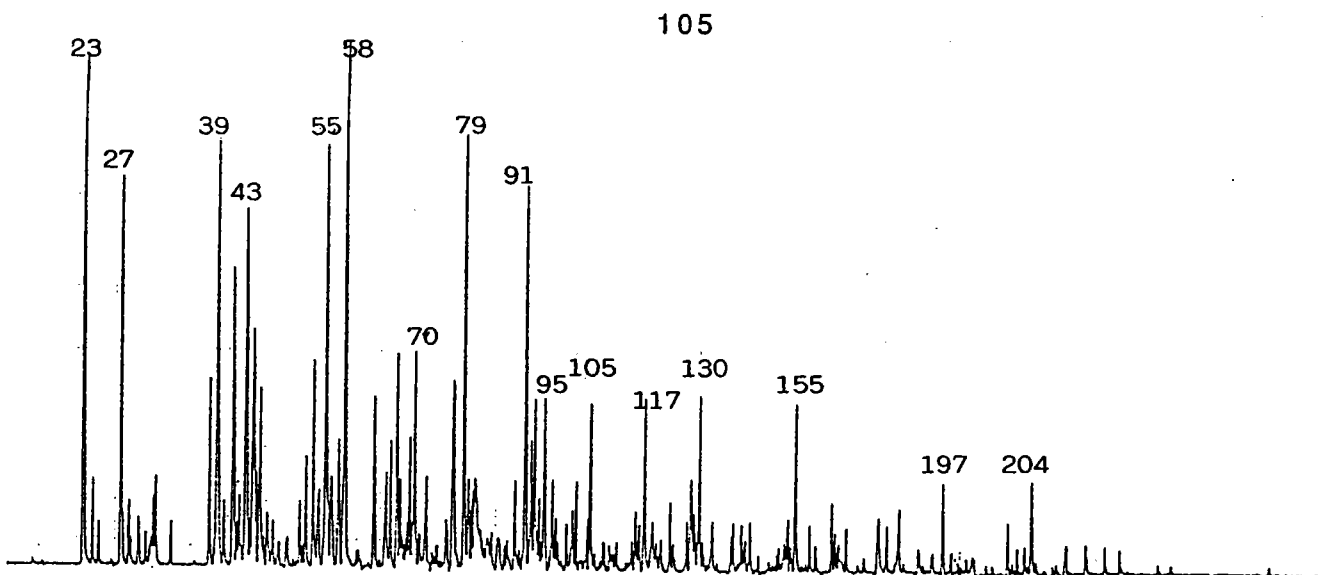


Spectre 11 : Spectre UV de l'amiodarone dans le méthanol et dans l'oxyde de propylène

4) Analyses LAMMA des polymères dopés en ions positifs et négatifs

a - Analyse LAMMA de l'épon seul

Le spectre 12 est représentatif du signal obtenu en perforant les coupes de polymère non dopé. On constate qu'il n'existera à priori pas d'interférence spectrale avec les fragments de l'amiodarone pure. Les signaux de masses supérieures à $m/z=200$ sont pratiquement inexistantes et non significatifs, car de très faible intensité.

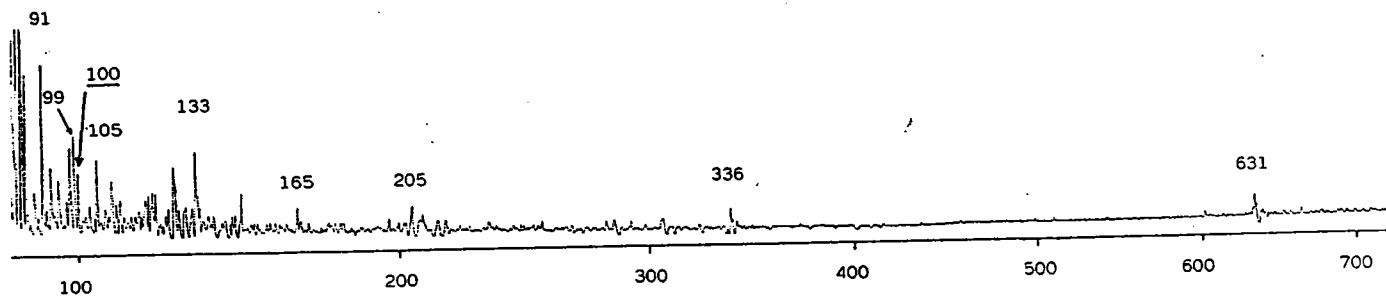


Spectre 12 : Spectre LAMMA de la résine époxy en ions positifs

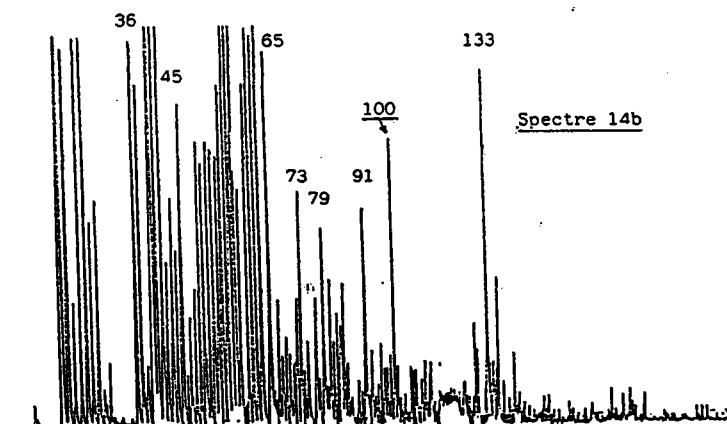
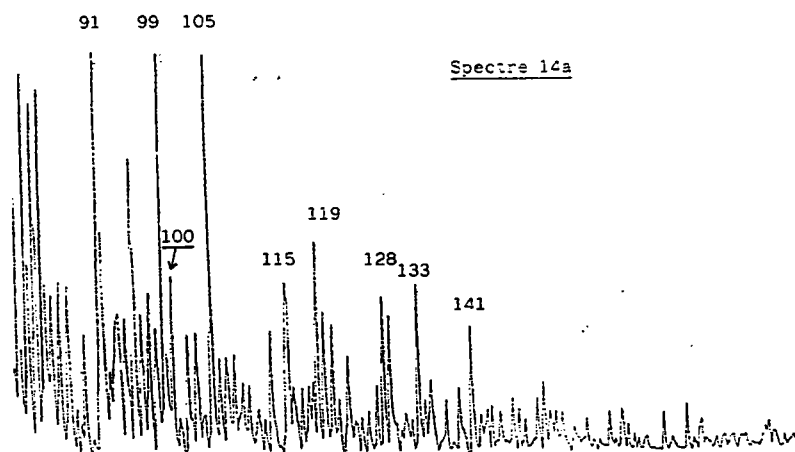
b- Analyses LAMMA en ions positifs des polymères dopés

Le spectre 13 illustre le type de réponse obtenu avec l'échantillon de plus forte concentration. Aucune information sur la présence d'amiodarone n'est apportée par ce spectre en ions positifs : ni par le pic moléculaire, ni par aucun fragment caractéristique de haute masse, quelles que soient les conditions expérimentales (variation des potentiels, variation de l'irradiance, variation de la focalisation du laser, variation de la longueur d'onde...).

L'intérêt a alors été porté sur le pic de masse $m/z=100$. A cette valeur, aucun pic attribuable à la matrice n'a jamais été relevé. Sur les spectres 14a et 14b, on constate qu'à faible énergie ($E < 1 \mu\text{J}$ sur l'échantillon), le signal correspondant au pic de masse $m/z=100$ se confond avec le bruit de fond et n'est pas, de ce fait, significatif. A haute énergie ($E \approx 4 \mu\text{J}$ sur l'échantillon), le signal apparaît effectivement, mais de manière tout à fait aléatoire. Ceci laisse penser que ce signal, lorsqu'il existe, peut être le résultat d'une recombinaison en phase gazeuse plutôt qu'un fragment réel de l'amiodarone.



Spectre 13 : Spectre LAMMA complet de l'épon dopé à l'amiodarone (4000 ppm). Irradiance : 108W/cm². Longueur d'onde : 286,5 nm



Spectres 14 : Recherche du fragment caractéristique de masse $m/z=100$ sur le spectre en ions positifs de la coupe d'épon dopé en amiodarone à 4000 ppm (286,5 nm)
 a- énergie <math>< 1 \mu\text{J}</math> (irradiance <math>< 108 \text{ W/cm}^2</math>)
 b- énergie $\approx 4 \mu\text{J}$ (irradiance 109 W/cm²)

c- Analyses LAMMA en ions négatifs des polymères dopés

L'amiodarone est caractérisée chimiquement par deux atomes d'iode qui représentent 35% du poids moléculaire et qui sont facilement détectables ($m/z=127$). En analyse LAMMA, les signaux en ions négatifs sont de manière générale, à sensibilité égale, plus intenses qu'en ions positifs. Pour cette raison, une étude annexe a été entreprise : il s'agit de localiser l'amiodarone grâce à la détection de l'iode en ions négatifs, puis en inversant les potentiels, l'irradiation de la région très proche du précédent impact laser devrait donner naissance à un spectre contenant les fragments caractéristiques de la cible.

L'iode est détecté en ions négatifs sur toute la gamme des coupes. Une corrélation entre l'intensité du signal à $m/z=127$ et la concentration en amiodarone dans la coupe a été recherchée.

Les spectres ont été enregistrés dans les mêmes conditions expérimentales :

- potentiels d'extraction : TOF 3000V - Lentille 1600V - Réflecteur 770V
- énergie sur l'échantillon : 4 μ J par pulse laser
- diamètre de l'impact laser : quelques microns
- irradianance : 3.10⁸ W/cm²
- longueur d'onde : 286,5nm

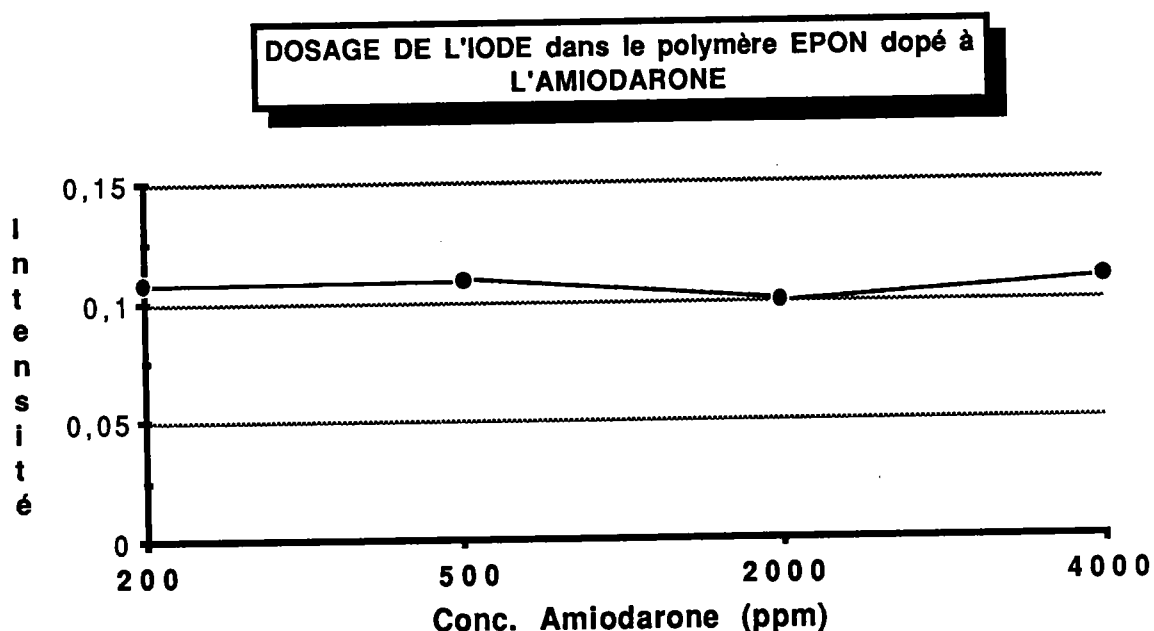
On définit X comme le rapport de l'intensité absolue du pic de masse $m/z=127$ sur la somme des intensités absolues de pics attribuables à la matrice. Ce rapport permet de s'affranchir de la variation de la quantité totale de matière vaporisée d'un impact laser à l'autre.

$$X = \frac{I_{127}}{I_{73} + I_{84} + I_{97}}$$

Pour chaque concentration de la gamme, 10 spectres représentatifs de l'ensemble des spectres obtenus sont retenus ; les rapports X sont calculés pour chacun d'entre eux. L'intensité relative \bar{x} du pic $m/z=127$ (ion I^-) en est la moyenne et s l'écart-type. Nous obtenons le tableau suivant et la courbe 1 correspondante :

Concentration (ppm)	Intensité du pic 127	+ / - Ecart-type
4000	0,109	0,052
2000	0,100	0,041
1000	0,240	0,100
500	0,110	0,052
200	0,108	0,048

Tableau VII : Intensité relative \bar{x} du pic de masse $m/z=127$ en fonction de la concentration en amiodarone dans le polymère dopé.



Courbe 1 : Valeurs des intensités relatives du pic $m/z=127$ en fonction de la concentration en amiodarone dans la coupe polymérique.

Il est surprenant que l'intensité relative \bar{x} reste pratiquement constante. Pour expliquer ceci, deux phénomènes éventuellement conjugués, une osmose et une saturation du système de détection, sont envisageables :

- la solubilisation de l'amiodarone dans le monomère lors de la préparation des coupes a peut-être provoqué la rupture des liaisons carbone-iodure dans la molécule. Mais cette hypothèse est fort peu probable puisque le spectre UV de l'amiodarone dans l'oxyde de propylène est inchangé.
- l'autre hypothèse est d'ordre technique. Les ions iodures sont formés dans le plasma en très grande quantité et une saturation du système de détection pourrait survenir.

5) Analyses FTMS des polymères dopés

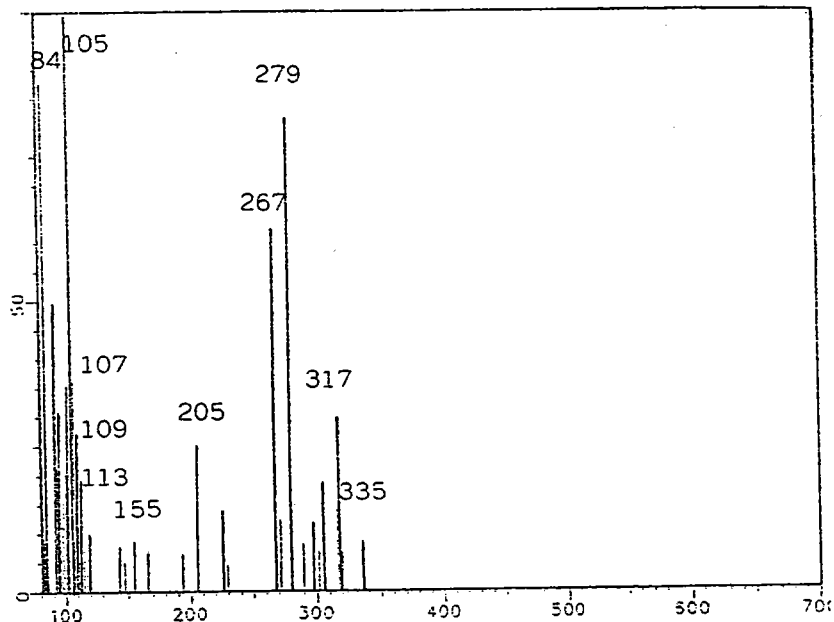
a) **Présentation des tests**

Les précédentes analyses ont été effectuées sur la microsonde LAMMA 500, les échantillons se présentant par nécessité sous forme de coupes minces. L'analyse directe des blocs de polymères dopés est alors réalisée sur la microsonde FTMS, adaptée par sa **configuration en réflexion** à l'analyse des échantillons massifs. La résine épon ainsi qu'un autre polymère d'enrobage ont été testés.

Pour ces expériences, la longueur d'onde utilisée est 193 nm et l'énergie sur l'échantillon est de 12,5 μ J par pulse laser. Le faisceau laser est peu à peu défocalisé **afin de moduler l'irradiance**. Les valeurs des paramètres instrumentaux correspondent à celles qui ont été optimisées.

b) Résine EPON

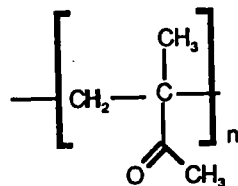
Le bloc d'épon dopé à l'amiodarone à 4000 ppm est analysé dans les conditions expérimentales précédemment décrites. Quelle que soit la valeur de l'irradiance ($5 \cdot 10^6$ à $5 \cdot 10^7$ W/cm²), l'amiodarone n'est jamais détectée, même en accumulant les tirs laser au même endroit pour analyser en profondeur (spectre 15).



Spectre 15 : Bloc d'épon dopé à l'amiodarone (4000 ppm) analysé par FTMS - 193 nm - $2 \cdot 10^7$ W/cm²

c) Résine TECHNOVIT

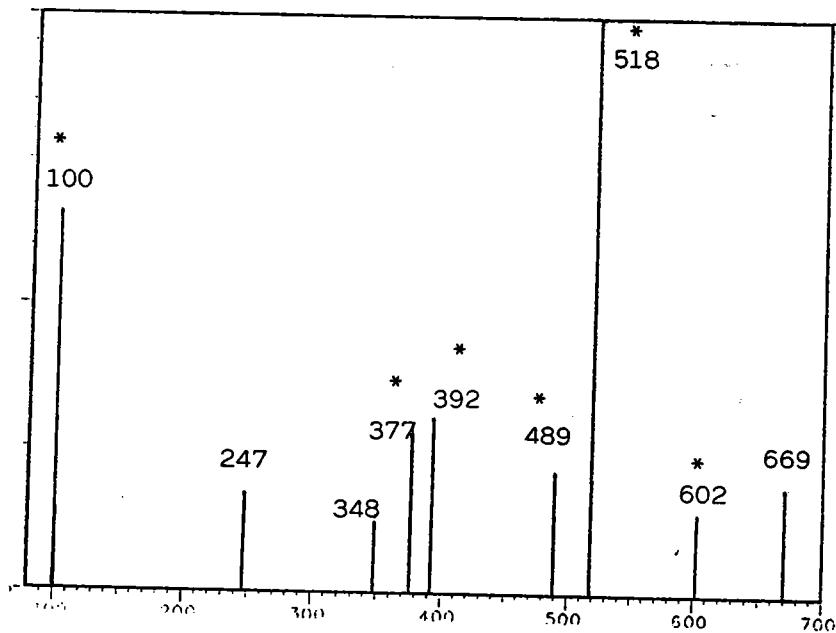
La même expérience est réalisée en préparant un bloc avec une autre résine d'enrobage dénommée "technovit" et constituée d'un polymère acrylique :



La polymérisation s'obtient à température ambiante et elle est instantanée lorsque les deux composants (solide et solvant) sont mis en contact. L'intérêt d'une telle résine est multiple : l'amiodarone est

introduite directement dans le solvant, l'homogénéité étant assurée par un brassage énergétique. Les interférences spectrales avec l'amiodarone sont peu nombreuses car il y a peu de recombinaisons. Ensuite la préparation est extrêmement rapide.

Une concentration en amiodarone dans la résine supérieure à 4000 ppm est choisie pour réaliser le premier test : 20 000 ppm. Lorsque le laser est focalisé (irradiance : 7.10^7 W/cm²), le spectre de masse correspondant n'est constitué que de signaux dûs à des clusters non significatifs. Par simple défocalisation, l'irradiance atteint environ 2.10^7 W/cm² et les fragments caractéristiques de l'amiodarone à $m/z=100, 392, 489, 518, 602$ apparaissent (spectre 16). En diminuant la concentration de l'amiodarone dans la technovit à 10 000 ppm, plus aucun fragment n'est détecté.



Spectre 16 : Analyse d'un bloc de technovit dopé à l'amiodarone (20 000 ppm) - 193 nm - Irradiance : 2.10^7 W/cm² (* fragment connu de l'amiodarone)

6) Conclusions sur l'analyse des polymères dopés à l'amiodarone

L'analyse de polymères dopés à l'amiodarone par LAMMA 500 n'a pas permis de détecter les fragments caractéristiques du composé organique en ions positifs. En ions négatifs, quelle que soit la concentration dans le polymère dopé, le signal correspondant à l'iode est pratiquement constant.

Une première hypothèse a été avancée. Certaines liaisons C-I sont rompues pendant la polymérisation et l'iode, sous forme libre, peut être dissout dans l'eau pendant la phase de récupération des coupes. Elle semble toutefois peu probable au regard des résultats obtenus par test de spectroscopie ultraviolette et, également, parce que le temps de séjour réel des coupes dans l'eau est très faible.

Une autre hypothèse, beaucoup plus probable, serait d'ordre instrumental. En ions négatifs, les courants sont beaucoup plus importants qu'en ions positifs, car le rendement d'ionisation par capture électronique est meilleur. Il peut y avoir saturation du détecteur. En effet, s'il se forme trop d'ions, le taux d'électrons secondaires émissibles par unité de surface sur le détecteur est dépassé.

E - ANALYSES LAMMA DES COUPES HISTOLOGIQUES

1) Introduction

Le but ultime de notre travail est la localisation in-situ d'un médicament (composé organique) comme l'amiodarone dans un échantillon tissulaire **par une information spectrométrique qui lui sera propre**. L'amiodarone se fixe préférentiellement sur les

phospholipides du fait de son caractère amphiphile (elle présente une partie lipophile et une partie hydrophile) (voir partie II). Les phospholipides sont présents dans toutes les cellules vivantes. Ils sont insolubles dans l'eau, mais solubles dans les solvants organiques tels que le diéthyl-éther, le chloroforme ou le benzène.

2) Généralités sur la préparation des tissus biologiques

a- Introduction

La plupart des cellules dans l'organisme vivant contiennent plus de 70% d'eau. L'observation et, par conséquent, l'analyse des coupes histologiques placées dans un appareil travaillant sous vide nécessitent une préparation spécifique qui lui permettra de conserver sa structure. Pour cela, l'échantillon doit être fixé puis déshydraté, éventuellement congelé... La fixation, la déshydratation, suivies de l'enrobage dans une résine, constituent les étapes obligatoires pour la majorité des échantillons biologiques. *La condition principale à respecter pour analyser un tissu biologique est d'en maintenir l'intégrité géométrique et physique dans ses détails les plus fins.* L'élimination de l'eau conduit à des changements de la structure biologique, aussi quelles que soient les précautions prises, dans tous les cas l'échantillon sera modifié. L'historien a conscience qu'il introduit automatiquement des artefacts et il doit en tenir compte.

Par exemple, une fois les tissus plongés dans les solvants organiques ou dans les solutions aqueuses, les électrolytes solubles (Na, K, Cl) ne se retrouvent pas dans la situation qu'ils avaient in-vivo. Les liaisons existant entre les éléments et les structures organiques (protéines,...), sont très complexes et encore peu comprises. Les éléments coexistants sous formes liée et libre ne sont pas affectés de

la même façon. Les histologistes utilisent classiquement les alcools, les aldéhydes, l'acétone pour la fixation ; la paraffine, le polystyrène, le polyméthacrylate de méthyle pour l'enrobage ; le xylène, le toluène, le benzène, le chloroforme pour laver les tissus.

b- Fixation

Le but de la fixation est de préserver la structure de la cellule à l'état vivant et d'éviter ensuite tout dérangement lors de l'enrobage, du découpage ou de l'analyse. Il existe deux types de fixation : physique ou chimique.

- Dans le premier cas, le tissu est congelé, donc fixé physiquement. Ensuite il est soit lyophilisé, soit fixé une seconde fois par voie chimique.

- Dans le second cas, le tissu frais (un cube d'environ un mm³) est placé dans un bain de fixateur tamponné : glutaraldéhyde, formaldéhyde, oxyde d'osmium ou permanganate.

- * Le glutaraldéhyde $\text{HOC}(\text{CH}_2)_3\text{COH}$ est un dialdéhyde très actif qui fixe les protéines par ses deux fonctions aldéhydiques $-(\text{H})\text{C}=\text{O}$. Ceux-ci induisent une réaction classique de réduction ; il s'agit d'un processus très rapide.

- * Le tétroxyde d'osmium OsO_4 agit par réaction d'oxydation ; il permet la fixation des lipides mais il est peu pénétrant.

Les fixateurs ne sont pas des conservateurs.

Pour conserver les échantillons traités, il faut y adjoindre un autre composé. Il existe essentiellement deux types de conservateurs :

- soit à base de phosphate (Na_2HPO_4)
- soit à base de cacodylate ($\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2$)

c- Déshydratation

Le tissu fixé est placé pendant un certain temps dans un bain de solvant ; par exemple alcools, acétone...

d- Inclusion

L'inclusion est, avant tout, une étape indispensable vers la réalisation de coupes minces. Elle consiste à remplacer le milieu aqueux intracellulaire par un milieu solide amorphe permettant d'augmenter la consistance mécanique des tissus fixés afin de les débiter sans qu'ils ne se déchirent ni s'écrasent. Des problèmes de tension interfaciale et de miscibilité de solvants ont conduit à optimiser les séquences successives d'immersion dans des mélanges de solvants aboutissant finalement au monomère ou au prépolymère de la résine d'inclusion. De cette façon, l'agent déshydratant est peu à peu remplacé par le solvant du milieu enrobant jusqu'à ce que le tissu en soit totalement imprégné.

Une des résines les plus communément utilisées est la résine époxy. La polymérisation est amorcée par un mécanisme anionique à partir d'un monomère époxydé tel que l'oxyde d'éthylène, le 1,2-époxypropylène... Les produits commerciaux utilisés sont pratiquement toujours des prépolymères plus ou moins visqueux auxquels sont mélangés un "initiateur" et un accélérateur (par exemple, le tris-Diméthylaminoméhyl phénol -DMP).

e- Contraste des coupes

Les effets de contraste sont le résultat du rendement différent de l'émission secondaire en chaque point de l'échantillon que balaye la sonde. Les composés utilisés fréquemment comme contrastants sont le

tétraoxyde d'osmium, l'acétate d'Uranyle, des sels de plomb, des sels et complexes d'argent, l'acide phosphotungstique, des sels de mercure, de bismuth, de césium, des sels auriques et platiniques. De ce fait, cette technique exploite les interactions sélectives entre des sites macromoléculaires et les divers sels de métaux lourds, permettant ainsi de contraster préférentiellement certaines zones, ce qui est très utile pour le repérage au microscope.

f- Cryo-ultramicrotomie

La congélation d'échantillons biologiques permet de fixer par le froid et conduit à un durcissement des structures, ce qui est également recherché lors de l'inclusion dans une résine plastique. Toutefois, il est encore nécessaire de post-fixer chimiquement les échantillons à observer au microscope électronique. La congélation offre l'avantage d'écourter les durées d'action et de diminuer les concentrations en fixateurs.

Lors de la congélation, la solidification de la phase liquide du cytoplasme ne garantit pas la préservation des structures et des ions diffusables in-situ. La formation des cristallites de glace dans le tissu constitue un écueil majeur. L'idéal est d'éviter toute cristallisation et de convertir les fluides des cellules en un état solide aqueux : état vitreux. Mais seuls les petits échantillons (<5 μ m) peuvent être vitrifiés. Aussi, la seule alternative est de créer un état microcristallin dans lequel l'eau se transforme en un très grand nombre de minuscules cristaux de glace qui éviteront l'éclatement des cellules. Ceci est possible sur environ 1 mm³. Un grand nombre de problèmes liés à l'eau de cristallisation peut être surmonté en additionnant à l'eau des substances miscibles antigels: ce sont des composés de bas poids moléculaires (glycérol, DMSO,...) suffisamment efficaces pour être

utilisés comme additifs dans les études morphologiques. Ces molécules appelées cryoprotectants évitent la formation de cristaux de glace intracellulaires (97).

Pratiquement, le bloc de tissu est congelé directement et sectionné sans inclusion. Les coupes fraîchement sectionnées sont récupérées sur une gouttelette d'un fluide non congelable comme par exemple un mélange eau-diméthylsulfoxyde ou une solution concentrée de saccharose dans l'eau.

3) Préparation des coupes histologiques

Tous nos échantillons biologiques sont préparés par la Société Sanofi, qui injecte la substance aux animaux, prélève les tissus et les prépare en vue de l'analyse par spectrométrie de masse. Nos études sont réalisées sur des chiens et des rats. La dose d'amiodarone administrée est généralement :

- 100 mg par kg pendant 15 mois pour les chiens adultes (*Beagle*)
- 150 mg par kg pendant 10 jours pour les rats adultes (*Fisher 344 strain*).

Dans les deux cas, des animaux non traités sont réservés pour les coupes témoin. Les prélèvements sont réalisés par biopsie pour les chiens et sur les rats occis. Les tissus prélevés sont préparés selon une technique conventionnelle : les blocs de tissus (<1mm³) sont placés une nuit dans une solution de glutaraldéhyde à 4% tamponnée avec du cacodylate de sodium (0,2M). Ils sont ensuite lavés et déshydratés par des bains successifs dans des solutions éthanoliques graduellement remplacées par le solvant d'inclusion de la résine époxy. Des coupes de 0,25 µm d'épaisseur sont sectionnées. Ces coupes ultra-fines, recueillies sur grilles, sont placées dans des boîtes à contraste,

spécialement conçues pour la microscopie électronique (Balzers). Une post-fixation par le tétr oxyde d'osmium (solution à 2% additionnée de saccharose, tamponnée avec du cacodylate de sodium) permet d'obtenir une meilleure préservation des échantillons ainsi qu'un meilleur contraste.

Les coupes préparées en *ultracryomicrotomie* ont également été analysées sur LAMMA. Le bloc de tissu fraîchement prélevé est congelé et fixé par le glutaraldéhyde, puis éventuellement par le tétr oxyde d'osmium.

4) Protocole d'analyses

Nous avons travaillé conjointement avec l'équipe de Sanofi pour le repérage par microscopie électronique des coupes histologiques avant et après les analyses par microsonde LAMMA. Le protocole d'analyse se déroule comme suit.

* Première étape : fabrication et repérage des coupes neuves

Les zones à repérer sont celles qui sont riches en phospholipides (car fixation préférentielle de l'amiodarone). Elles sont repérées par microscopie électronique à balayage (MEB) et photographiées. En effet, les phospholipides sont reconnaissables (zones sombres) lorsque le tissu a été fixé avec le tétr oxyde d'osmium.

* Deuxième étape : analyses LAMMA

Les coupes sont analysées par microsonde LAMMA. Le microscope à immersion équipant le spectromètre de masse ne permet pas actuellement de visualiser correctement la coupe et une

reconnaissance de la structure est difficile, voire impossible surtout par des néophytes. Le repérage photographique préalable des zones intéressantes permet de cibler précisément les zones d'analyse. Dans les ganglions mésentériques, les zones riches en phospholipides sont nombreuses, contrairement aux poumons. Aussi dans le premier cas, suffit-il de faire une quarantaine d'impacts laser dans la zone intéressante alors que, dans le second cas, un balayage plus serré est nécessaire. Chaque impact laser est repéré géographiquement, indexé et le spectre de masse correspondant est enregistré.

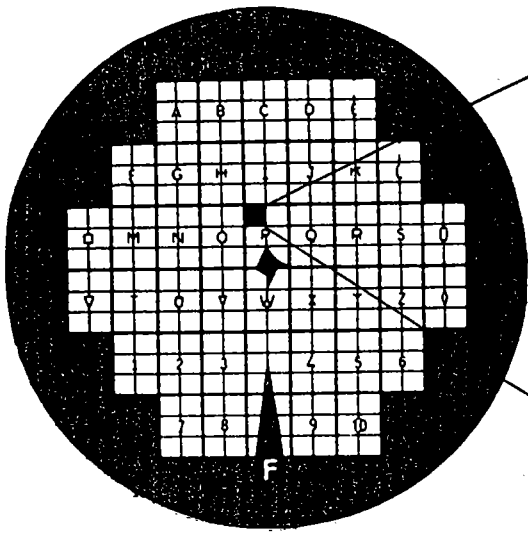
* Troisième étape : **Photographies des zones irradiées**

Une nouvelle observation au microscope électronique permet de repérer exactement les zones irradiées et de les photographier.

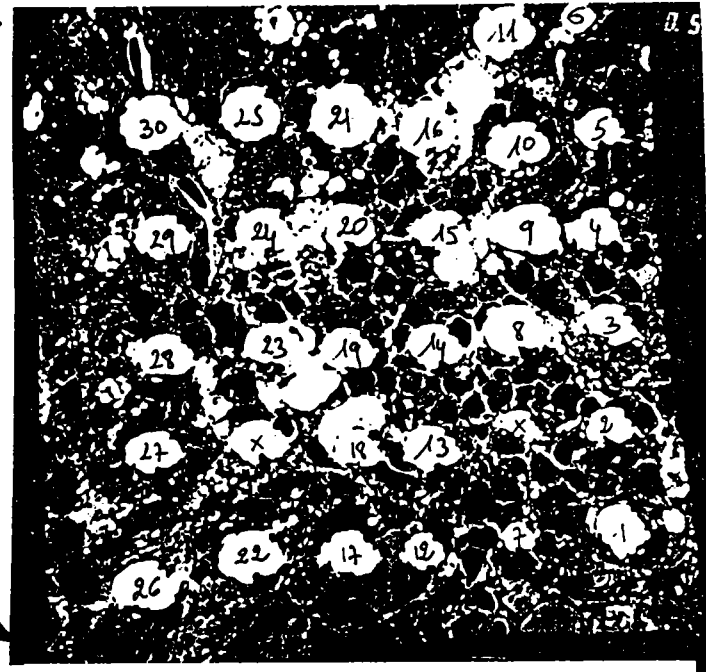
* Quatrième étape : **Analyses des résultats**

La comparaison des photographies avant et après l'irradiation laser permet de connaître la nature du tissu détruit. Ainsi la confrontation de nos spectres de masse avec le lieu géographique d'où ils sont issus (zone riche ou non en phospholipides) permet d'interpréter les pics obtenus et d'en tirer les conclusions.

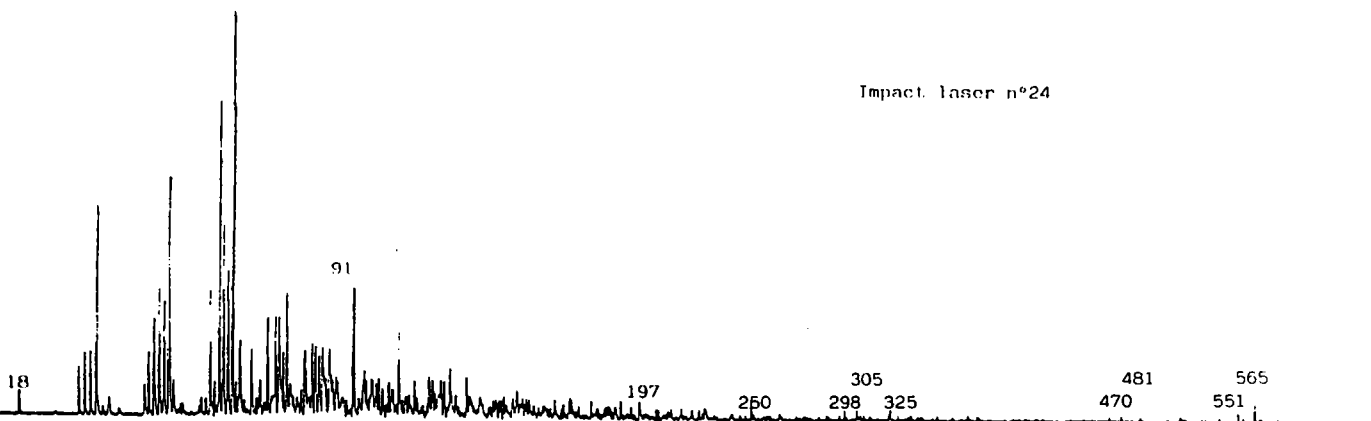
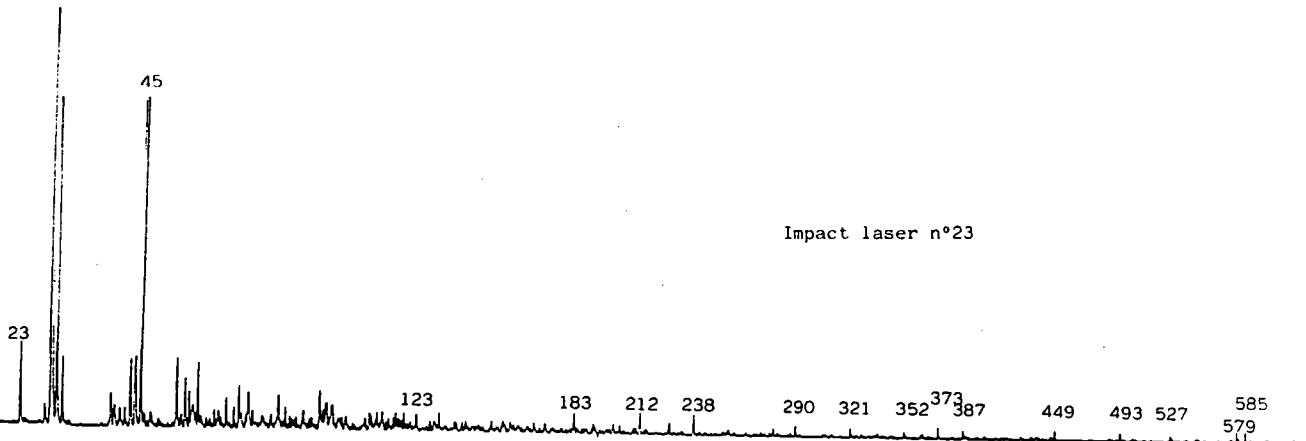
Un exemple est donné page suivante pour illustrer ce travail :



Ganglion Mésentérique:
Coupe déposée sur une grille
de microscopie électronique



Photographie après les impacts laser



Spectres LAMMA correspondant aux impacts n° 23 et 24
Longueur d'onde : 286,5 nm
Energie sur l'échantillon : 0,5 µJ

5) Analyses Lamma

Les analyses des coupes histologiques ont été réalisées sur 5 séries.

- 1^{ère} série tissu enrobé dans épon, épaisseur 0,25 μm
- 2^{ème} série tissu enrobé dans épon, épaisseurs variables
- 3^{ème} série tissu enrobé dans épon, sans fixation à l'osmium, épaisseur 0,25 μm
- 4^{ème} série cryocoupes sans traitement à l'osmium, sans contraste, épaisseur 0,25 μm
- 5^{ème} série : idem, épaisseur 0,5 μm

La valeur "0,25 μm " choisie pour l'épaisseur des coupes est le résultat d'un compromis pour les deux techniques utilisées : LAMMA et MEB.

a- Analyses des tissus enrobés dans l'épon

Deux longueurs d'onde spécifiques ont été utilisées : 228,8 et 291,4 nm. En effet, chacune met en jeu un processus d'ionisation différent. Aux plus courtes longueurs d'onde ($\lambda < 240 \text{ nm}$; $h\nu > 5 \text{ eV}$), les mécanismes de désorption laser sont complexes et une coupure photochimique des liaisons (ruptures homolytiques) directement à partir du solide est plus probable. Les plus grandes longueurs d'onde induisent des processus d'ionisation multiphotonique qui favorisent plutôt la désorption thermique (cas du laser CO_2) et la formation d'un microplasma.

i) Analyse de la résine Epon

Voir le paragraphe D (4 a) correspondant à l'analyse du polymère.

ii) Analyses des coupes témoin

Dans un premier temps, nous avons étudié les spectres LAMMA des coupes témoin après l'irradiation laser. L'optimisation des paramètres expérimentaux - potentiels d'extraction et de réflexion - et de

l'énergie sur l'échantillon (1 μ J) permet d'obtenir une extraction optimale des ions de hautes masses.

Le diamètre de l'impact laser est de 2 à 5 μ m lorsque le laser est focalisé et peut atteindre 10 μ m en défocalisant (soit une irradiance variant de 10^9 à 10^8 W/cm²). L'intensité des pics de masses inférieures à 250 amu est nettement supérieure au bruit de fond. Au-delà, les signaux sont faibles, voire inexistants, et, dans tous les cas aléatoires.

L'étude de l'ensemble des spectres obtenus pour ces coupes témoins sert à cibler les pics attribuables à la matrice (biologique ou épon). L'observation de la coupe au microscope équipant le LAMMA permet de repérer deux zones distinctes - une zone claire, certainement le polymère, et une zone plus sombre contenant les cellules repérées.

Le tableau VIII présente le bilan des masses qui semblent significatives du matériau analysé :

Zones claires 27/28/29/30/31/39/41/43/44/56/70/77/79/91/115/128/191
Zones foncées correspondant aux cellules repérées 39/40/50/51/61/63/65/66/74/75/79/86/109/110/122/133/323

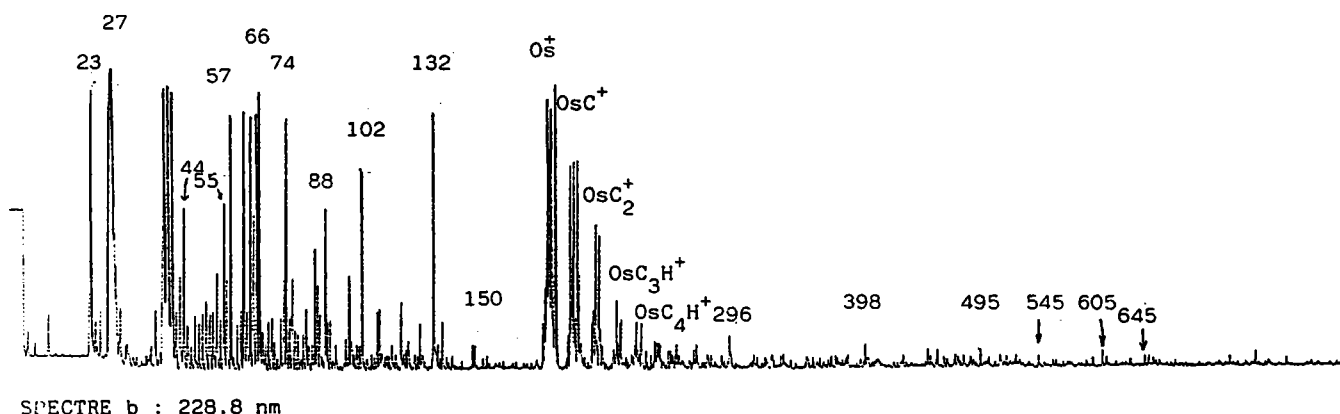
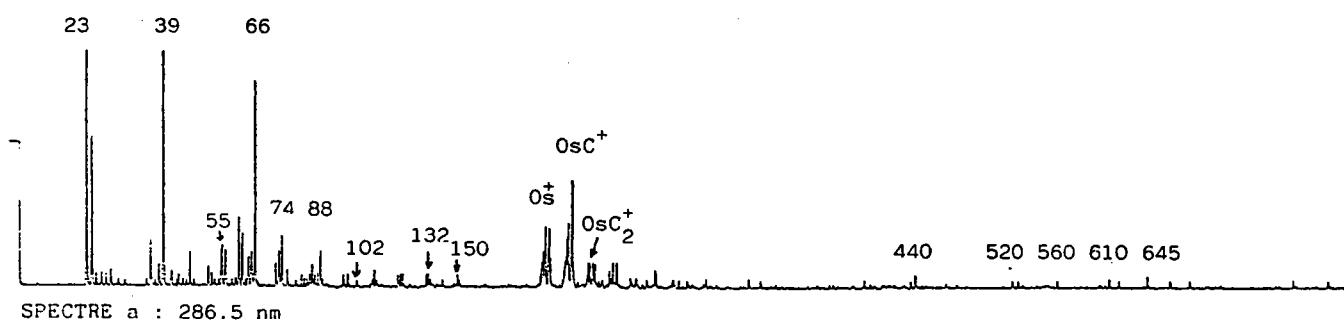
Tableau VIII : Masses présentes sur le spectre de masse en fonction de la nature **polymérique** ou **tissulaire** de la zone irradiée de la coupe biologique.

- Les spectres de masse ne présentent quasiment pas de pics aux masses supérieures à $m/z=250$.
- *On note sur tous les spectres un massif de pics ($m/z=187, 188, 189, 190$ et 192), qui est attribuable à l'osmium utilisé dans la préparation du tissu.*

- D'autre part, des pics de hautes masses apparaissent quelquefois sur les spectres de masse des coupes témoins, aussi nous faudra-t-il être prudent quant à l'interprétation des spectres futurs : ces pics de hautes masses apparaissent en effet de manière aléatoire.

iii) Influence de la longueur d'onde

Les spectres 17a et 17b sont obtenus respectivement à 286,5 et 228,8 nm.



Spectres 17 : Analyse par LAMMA de coupes histologiques

- à 286.5 nm, l'intensité des pics est en général trop faible. Le spectre présenté est obtenu sans préamplification. En effet, son utilisation n'apporte aucune information supplémentaire car le rapport signal/bruit reste dans tous les cas à peu près identique.

- à 228.8 nm, le rendement ionique est meilleur. L'osmium utilisé pour la fixation des coupes s'ionise d'ailleurs particulièrement bien. On constate que le diamètre des impacts laser est plus petit que celui qui est obtenu à 286.5 nm. Ainsi, plus la longueur d'onde est basse et plus la focalisation sur l'échantillon est aisée.

iv) Influence de l'épaisseur

Deux autres épaisseurs ont été testées pour les deux types de tissu biologique analysé (PO poumon, GM ganglion mésentérique) : PO (0,125 μm), PO (0,370 μm), GM (0,125 μm), GM (0,370 μm). La longueur d'onde de travail est 291,4 nm. (Il convient de noter que les processus d'ionisation entre 286,5 et 291,4 nm sont les mêmes)

Le tableau suivant propose un bilan de nos observations en fonction de l'épaisseur de la coupe et de l'énergie déposée sur l'échantillon :

énergie sur l'échantillon	5 μJ		2,5 μJ		1 μJ	
épaisseur de la coupe	0,125	0,370	0,125	0,370	0,125	0,370
Bilan de nos observations au regard des spectres obtenus	Beaucoup de pics $m/z < 100$ amu rien > 300 amu Intensité $>$ bruit de fond pour quelques $m > 300$		Dans les 2 cas pas de pics aux masses > 250		L'aspect des basses masses idem Peu de hautes masses	L'ionisation est nulle

Tableau IX : Commentaires à propos des spectres de masse obtenus en fonction de l'énergie incidente et de l'épaisseur de la coupe.

On constate que :

- à haute énergie, quelle que soit l'épaisseur, la fragmentation est importante
- à plus faible énergie, l'épaisseur 0,37 μ m est trop importante ; il n'y a plus d'ionisation.

Les enseignements, que nous ont apportés ces tests, sont d'une part qu'il n'est pas bon d'analyser les coupes à trop forte énergie (l'information sur une présence éventuelle d'amiodarone est, dans tous les cas, perdue), et d'autre part qu'une trop faible épaisseur de coupe histologique pose des problèmes. En effet, le volume irradié est moins important et par conséquent les molécules cibles ionisées sont proportionnellement en plus faibles quantités. De plus, cette faible épaisseur induit une moindre résistance du tissu et des morceaux importants de la coupe (au delà du simple diamètre du faisceau laser) sont emportés. En revanche, une épaisseur trop importante est difficile à percer.

Il semble que la valeur de 0,25 μ m, retenue au préalable, soit la meilleure épaisseur pour des coupes histologiques destinées à être analysées par microsonde LAMMA.

v) Analyse des coupes (épaisseur 0,25 μ m) en ions positifs

Une étude complète des fragments de l'amiodarone sur tous les spectres collectionnés est réalisée. Pour cela, nous avons ressencé tous les pics apparaissant sur chaque spectre et pouvant appartenir à l'une des trois catégories suivantes :

- Fragment caractéristique de l'amiodarone de basse masse,
- Fragment caractéristique de haute masse,
- Fragment inconnu de haute masse, mais apparaissant fréquemment sur les spectres LAMMA. Il pourrait alors être caractéristique d'un métabolite de l'amiodarone ou d'une ionisation particulière de la molécule cible compte-tenu de son environnement.

Cette étude de tous les spectres LAMMA nous amène aux conclusions suivantes :

* fragments connus de basses masses

Le pic de masse $m/z=100$, caractéristique de l'amiodarone, n'apparaît pas.

* fragments connus de hautes masses

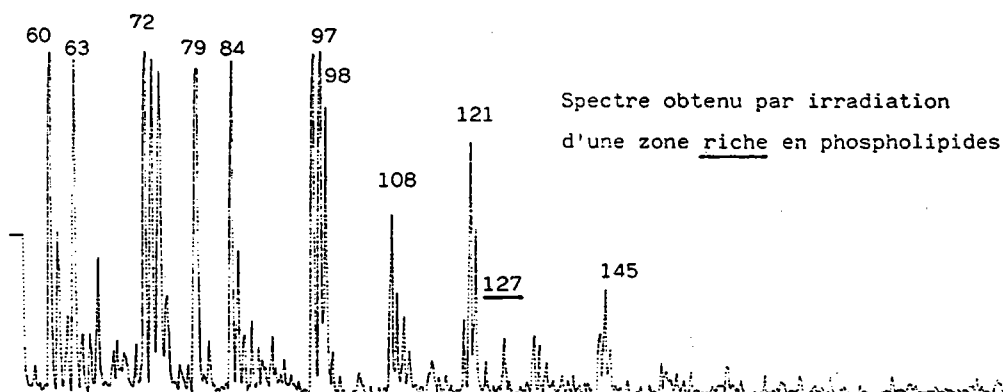
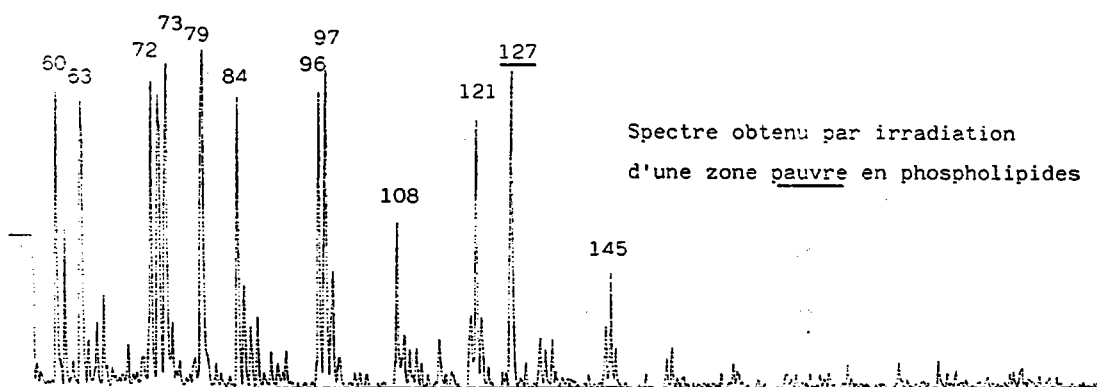
En hautes masses, les signaux se confondent avec le bruit de fond. Certains pourraient, du fait de leurs intensités supérieures au bruit de fond, correspondre à l'existence effective d'un ion. Toutefois la localisation de l'impact laser sur la coupe permet d'affirmer que la probabilité qu'il y ait de l'amiodarone dans cette zone concernée est nulle, sinon faible.

* fragments inconnus de hautes masses

Nous avons cherché si, statistiquement, ces pics qui semblent apparaître souvent, sont reproductibles. La confrontation des fréquences d'apparition de ces hautes masses et des localisations des lipides, et donc de l'amiodarone, sur micrographie conduit à une conclusion négative. Ces signaux sont aléatoires et ne sont pas significatifs.

vi) Analyse des coupes (épaisseur 0.25 μm) en ions négatifs

Notre intérêt s'est à nouveau porté sur l'iode ($m/z=127$), fragment caractéristique de l'amiodarone. De plus, c'est un élément qui n'est pas présent naturellement dans les tissus biologiques. Sur une grille supportant une coupe, nous avons balayé systématiquement avec le laser une zone donnée ; chaque impact a été repéré et le spectre correspondant à cette zone irradiée (1 à 5 μm^2) a été enregistré. Pour chacun de ces spectres, l'intensité absolue du pic de l'iode est notée et reportée sur la photographie faite après les impacts.



Conditions expérimentales : - longueur d'onde 286.5 nm
 - irradiance 3.10^9 W/cm^2
 - ions négatifs

Spectres 18 : Spectres LAMMA en ions négatifs d'une coupe histologique

Ces expériences permettent de constater que les zones irradiées, donnant naissance à des spectres dans lesquels le signal pour l'iode est important, ne correspondent pas aux zones phospholipidiques supposées renfermer l'amiodarone. Les deux spectres choisis pour illustrer cette remarque représentent effectivement les deux cas extrêmes : d'une part, pratiquement pas d'iode dans une zone riche en amiodarone et, d'autre part, un signal très intense d'iode dans une zone pauvre en amiodarone (spectres 18) !

L'iode est un élément certainement très diffusible, aussi doit-il migrer sous forme libre. Sa présence ne serait alors plus forcément associable à celle de l'amiodarone. Ceci impliquerait qu'il y a eu métabolisation préalable. En effet, on sait que les vitesses de métabolisation sont très importantes (voir partie II). Nos résultats semblent contraires à ce qu'a affirmé l'équipe de Van Vaeck lorsqu'elle a analysé par microsonde LAMMA 500 les mêmes coupes dopées à l'amiodarone. Selon elle, l'iode reste l'élément traceur de l'amiodarone par la technique LAMMA (98).

Nous avons constaté sur les spectres précédents qu'il existe souvent la série de pics de moyenne à forte intensité aux masses $m/z=187, 188, 189, 190$ et 192 , correspondant aux isotopes de l'osmium. Les tissus analysés sont effectivement fixés par le tétr oxyde d'osmium. Celui-ci s'ionise facilement et ce, peut-être, au détriment des espèces organiques. Les tests suivants ont été motivés par cette remarque.

vii) Analyse des coupes préparées sans tétr oxyde d'osmium

Sur l'hypothèse qu'une part importante des photons induit l'ionisation préférentielle de l'osmium présent dans les coupes, d'autres coupes, préparées à partir de poumons et de ganglions

mésentériques de rats **sans traitement au tétr oxyde d'osmium**, ont été analysées par microsonde LAMMA aux deux longueurs d'onde (228.8 et 291.48 nm) avec une irradiance de 4.10^8 W/cm². Les spectres de masse obtenus n'apportent aucune information particulière sur la présence d'amiodarone. En effet, le balayage systématique des différentes zones repérées ne révèle ni la présence formelle de l'amiodarone par un de ses fragments caractéristiques, ni l'existence d'une ou plusieurs masses marqueuses résultant d'une ionisation particulière ou d'une transformation de la cible in-vivo.

b- Analyses des cryocoupes

Nous avons constaté tout au long des essais précédents qu'il était difficile de s'affranchir des effets de matrice dûs au tissu biologique et que l'utilisation d'une coupe préparée à partir d'un tissu **enrobé dans une résine** ne facilitait pas les analyses. Les cryocoupes sont obtenues en congelant le tissu biologique sans inclusion dans une matrice polymérique. Logiquement, l'analyse de ces coupes devrait minimiser les effets de matrice et faciliter ainsi la désorption de l'amiodarone, si elle est concentrée dans une zone particulière (riche en phospholipides).

Les spectres obtenus lors de l'analyse des tissus congelés fournis par Sanofi n'ont présenté aucun fragment significatif de l'amiodarone et n'ont donc pas permis de détecter l'amiodarone.

Toutefois, les échantillons congelés se sont révélés être mal fixés. En effet, Sanofi a rencontré des difficultés lors de la fixation des lipides dans le tissu. L'amiodarone se fixant préférentiellement sur les phospholipides, il est clair que l'exploitation de cette technique

reste entièrement à faire puisque les problèmes de conservation de l'intégrité du tissu pendant les étapes de préparation des cryocoupes n'ont pas été résolus pour le moment.

c- Bilan sur l'analyse par LAMMA 500 (transmission) des coupes et cryocoupes

Nous avons constaté tout au long de nos tests que la matrice organique perturbe indiscutablement la désorption et l'ionisation de l'amiodarone. Les coupes témoins ne permettent pas de donner un spectre de masse qui soit caractéristique du matériau biologique ; celui-ci est extrêmement inhomogène et chaque spectre est spécifique de la zone irradiée. La fixation ou non des coupes par l'oxyde d'osmium n'apporte aucun changement concret quant à la détection de la molécule cible. La détection directe de l'amiodarone par ses fragments caractéristiques n'est donc jamais réalisée. La localisation de la molécule par des pics qui apparaîtraient spécifiquement lorsqu'on irradie une zone contenant l'amiodarone n'a pu être concrétisée par une présence d'ion marqueur : en particulier, la répartition de I^- sur le tissu ne correspond pas forcément aux zones riches en phospholipides.

Les expériences réalisées sur les cryocoupes sont à reconsidérer du fait que les échantillons n'ont pas été préparés de façon satisfaisante. En effet, la fixation des lipides n'était pas correcte et la recherche de l'amiodarone dans les zones riches en phospholipides était à foriori vouée à l'échec.

L'analyse LAMMA des coupes biologiques n'a pas été une analyse simple ; la non-détection de notre cible organique dans la matrice biologique peut s'expliquer par la nature même de l'échantillon à

analyser et par la nature de la technique d'analyse : une bonne *résolution spatiale* est nécessaire pour avoir une localisation suffisamment précise par rapport à la taille des cellules. La taille du spot laser focalisé est de 1 à 5 μm selon l'énergie délivrée par pulse. De plus, l'épaisseur de la coupe est de 0,25 μm et la quantité de matière vaporisée est très faible. L'amiodarone est en faible concentration dans le tissu, aussi sa détection en est d'autant plus difficile. Une épaisseur légèrement supérieure à la valeur actuellement fixée permettrait éventuellement de limiter ces zones qui éclatent littéralement sous l'impact laser.

D'un point de vue technique, la reproductibilité d'un spectre à l'autre n'est pas assurée : elle dépend de la variation locale de l'épaisseur de la coupe, d'une variation instantanée de l'énergie du rayon laser.

F - CONCLUSIONS DU CHAPITRE II

L'amiodarone est un composé organique, qui désorbe relativement bien sous l'effet d'une irradiation laser et qui se fragmente de manière caractéristique.

Dispersée dans un polymère époxy, sa détection par microsonde LAMMA en transmission n'a pas été obtenue, quels que soient les paramètres instrumentaux (potentiels, longueurs d'onde, focalisation du laser). Egalement sur microsonde LAMMA 500, en mode transmission, Van Vaeck (114) a montré l'existence d'une épaisseur limite de polymère (5nm) en dessous de laquelle la molécule cible n'était plus ionisée. Cela pourrait expliquer nos mauvais résultats.

La désorption de l'amiodarone dans un bloc de polymère a été tentée directement par FTMS ; la géométrie du système étant en

réflexion. Dans le bloc d'épon, l'amiodarone présente à 0,4% n'est jamais détectée, même lorsqu'il y a accumulation de tirs laser au même endroit. La même expérience, faite pour un bloc de technovit dopé à 2% en amiodarone, a permis de détecter sans contestation le fragment (M-I)⁺ à m/z=518. En revanche, dès que la quantité d'amiodarone est inférieure à 1%, la réponse n'est plus significative. Ces dernières expériences ont été réalisées récemment à 193 nm, tandis qu'à 249 nm nous n'obtenons aucun résultat. Cet effet de la longueur d'onde représente un espoir de détecter l'amiodarone in-situ si celle-ci se fixe dans certaines zones cellulaires avec un taux supérieur à 1%.

En effet, il semblerait qu'au delà d'un certain seuil de concentration (variable selon le polymère d'enrobage), des interactions physico-chimiques soient prépondérantes et empêchent la désorption/ionisation de la molécule cible.

La recherche de l'amiodarone dans un tissu biologique s'est soldée par un échec. En ions positifs, aucun signal suffisamment intense et significatif n'existe en hautes masses. En ions négatifs, l'iode est détecté mais la localisation de l'iode ne correspond pas forcément à une localisation exacte de l'amiodarone. Les interactions entre l'amiodarone, le tissu biologique et le polymère d'enrobage sont vraisemblablement responsables de la non détection du composé.

L'analyse de cryocoupes permettait à-priori d'éliminer, en supprimant le polymère d'enrobage, bon nombre des causes d'interaction avec la molécule cible. Aujourd'hui, nous ne pouvons conclure quant à la réussite ou non de ces analyses. Celles qui ont été réalisées ne sont pas significatives, essentiellement parce que le protocole de fixation des phospholipides n'est pas encore au point.

En parallèle de toute cette première phase de travail, nous nous étions intéressés aux techniques classiques utilisées pour améliorer les rendements en ions moléculaires. Par exemple, l'addition de sels, l'ajout d'acides divers, l'utilisation de matrices FAB ont été testés en analyse LAMMA sur l'amiodarone. Les résultats étaient fort encourageants, mais difficilement applicables aux tissus biologiques.

De nouvelles techniques de désorption de molécules organiques assistée par matrice ont été publiées. Elles ont été testées au laboratoire sur le spectromètre de masse FTMS et elles nous ont permis une nouvelle approche de notre problème.

CHAPITRE III

ETUDE DE LA CODESORPTION EN IMPACT LASER

A - INTRODUCTION

La spectrométrie de masse par désorption laser est à présent une technique analytique reconnue pour les composés organiques non volatils. La littérature fourmille d'exemples démontrant son potentiel. Toutefois, pour beaucoup de molécules de haut poids moléculaire, les spectres en ions positifs et négatifs révèlent une fragmentation importante.

La situation peut être différente si la molécule est capable de se lier avec un ion alcalin. Ainsi les molécules polaires, qui ont suffisamment d'affinité avec eux, forment préférentiellement les ions quasimoléculaires cationisés $(M+Na)^+$ (99-103). D'autres ions métalliques (Ag, Cu, Mg,...) peuvent initier ce type de cationisation (104,105). Cette étape dans le processus d'ionisation est basée sur des réactions ion - molécule dans la phase gazeuse (fixation du cation sur un site riche en électron) plutôt que sur l'ionisation directe de la molécule par arrachage d'un électron : $M - e^- = M^+$ (106).

Seydel et Lindner (101) ont montré l'influence d'un sel alcalin ajouté à une molécule organique complexe sur sa désorption induite par irradiation laser. En fonction de la nature du cation (Na, Cs, Li...) et du rapport molaire avec la molécule organique, l'intensité du signal de l'ion quasimoléculaire et le degré de fragmentation sont contrôlés. Par

exemple, les spectres LAMMA du stachyose présentent une fragmentation différente en fonction de la quantité d'iodure de sodium additionnée. Dans le cas d'un mélange d'une mole de sucre avec 0,25 mole de sel, seul le pic quasimoléculaire $(M+Na)^+$ est présent, alors que pour un mélange équimolaire, de nombreux signaux dûs à la formation de clusters $((NaI)_nNa)^+$ sont formés car il y a trop de neutres NaI dans la phase gazeuse. Les auteurs proposent dans une communication plus récente (107) une technique d'élucidation structurale d'un lipopolysaccharide. Pour cela, ils induisent différents clivages caractéristiques en additionnant un iodure de césium ou de sodium. Les spectres LAMMA obtenus dans ces conditions, complétés par des expérimentations de désorption laser en ions négatifs (afin de connaître les résidus des acides gras) permettent une caractérisation complète du lipide A.

Wright et col. ont étudié la cationisation de différentes molécules de sucres (108) sur un spectromètre de masse triple quadrupole adapté pour l'expérience. L'échantillon, constitué d'un mélange de sucre et de carbonate alcalin, est déposé sur le porte-échantillon en argent préalablement mouillé avec du glycérol. L'angle entre le faisceau laser et la surface de la sonde est de soixante degrés. L'irradiance du laser CO_2 est de 800 W/cm^2 pour un diamètre du spot laser, focalisé par une fenêtre de germanium, d'un millimètre. La matrice constituée du mélange glycérol/carbonate alcalin permet d'obtenir des signaux très intenses en utilisant ce laser CO_2 de faible puissance. En fonction du sel alcalin choisi, il est possible de moduler les résultats. Les diverses fragmentations sont discutées et il est montré que l'ion $(\text{monosaccharide}+Na)^+$ provient directement de la fragmentation du disaccharide cationisé, et non pas du monomère qui se serait

simplement cationisé. Les auteurs constatent que, contrairement aux autres techniques de désorption comme le FAB, la présence de glycérol ne complique en rien les spectres de masse ; seule s'y ajoute la forme cationisée du glycérol.

Hercules (109) s'est intéressé au problème de la cationisation en spectrométrie de masse par ionisation laser (microsonde LAMMA 1000), afin d'étudier la désorption comparée de différents sucres ainsi que l'influence de différents ions métalliques sur la désorption d'un sucre. Les ions métalliques de degré d'oxydation +1 sont les meilleurs pour cationiser les saccharides. Lorsqu'une certaine concentration limite est atteinte (0,1 M pour le métal et 0,5 M pour le sucre), les concentrations n'ont pratiquement plus d'effet sur l'intensité du signal.

Pour étudier les différents processus induisant la fragmentation de molécules neutres préalablement désorbées d'un solide par irradiation d'un laser CO₂ (IR), Grotemeyer et col. (110) ont additionné une matrice minérale à leur échantillon. Les fragments cationisés observés sont dûs soit à la désorption IR, soit à l'ionisation multiphotonique. La matrice permet de contrôler l'environnement physico-chimique dans lequel la désorption survient. Des mélanges 1/1 d'un composé organique avec des sels inorganiques, tels que le nitrate d'ammonium ou le bromure de potassium transparents aux IR, permettent d'augmenter le rendement d'un seul tir laser. Cet effet semble plus important dans le cas des peptides à chaînes latérales non polaires. Mais, pour tous les peptides, l'augmentation du rendement ionique est significative.

Chiarelli et Gross (111) ont analysé des mélanges d'acides-amino et de tripeptides par LD-FTMS à 1064 nm. Les composés organiques sont mélangés à poids égal avec une matrice de chlorure de sodium. L'irradiance du laser est égale à $2 \cdot 10^6$ W/cm². Les ions spécifiques

$(M+2Na-H)^+$ sont alors formés. En diminuant la puissance du laser, la quantité de Na^+ formé au point chaud de l'impact laser devient insuffisante pour les réactions de cationisation dans la phase gazeuse et les auteurs observent l'augmentation des ions $(M+Na)^+$ et $(M+H)^+$.

Sur microsonde LAMMA 500, seuls Seydel et Lindner ont pu désorber des molécules organiques complexes (112). Leur technique est tout à fait originale. L'irradiance du laser atteint des valeurs très élevées (10^{11} W/cm²). Les molécules sont déposées en film très épais (20µm) sur la grille de microscope électronique. Lors de l'irradiation laser, le film n'est pas perforé et des molécules cibles intactes sont éjectées du côté opposé au laser *par un phénomène d'onde de choc*. Ainsi, le composé à analyser joue lui-même le rôle de matrice désorbante !...

L'influence du pH peut également être mise en jeu pour mieux désorber des molécules intactes en favorisant l'ion $(M+H)^+$. En SIMS, Todd (113) a montré l'augmentation du rendement en ions secondaires moléculaires en utilisant une matrice constituée d'un acide de Lewis pour analyser des composés aromatiques. De même, l'analyse par désorption de champ de l'adénine (114) dans de l'eau acidifiée par l'acide chlorhydrique donne un ion $(M+H)^+$ plus important comparé à celui obtenu dans l'eau pure. Une très large gamme de composés zwitterions a donné des spectres, également en désorption de champ (115), extrêmement simples lorsque les composés sont additionnés en quantité équimolaire avec un acide non volatil tel que l'acide paratoluènesulfonique.

La première partie des expérimentations exposées par la suite a été inspirée de ces exemples permettant d'améliorer le rendement en ions moléculaires de la molécule cible par des réactions ion - molécule neutre dans la phase gazeuse ou en modifiant le pH. L'utilisation d'une matrice absorbant les photons émis par le faisceau laser et redistribuant l'énergie est une autre voie possible pour aboutir à l'ionisation et à la désorption de molécules organiques non volatiles.

Hillenkamp et col. (116) ont eu l'idée d'ajouter un composé additionnel à leur molécule organique, susceptible d'absorber l'énergie qu'apporte le laser (et donc servant de matrice solide), pour ensuite la redistribuer. L'acide nicotinique est la molécule principalement utilisée à cet effet, puisqu'elle présente un maximum d'absorption à 266 nm (longueur d'onde du laser Nd-YAG quadruplé). Des valeurs précises de l'irradiance du laser sont imposées pour que la désorption ait lieu : 1 à $5 \cdot 10^7$ W/cm². Depuis, ces chercheurs ont fait de nombreuses publications et communications qui ont bousculé les idées en matière de désorption laser appliquée à l'organique. Il est devenu possible de déterminer sur un spectromètre à temps de vol des poids moléculaires extrêmement élevés : la dernière limite atteinte par l'équipe d'Hillenkamp est, à ce jour, de 250 000 uma. Mais pour atteindre de telles masses, il a été fondamental d'apporter au préalable des modifications instrumentales sur leur microsonde LAMMA 1000. Notamment, une post-accélération des ions proche du détecteur est réalisée en appliquant un potentiel pouvant atteindre la valeur de 20 kV, afin d'augmenter l'émission des électrons secondaires au niveau du détecteur (117). Sur notre LAMMA 500, la valeur de ce potentiel particulier est fixé à 6000 V.

Une autre équipe (118) a également travaillé sur ces transferts d'énergie via une matrice (mélange de glycérol et de poudre de cobalt finement divisée (300 Å)). Le liquide est irradié à 337 nm avec un laser à azote pulsé. Les ions sont extraits et séparés en masse par un temps de vol (TOF). Dans ces conditions, les spectres de masse permettent de déterminer le poids moléculaire de nombreux protéines et polymères jusqu'à 34 000 uma. Le rôle de la matrice est, d'une part pour la poudre métallique, d'augmenter la vitesse d'échauffement de l'échantillon et, d'autre part pour le glycérol, de redistribuer l'énergie fournie par le laser sur un temps plus long.

Depuis, d'autres équipes ont reproduit les expériences d'Hillenkamp et les ont adaptées :

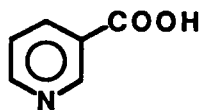
Sundqvist et col. (119) ont travaillé à 266 nm avec un TOF linéaire. L'irradiance du laser est au maximum 10^8 W/cm². Dans ces conditions, ils reproduisent qualitativement les résultats d'Hillenkamp. Leurs spectres de masse présentent toutefois deux différences notables : un important bruit de fond expliqué par l'utilisation d'un TOF linéaire, alors qu'il est pratiquement inexistant sur les spectres d'Hillenkamp et une abondance des basses masses (50-500 uma). Ainsi dans le cas du lysosyme, le signal de l'ion moléculaire ne représente que 10 % du signal des ions de basses masses. Ils discutent de l'effet de différents paramètres expérimentaux qui maximisent l'intensité des ions moléculaires. Ces paramètres critiques sont donc les concentrations absolues et relatives de l'échantillon et de la matrice, l'irradiance du laser incident, le balayage du spot laser sur la surface de l'échantillon et le nombre total de tirs laser.

Beavis et Chait (120) ont, dans un premier temps, reproduit les résultats d'Hillenkamp à 266 nm avec un TOF linéaire, puis recherché d'autres matrices susceptibles de jouer le même rôle que l'acide nicotinique. Les résultats obtenus leur permettent de conclure que :

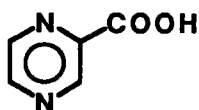
- i) l'absorption UV de la matrice seule n'est pas un critère suffisant pour choisir une matrice. En effet, l'acide nicotinique (acide 3-pyridine carboxylique) est remplacé par l'acide isonicotinique (acide 4-pyridine carboxylique) et, bien que leurs spectres UV soient similaires, ce dernier induit une perte complète en intensité du pic moléculaire.
- ii) la présence de l'azote dans le chromophore n'est pas nécessaire puisque l'acide 3-méthoxy, 4-hydroxy benzoïque (acide vanillique) est une très bonne matrice.
- iii) la matrice thymine montre que la fonction acide n'est pas non plus indispensable.
- iv) la structure cyclique, π électronique, dans le chromophore n'est pas essentielle : l'excellente matrice thiourée n'en possède pas.

Le problème principal, que posent toutes ces matrices, est de créer des ions par addition d'une molécule de matrice ou d'un de ses fragments à l'ion moléculaire de la cible ; ces ions sont difficiles à séparer pour calculer la masse exacte de la protéine analysée. Aussi, Beavis et Chait ont-ils étudié une nouvelle classe de composés (121) : les dérivés de l'acide cinnamique. Selon les auteurs, ils présentent l'avantage de réduire grandement la formation photochimique des adducts (protéine+matrice-CO₂). Sur le spectre de masse, ces derniers créent un épaulement au niveau du pic moléculaire, qui rend difficile la détermination du centroïde du pic servant à calculer la masse moléculaire exacte des protéines. Les matrices les plus efficaces sont les acides caféïque, sinapinique et férulique. En résumé, quatre grandes

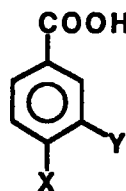
classes permettent de désorber la plupart des protéines :



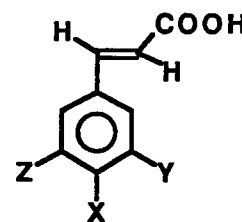
**Acide
Pyridine
Carboxylique**



**Acide
Pyrazine
Carboxylique**



**Acide
Benzoïque**



**Acide
Cinnamique**

(X,Y et Z représentent des groupements hydroxy ou méthoxy pour les composés dérivés)

- * Ainsi l'isomère méta de l'acide pyridine carboxylique le plus utilisé est l'acide nicotinique.
- * De même, le seul dérivé de l'acide pyrazine carboxylique employé est l'analogue de l'acide nicotinique.
- * Le meilleur dérivé de l'acide benzoïque est l'acide vanillique (X=OH, Y=OCH₃).
- * Finalement, les dérivés de l'acide cinnamique substitués en 3, 4 et 5 sont d'excellentes matrices (acide caféïque : X=Y=OH, Z=H ; acide sinapinique : X=OH, Y=Z=OCH₃ ; acide férulique : X=OH, Y=OCH₃, Z=H). Ces trois dernières matrices présentent une forte absorption UV à 355 nm, aussi les auteurs (122) montrent qu'elles permettent également d'obtenir des spectres tout-à-fait conventionnels à des longueurs d'onde supérieures à 266 nm. Ceci laisse entrevoir de nouvelles perspectives quant à l'utilisation d'autres lasers que les Nd-YAG quadruplés.

Une autre expérience, extrêmement intéressante et en marge de celles précédemment citées, doit être signalée. Williams et col. (123)

ont pu volatiliser des molécules d'ADN par ablation laser d'un film mince de solution aqueuse d'ADN congelée. Le film est irradié sous vide (10^{-6} torr) à 581 nm par un laser à colorant pompé par un laser excimère. L'irradiance du laser varie de 10^6 à 10^8 W/cm². Elle doit être suffisante pour ablater la matrice de glace. L'éjection des molécules d'ADN aussi lourdes que 410 000 uma a pu être vérifiée par collection des morceaux d'ablation et par analyse des masses par électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec une détection autoradiographique.

Les expériences de désorption assistée par matrice sur microsonde LAMMA 500 que nous avons réalisées en parallèle des analyses des tissus biologiques s'inscrivent effectivement bien dans la démarche scientifique actuelle. Toutefois, nos résultats n'ont pas été aussi bons que ceux qu'obtient l'équipe d'Hillenkamp ; la configuration de l'appareil, en mode transmission, n'est pas forcément adaptée à la mise en oeuvre de ce type de désorption et surtout, ainsi que nous l'avons souligné dans un paragraphe précédent, notre équipement ne possède pas de postaccélération.

De ce fait, des expériences de désorption ont été menées sur le LAMMA 1000 au laboratoire du professeur Hillenkamp (Université de Münster - RFA). Les résultats très encourageants nous ont poussé à travailler dans cette direction avec notre propre spectromètre de masse FTMS possédant la configuration en réflexion requise. La désorption de l'amiodarone en fonction de divers paramètres (longueur d'onde, focalisation du laser, présence ou non d'acide nicotinique) a été étudiée ; notre motivation finale étant la recherche d'une matrice polymérique mieux adaptée au problème de l'analyse biologique.

B - ESSAIS AVEC LA MICROSONDE LAMMA 500

1) Préparation des grilles

La préparation des échantillons n'est pas une partie mineure de l'expérimentation. Elle a donc demandé une mise au point particulière. En effet, des surfaces de l'ordre du micron sont vaporisées lors de l'irradiation laser et il est, par conséquent, impératif que la distribution des différents composants dans la matrice ou sur le film de formvar soit homogène afin que l'analyse soit représentative de l'échantillon. Différentes techniques de préparation ont été testées :

1°) Cobroyage de l'amiodarone et du codésorbant : les principaux inconvénients sont qu'il faut vaincre l'énergie de réseau des cristaux et que les spectres présentent un haut degré de variabilité.

2°) Codéposition des solutions d'amiodarone et de codésorbant sur une même grille et séchage sur plaque chauffante. Le dépôt n'est pas homogène.

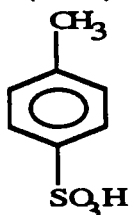
3°) Dépôt du mélange préalablement effectué de l'amiodarone ($3 \cdot 10^{-3}M$) et du codésorbant en solution dans le méthanol sur une grille recouverte d'un film de formvar. A l'aide d'une micropipette, un microlitre du mélange est déposé de façon reproductible. La grille est maintenue par une pince anticapillaire, qui empêche la fuite du liquide. Le solvant est évaporé par un flux d'air chaud.

Cette dernière méthode est finalement retenue, parce qu'elle permet d'obtenir des films minces relativement homogènes.

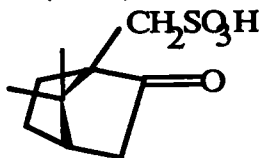
2) Composés testés

Les molécules testées sont essentiellement *les composés classiquement utilisés en codésorption ou possédant une fonction acide susceptible d'aider la formation du $(M+H)^+$* . Il s'agit de sels alcalins (iodures de césium, de potassium, de sodium ; chlorures de calcium, de potassium, d'ammonium ; acétate de sodium) et d'acides organiques. Le saccharose, étant utilisé pour recueillir les coupes histologiques fraîchement coupées, est testé comme éventuel codésorbant. La nitrocellulose est communément employée en film mince (collodion) déposé sur les grilles de microscopie électronique au même titre que le formvar. Sa structure se rapproche de celle du saccharose, aussi l'avons-nous également essayée comme nouvelle matrice. Hercules (124) l'avait utilisée pour améliorer la reproductibilité de la réponse de la microsonde LAMMA 1000 lors d'analyses de composés organiques, mais le gain en reproductibilité était obtenu au détriment de l'intensité absolue du pic moléculaire. Dans notre cas, les composés testés sont :

- Acide paraToluèneSulfonique (ATS) :



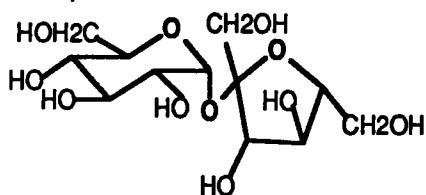
- Acide CamphorSulfonique (ACS) :



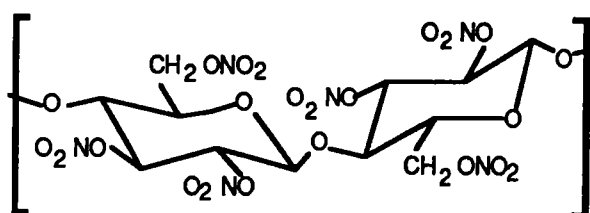
- Acide Trichloroacétique (TCA) : $\text{Cl}_3\text{C}-\text{COOH}$

- Acide Trifluoroacétique (TFA) : $F_3C-COOH$

- Saccharose (M= 342) :



- Nitrocellulose : (segment de molécule de nitrate de cellulose)



3) Essais de co-désorption

Les conditions d'analyse LAMMA sont :

- longueur d'onde : 291,48 nm
- potentiels d'extraction : TOF 6000V - REFL 785V - LENS 1100V
- énergie sur l'échantillon : 0,5 à 1 μJ
- diamètre de l'impact : 2 à 10 μm
- irradiance : 10^8 à 10^{10} W/cm²

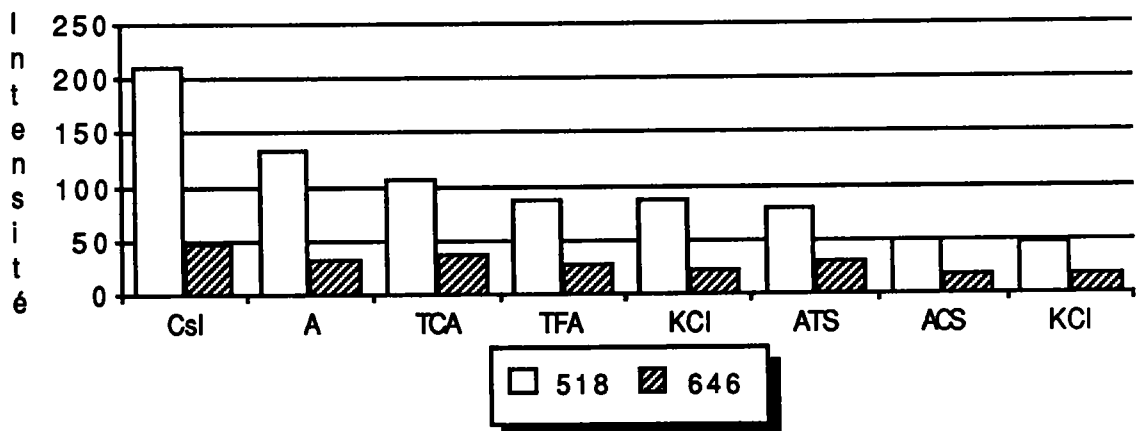
L'efficacité des différents codésorbants est estimée en comparant les intensités absolues du pic quasimoléculaire protoné $(M+H)^+$ de masse $m/z = 646$ et du pic de base correspondant au fragment de masse $m/z = 518$, avec celles obtenues pour le produit pur, dans les mêmes conditions expérimentales. Nous appelons, *intensité absolue*, le signal qui est renvoyé par le photomultiplicateur en millivolts ; l'*intensité absolue moyenne* d'un pic est la moyenne des intensités absolues collectées sur 30 spectres individuels différents.

Le tableau suivant récapitule les intensités absolues moyennes obtenues pour chaque mélange d'amiodarone (x mole) et de codésorbant (y mole) :

CO-DESORBANTS	x:y	m/z=518	m/z=646
Amiodarone seule (A)	1 : 0	135 ± 97	35 ± 31
Iodure de Césium	1 : 0,1	211 ± 55	48 ± 20
Chlorure de Potassium (KCl)	1 : 0,1	87 ± 21	23 ± 7
Chlorure de Potassium	1 : 0,2	48 ± 18	18 ± 7
Chlorure de Calcium	1 : 0,2	-	-
Acétate de Sodium	1 : 0,2	-	-
Acide Chlorhydrique	1 : 0,2	-	-
Acide TriChloroAcétique(TCA)	1 : 0,2	109 ± 53	39 ± 20
Acide TriFluoroAcétique(TFA)	1 : 1	87 ± 35	28 ± 12
Acide CamphorSulfonique (ACS)	1 : 0,2	50 ± 17	19 ± 6
Acide pToluèneSulfonique(ATS)	1 : 0,2	81 ± 25	31 ± 19

Tableau X : Moyennes des intensités absolues (en mV) du pic moléculaire (M+H)⁺ m/z= 646 et du pic de base m/z=518 de l'amiodarone (x mole) en fonction du co-désorbant (y mole). Les moyennes sont calculées à partir de 30 spectres individuels.

INFLUENCE DU CODESORBANT SUR LES PICS CARACTERISTIQUES DE L'AMIODARONE



Courbe 2 : Influence de la nature du codésorbant sur les intensités absolues du pic moléculaire et du fragment principal de l'amiodarone.

Cet histogramme, issu du tableau qui le précède, souligne l'effet bénéfique d'un composé secondaire sur la désorption de l'amiodarone, et plus particulièrement sur la formation de ses fragments caractéristiques de hautes masses. L'iodure de césium (CsI) et éventuellement l'acide trichloroacétique semblent être les composés les plus efficaces. Nous avons étudié plus particulièrement leur influence.

4) Cas de TCA et CsI : influence des paramètres

Nous avons contrôlé par spectroscopie UV qu'aucune dégradation rapide de l'amiodarone ne survient lorsque ces composés sont ajoutés à notre molécule organique. L'effet de la longueur d'onde sur la désorption ainsi que l'influence de la concentration en codésorbant sont considérés.

a- Contrôle par spectroscopie UV

Le spectre d'absorption de l'amiodarone pure en solution dans le méthanol présente 5 bandes situées respectivement à 205, 242, 276, 282 et 310 nm. La transition à 310 nm a un caractère $n \rightarrow \pi^*$ et les transitions 276 et 242 nm un caractère $\pi \rightarrow \pi^*$ (125).

L'addition équimolaire d'acide trichloroacétique à l'amiodarone ne modifie pas son spectre d'absorption, excepté un léger décalage à 310 nm vers les basses longueurs d'onde. L'acide trifluoroacétique est un composé plus polaire. Le décalage est plus accentué (environ 10 nm). Ceci rend compte d'une stabilisation de l'orbitale n de l'iode et, par conséquent, d'un gap plus important entre l'orbitale "n" occupée et

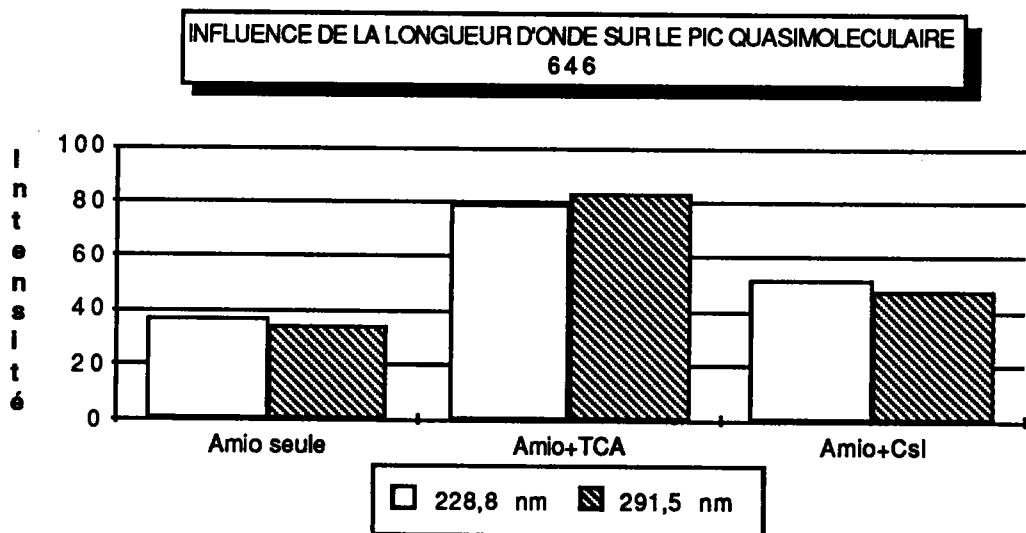
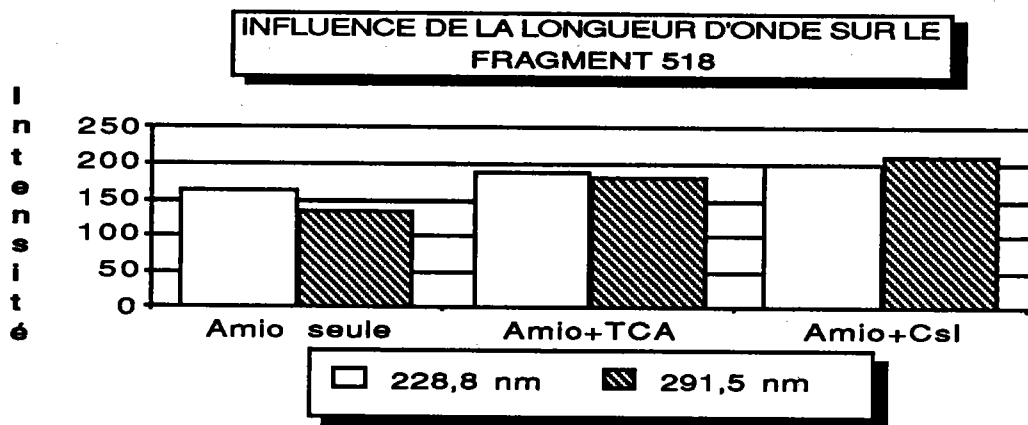
l'orbitale " π^* " libre. En conclusion, on peut affirmer que l'addition d'acide ne modifie pas structurellement l'amiodarone.

b- Influence de la longueur d'onde

En fonction de la longueur d'onde, le codésorbant peut influencer la désorption des fragments de hautes masses ou de l'ion moléculaire. Des séries de 30 spectres sont enregistrées pour chacun des codésorbants et pour les deux longueurs d'onde de travail : 228,8 (5,4 eV) et 291,48 nm (4,3 eV). Les moyennes pour les intensités absolues des pics de masses $m/z= 518$ et 646 sont calculées et récapitulées dans le tableau suivant.

Pics de masse $m/z=$	Longueur d'onde	Intensités absolues (mV)	
		518	646
Amiodarone seule	228,8 nm	165 ± 39	38 ± 10
	291,5 nm	135 ± 97	35 ± 31
Amiodarone + TCA (1:1M)	228,8 nm	190 ± 34	79 ± 15
	291,5 nm	183 ± 66	83 ± 32
Amiodarone + Csl (1: 0,1M)	228,8 nm	203 ± 37	52 ± 13
	291,5 nm	211 ± 55	48 ± 20

Tableau XI : Moyennes des intensités absolues du pic moléculaire $(M+H)^+$ et du pic de base $m/z=518$ de l'amiodarone en présence de TCA et Csl, en fonction de la longueur d'onde (Moyennes sur 30 spectres individuels)



Les histogrammes tracés à partir du tableau XI rendent compte de l'influence de la longueur d'onde :

* la formation de l'ion quasimoléculaire ou du fragment caractéristique ($m/z=518$) n'est pas privilégiée à une longueur d'onde particulière.

* toutefois, indépendamment de la longueur d'onde, on constate que la présence d'iodure de césium semble favoriser la formation du fragment de masse $m/z = 518$, tandis que l'ajout d'acide trichloroacétique mole à mole avec l'amiodarone accentue celle de l'ion quasimoléculaire ($M+H$)⁺.

Le processus de protonation est une réaction ion-molécule dans le plasma ; aussi est-il logique que la longueur d'onde soit de faible incidence sur l'intensité des pics, mais elle est par contre un facteur non négligeable pour la reproductibilité des résultats. Les écarts standard sont toujours beaucoup plus faibles à courte longueur d'onde.

c- Influence de la concentration du codésorbant

Les conditions expérimentales sont les suivantes :

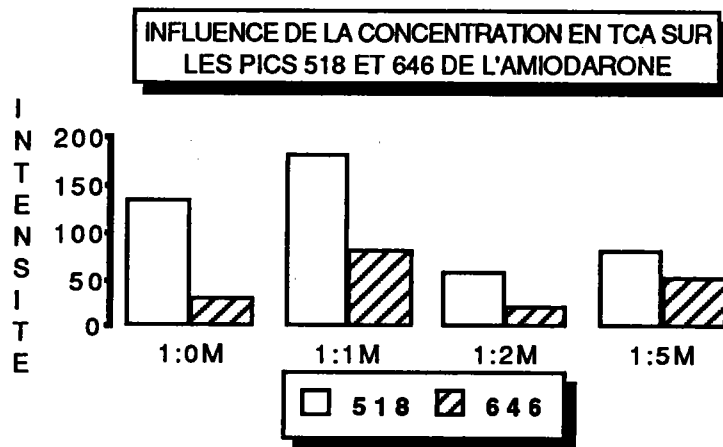
- longueur d'onde : 291,48 nm
- énergie sur l'échantillon : 1 μ J
- irradiance : 10^8 W/cm²
- potentiels : TOF 3000V - REFL 785V - LENS 1100V
- solvant : méthanol

* Codésorbant = Acide trichloroacétique (TCA) :

Nos résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Amiodarone + TCA	m/z = 518	m/z = 646
1 : 0	135 \pm 97	35 \pm 31
1 : 1	183 \pm 66	83 \pm 32
1 : 2	60 \pm 14	22 \pm 9
1 : 5	82 \pm 36	53 \pm 17

Tableau XII : Moyennes des intensités absolues du pic quasimoléculaire (M+H)⁺ et du pic de base m/z=518 de l'amiodarone en fonction de la quantité de TCA
(Moyennes sur 30 spectres individuels)



L'acide trichloroacétique favorise la formation des pics de masses $m/z = 518$ et 646 , l'optimum étant obtenu lorsqu'il est ajouté en quantité équimolaire à l'amiodarone. Ces résultats sont tout à fait logiques dans le cadre du concept des réactions ion-molécule en phase gazeuse.

* Codésorbant = Iodure de Césium :

Dans ce cas, les variations de concentration sont limitées. La microsonde LAMMA est particulièrement sensible à l'iode et au césium. Le seuil de sensibilité est très bas et les signaux dus à ces ions masqueront les autres signaux, s'ils sont en trop grande quantité. Une étude a été entreprise sur l'influence des différents iodures.

d- Influence de différents iodures

L'influence de différents iodures est étudiée dans les mêmes conditions que le paragraphe précédent : pour une mole d'amiodarone, un dixième de mole de sel C^+I^- est ajouté. Dans le tableau XIII, sont récapitulés nos résultats :

	x : y : z	5 1 8	6 4 6
AMIODARONE (A)	1 : 0	135 ± 97	35 ± 31
A:Csl	1 : 0,1	211 ± 55	48 ± 20
A:Nal	1 : 0,1	211 ± 40	66 ± 20
A:KI	1 : 0,1	200 ± 38	47 ± 10
A:Csl+TCA	1:0,1:0,1	309 ± 41	118 ± 23

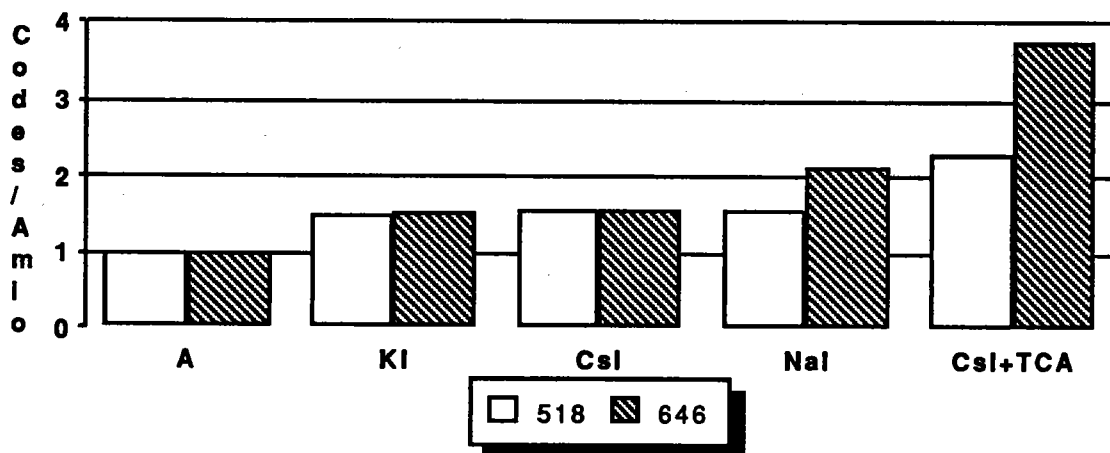
Tableau XIII : Moyennes des intensités absolues du pic quasimoléculaire $(M+H)^+$ et du pic de base $m/z=518$ de l'amiodarone obtenues pour différents iodures. (Moyennes sur 30 spectres individuels)

Ces expériences aboutissent à un résultat évident, lorsque l'on considère l'histogramme présenté ci-dessous. En effet, le rapport des intensités des pics de masses $m/z=518$ et 646 , obtenues avec et sans codésorbant, met en évidence l'influence bénéfique du mélange d'iodure de césium et d'acide trichloroacétique sur les intensités absolues. En effet, l'intensité du pic de masse $m/z=518$ est multipliée par 2,3 et celle du pic moléculaire $(M+H)^+$ par 3,8. Quant à la reproductibilité des analyses, on peut affirmer qu'elle est améliorée par rapport au composé pur au regard des valeurs des écarts standard.

L'influence des iodures de césium et de potassium est identique. On peut constater, dans ce cas, que les intensités des deux ions étudiés sont augmentées proportionnellement de la même façon.

L'iodure de sodium, quant à lui, améliore la formation du fragment de masse $m/z=518$ et, plus particulièrement, celle de l'ion moléculaire (la valeur de son intensité absolue est doublée).

INFLUENCE DES IODURES SUR LA DESORPTION DE L'AMIODARONE



Courbe 3 : Rapports R_{518} et R_{646} pour les fragments de masses $m/z=518$ et 646 de l'amiodarone en fonction du codésorbant ajouté.

$$R = \frac{\text{INTENSITE (Amiodarone + Codésorbant)}}{\text{INTENSITE (Amiodarone)}}$$

5) Essais avec addition de saccharose

L'efficacité effective d'un second composé pour désorber plus facilement une molécule organique de haut poids moléculaire est montrée par les essais précédents. Nous avons réfléchi au moyen d'utiliser ce résultat. En effet, il faudrait introduire un composé qui ne perturbe pas l'environnement pré-existant autour de l'amiodarone. Par exemple, lorsque le tissu biologique est découpé, les coupes sont recueillies par une gouttelette d'une solution aqueuse de saccharose. Nous avons donc testé ce produit organique comme co-désorbant éventuel de l'amiodarone.

a- Mélange d'amiodarone et de saccharose

Le mélange d'amiodarone pure et de saccharose en solution dans le méthanol, additionné de chlorure de sodium pour favoriser les réactions ion-molécule, est analysé par microsonde LAMMA. L'énergie sur l'échantillon est de 1 μ J. Les tests ont été réalisés aux deux longueurs d'onde : 286,5 et 225,7 nm.

On constate que l'influence de la longueur d'onde est négligeable dans ce cas : les résultats sont similaires. Deux familles de pics se superposent sur les spectres de masse :

- pour l'amiodarone : série classique des fragments + pic moléculaire
- pour le saccharose : l'ion quasimoléculaire $(M'+Na)^+$ à $m/z=365$

Il y a aucune interférence spectrale et les intensités des fragments de hautes masses ne sont pas, dans ce cas, inférieures à celles obtenues pour l'amiodarone seule, dans les mêmes conditions opératoires.

b- Dépôt de saccharose sur polymère dopé

La concentration de l'amiodarone dans l'épon dopé est de 4000ppm. Un microlitre de solution sucrée est déposé sur cette coupe et le solvant est évaporé. Les spectres LAMMA obtenus, avec cet échantillon, n'apportent pas de nouvelles informations par rapport aux spectres de masse sans sucre : ni le pic de masse $m/z=100$, ni aucun autre fragment caractéristique de l'amiodarone ne sont détectés.

c- Dépôt de saccharose sur une cryocoupe

Un mélange équimolaire d'amiodarone et de sucrose dans le méthanol est préparé ($[Amiodarone]=[saccharose]=10^{-3}M$). Un microlitre de cette solution est déposé sur une cryocoupe témoin (sans fixation au tétr oxyde d'osmium, ni aucun contrastant, épaisseur=0,25 μ m). Les spectres LAMMA obtenus en irradiant cet échantillon ne donnent aucun

renseignement quant à la présence de l'amiodarone. Le fragment $m/z=100$ n'apparaît pas alors que ce signal est souvent saturé sur le spectre de masse du produit pur.

d- Bilan

Notre volonté de trouver une molécule capable à la fois d'aider l'amiodarone à désorber tout en étant adaptée à l'analyse de coupes histologiques nous avait orienté naturellement vers le saccharose, substance largement utilisée en ultra-cryomicrotomie. Or, nos conclusions sont les suivantes :

- le sucrose n'est pas un codésorbant adéquat de l'amiodarone.
- la matrice biologique semble être la source d'effets matriciels lors de l'analyse de l'amiodarone par microsonde LAMMA : les interférences ne sont pas spectrales mais matricielles.

6) Essais LAMMA avec l'acide nicotinique

L'acide nicotinique est la molécule utilisée pour aider à désorber une molécule cible par matrice assistée (137). Il est ajouté d'abord en quantité équimolaire, puis à raison de dix moles par mole d'amiodarone. Les deux préparations sont déposées sur des grilles de microscopie électronique recouvertes de formvar.

Les conditions expérimentales sont les suivantes :

- longueur d'onde : 286,5 nm
- énergie sur l'échantillon : 1 μ J
- irradiance du laser : 10^8 W/cm²
- solvant : méthanol
- potentiels : TOF 3000V - REFL 785V - LENS 980V

Le tableau suivant rassemble nos résultats. Il faut noter que les valeurs des intensités absolues dans le cas de l'analyse d'amiodarone pure ne sont plus celles qui étaient précédemment données, du fait de modifications instrumentales. Ces valeurs correspondent aux nouvelles performances du LAMMA 500.

LAMMA 500	x : y (mole)	m/z=518	m/z=646
Amiodarone seule	1 : 0	122 ± 38	21 ± 10
AMIO + Acide Nicotinique	1 : 1	43 ± 17	9 ± 4
AMIO + Acide Nicotinique	1:10	13 ± 5	5 ± 3

Tableau XIV : Moyennes des intensités absolues du pic moléculaire et du pic de base en fonction de la quantité d'acide nicotinique additionné (Moyennes obtenues pour 30 spectres individuels).

Le tableau XIV illustre l'effet particulier qu'induit la microsonde LAMMA 500 sur la désorption assistée par matrice. Nous n'observons en fait qu'un effet de dilution de notre molécule cible : lorsque l'amiodarone est mélangée en quantité égale avec l'acide nicotinique, les intensités absolues du fragment $m/z=518$ et du pic moléculaire $m/z = 646$ (donc les nombres d'ions formés) diminuent environ d'un facteur deux par rapport aux intensités obtenues pour l'amiodarone pure. Cet acide organique n'est pas assez puissant pour aider la formation des ions $(M+H)^+$ par les réactions ion-molécule dans le plasma.

L'explication que nous avançons pour expliquer nos résultats est la suivante : **la configuration en transmission de notre appareil n'est pas idéale pour mettre en jeu les phénomènes de désorption assistée par matrice, contrairement à la microsonde**

LAMMA 1000 dans laquelle le support est massif et pour laquelle l'acide nicotinique a réellement un effet de matrice. Effectivement, en transmission, il y a éjection trop rapide des molécules de matrice lors de la perforation.

7) Conclusions

Nos travaux sur la codésorption avec la microsonde LAMMA 500 nous ont permis de sélectionner le mélange de **sel iodé et d'acide trichloroacétique** comme meilleur codésorbant de l'amiodarone. L'ajout de l'acide favorise la protonation de la molécule. Le sel iodé intervient certainement au moment de la désorption. En effet, il a été montré, dans le cas d'une molécule organique mélangée à un sel de potassium, que la vitesse d'éjection de l'ion K^+ est plus importante que celle de la molécule organique plus "lente" à désorber.

Toutefois, l'intérêt direct de ces résultats est réduit du fait qu'ils sont obtenus sur des composés purs. Il faudrait mettre au point un protocole susceptible d'appliquer ces résultats aux tissus biologiques.

Les résultats présentés ci-dessus sur la désorption de l'amiodarone assistée par l'acide nicotinique ont montré que notre microsonde LAMMA 500 n'est pas forcément adaptée à ce type d'expérience. La désorption assistée par matrice de molécules organiques de hauts poids moléculaires nécessitent de travailler sur *un appareil qui possède une configuration en réflexion et qui favorise la détection des hautes masses*. Pour réaliser cela, deux solutions étaient envisageables. Elles ont été mises en oeuvre toutes les deux :

- 1) faire des tests chez le professeur Hillenkamp sur microsonde LAMMA 1000,
- 2) travailler sur notre microsonde FTMS en prenant en compte ses avantages et ses limitations (les très hautes masses ($M > 3000 \text{ uma}$) ne sont pas analysables).

Toutes les deux sont mises en oeuvre.

C - TESTS AVEC LA MICROSONDE LAMMA 1000

1) Remarques préliminaires

Les tests réalisés à l'aide de la microsonde LAMMA 1000, dans les conditions définies par l'équipe d'Hillenkamp, nous serviront de tests références. On peut noter dès à présent qu'*une bonne matrice de désorption est définie comme donnant le pic moléculaire du composé analysé avec une intensité maximum et une fragmentation minimum.*

Les expériences se sont déroulées comme suit :

α) Tester différentes matrices pour l'amiodarone.

Dans un premier temps, utiliser les matrices reconnues efficaces comme l'acide nicotinique (NICAC) et le 3-nitrobenzylalcool (NOBA), dans les conditions usuelles de concentrations pour le composé à analyser et la matrice (10^{-3} et $5 \cdot 10^{-2}$ M respectivement). Ensuite, essayer d'autres matrices de désorption (acide vanillique, thymine, adénine...).

β) Estimer l'influence d'un ajout de TFA, de TCA ou de NaI sur la désorption.

χ) Avec la ou les meilleures matrices, rechercher la limite de détection de l'amiodarone.

2) Instrument et préparation des échantillons

a - Description de la microsonde LAMMA 1000

A la suite du succès qu'a remporté la microsonde LAMMA 500, la société Leybold-Heraeus a construit la microsonde LAMMA 1000 (schéma 3) en intégrant quelques changements (voir dessin page suivante). Ainsi ce nouvel appareil opère en mode d'irradiation laser par réflexion : l'angle entre l'irradiation du faisceau laser et l'extraction des ions est de 30° et cette géométrie permet l'analyse d'échantillons massifs.

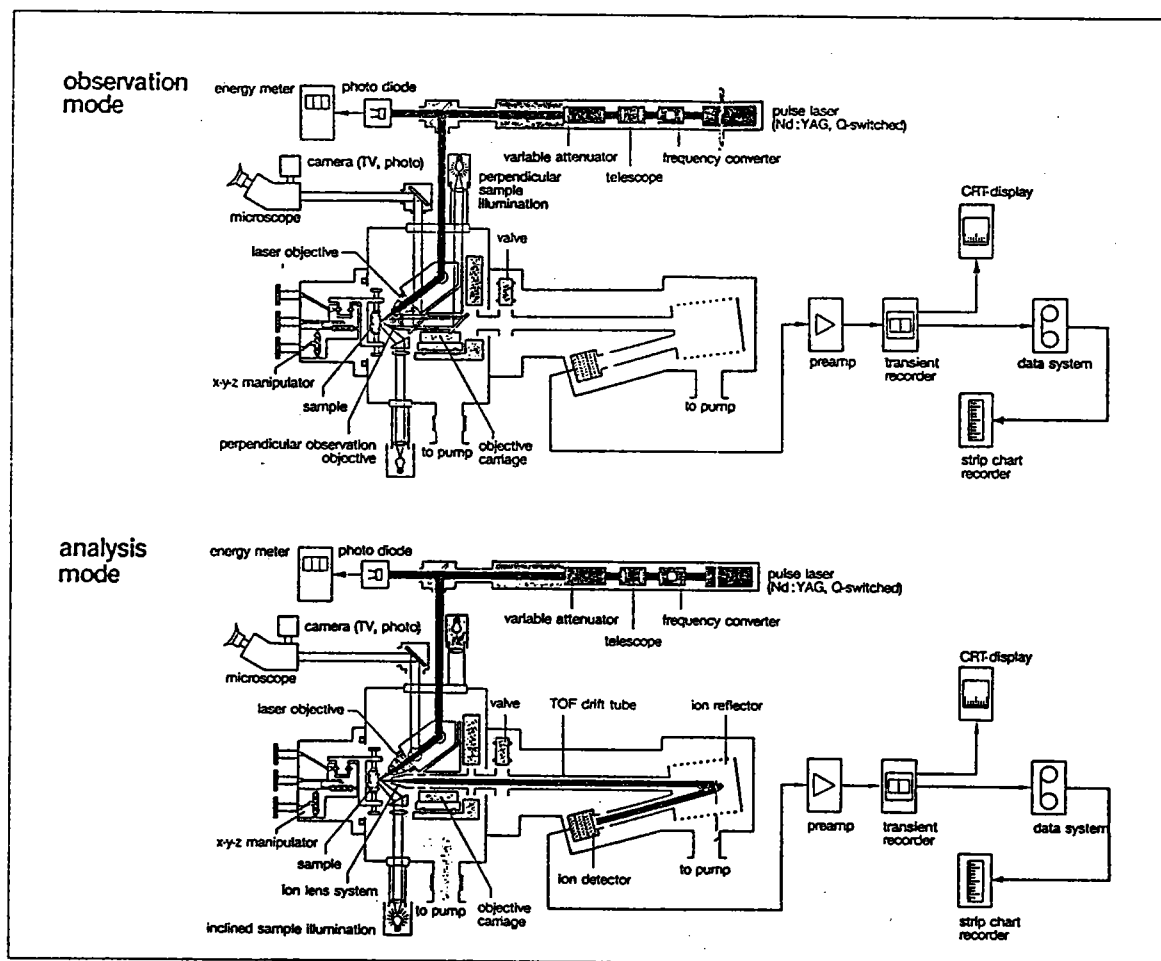
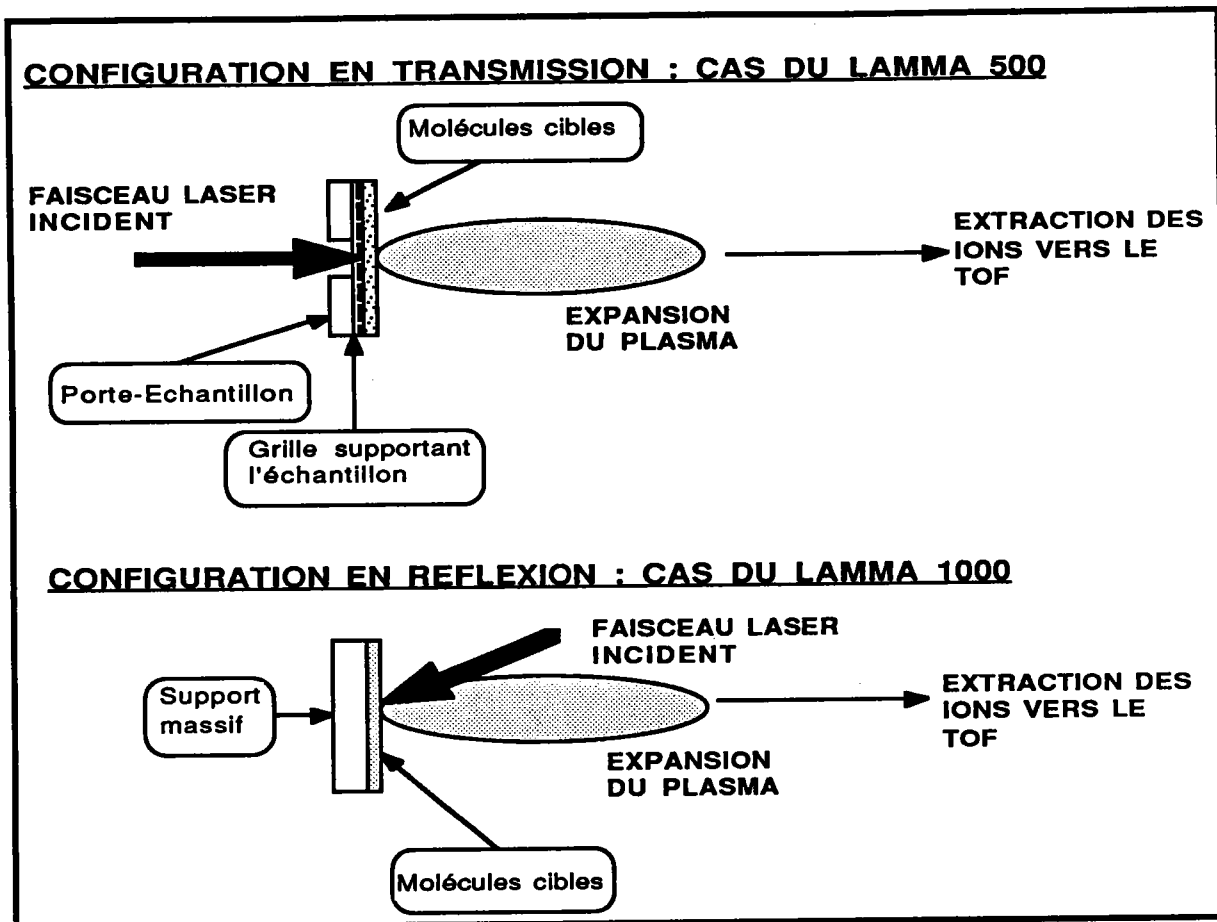


Schéma 3 : Microsonde LAMMA 1000



Des blocs, de diamètre au moins égal à 130 mm, peuvent être introduits et analysés avec une résolution spatiale de 5 μm . L'observation se fait in-situ par un microscope optique. Les optiques d'observation et d'extraction des ions sont placés **perpendiculaires** à la surface de l'échantillon, assurant une bonne image de l'échantillon et une haute sensibilité à la détection. Le LAMMA 1000 utilise un laser Nd-YAG quadruplé en fréquence (266 nm) pour ioniser la matière ainsi qu'un laser Hélium-Néon, colinéaire au précédent, pour visualiser le site d'analyse et estimer le degré de focalisation du laser. Outre la partie "échantillon" qui est donc différente, le principe du LAMMA 1000 reste le même que celui du LAMMA 500 (voir partie II) : les ions générés sont analysés en masses dans un spectromètre de masse à temps de vol.

Pratiquement, comme cela est indiqué dans la partie bibliographique, l'équipe d'Hillenkamp a modifié le potentiel appliqué à la post-accélération (à l'origine de 0 à ± 5 kV, maintenant 20 kV) afin d'analyser des molécules de hauts poids moléculaires.

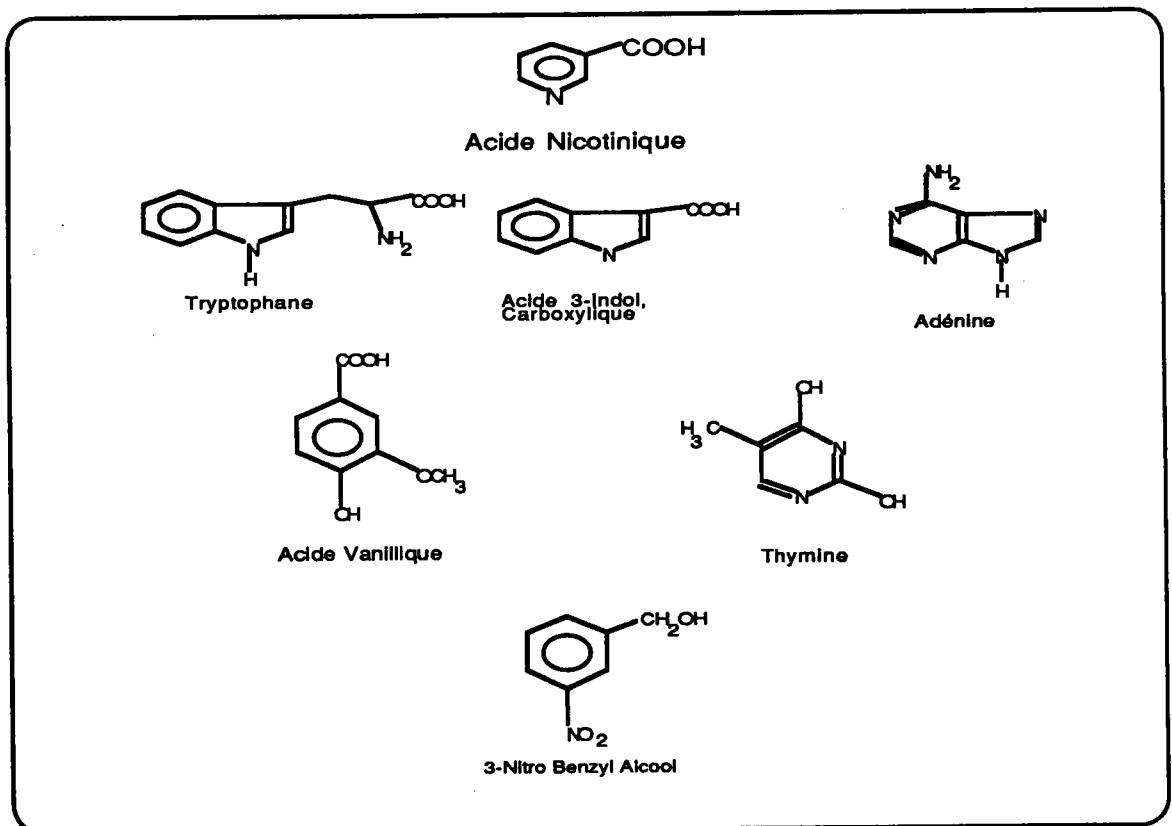
b - Echantillons

Le protocole de préparation des échantillons mis au point dans le laboratoire d'accueil est utilisé : un microlitre du mélange équivolumique du composé à analyser (10^{-3} à 10^{-6} M) et de la matrice ($5 \cdot 10^{-3}$ à 1 M) est déposé sur une plaque d'argent d'environ 1 à 3 cm², elle-même collée au substrat d'origine. Quatre gouttes peuvent être déposées en même temps sur la plaque. Un préséchage est réalisé sous air chaud. La plaque est ensuite mise en place dans le spectromètre et le séchage est terminé sous vide.

Les spectres sont obtenus avec une irradiance du laser variant entre 10^6 et 10^7 W/cm² en fonction du degré de focalisation du laser. L'échantillon est observé grâce au microscope optique et, pendant l'analyse, grâce à une caméra. La zone d'analyse est choisie en fonction de l'aspect du dépôt. L'homogénéité du dépôt est évidemment très importante car elle détermine la qualité des spectres. Les bords du dépôt sont à éviter pendant l'analyse, car ils sont généralement enrichis en composés par des phénomènes de ségrégation survenant pendant le séchage.

3) Résultats

Les tests ont été réalisés avec différents composés susceptibles d'être de bonnes matrices, car ils possèdent une structure ou des groupements capables d'absorber l'énergie, bien que nous ayons vu dans la bibliographie (paragraphe A) que cela n'est pas un critère suffisant. Il s'agit des composés suivants :



Les logarithmes de leurs coefficients d'extinction molaires à 266 nm sont compris entre 3,47 pour l'acide nicotinique et 4 pour l'acide vanillique. La position de la paire libre de l'azote dans la molécule d'acide nicotinique par rapport à la fonction -COOH peut éventuellement

être un facteur non négligeable pour une bonne matrice. En effet, dans l'introduction, nous avons relevé l'intérêt que présentent les composés méta-substitués ou les composés du même type que l'acide nicotinique (substituant en position 3 par rapport à l'azote du cycle).

Les tableaux XV, XVI et XVII rassemblent les différentes expérimentations réalisées sur le LAMMA 1000. Des problèmes de solubilisation survenus pendant la préparation de certaines solutions ont été résolus en adaptant la nature du solvant, afin d'avoir la meilleure dissolution possible.

La préparation du dépôt est identique pour tous les tests :

1 μ l de solution d'amiodarone dans l'eau bi-distillée et 1 μ l de solution de matrice sont déposés sur la plaque.

Les annotations (*) sur les tableaux XV, XVI et XVII correspondent à :

- (0) sans TFA,
- (1) solution d'amiodarone préparée avec de l'eau à 0,5 % TFA,
- (2) idem avec TCA,
- (3) addition d'un cristal d'iodure de sodium,
- (4) dissolution par les ultra-sons.

Quelques spectres de masse sont présentés en fin de paragraphe 3 pour illustrer nos commentaires.

Il convient de noter que les quantités absolues de composé cible déposées sur le support sont tout à fait comparables d'une matrice à l'autre, les valeurs très différentes des concentrations en amiodarone (ppm) dans la matrice solide sont le reflet des différences de masses moléculaires (excepté le NOBA, qui est un liquide visqueux).

a- Exemple type selon Hillenkamp

Le cas classique de désorption assistée par matrice est celui d'une protéine de masse moléculaire $M=10\ 000$ uma par exemple, désorbée dans une matrice d'acide nicotinique. Un microlitre de chaque solution est prélevé et le mélange obtenu est déposé et analysé. Le dépôt solide est caractérisé par sa concentration en poids de protéine dans la matrice solide et par la quantité totale de protéine déposée :

Solutions déposées			Protéine ds Matrice SOLIDE	
MATRICE		PROTEINE (M=10 000)	CONC(%)	QTE (µg)
NOM	CONC (M)	CONC (M)		
ACIDE NICOTINIQUE M=123	5.10-2	10-3	162	10
		10-4	16	1
		10-5	1,6	0,1

b- Tests de désorption de l'amiodarone avec différentes matrices

Ces tests sont rassemblés dans le tableau XV et commentés ensuite :

Solutions déposées			AMIO DS MATRICE SOLIDE		SPECTRES LAMMA			Réf.	°
MATRICE		AMIO			Int. (mv)				
NOM	CONC (M)	CONC (M)	CONC(ppm)	QTE (ng)	3 9 2	5 1 8	6 4 6		
ACIDE VANILLIQUE M=168	5.10-2	10-3	80 000	650	52	91	75	2	1
	5.10-2	10-4	8 000	65	180	101	59	3	1
ADENINE M=135	3.10-3	10-4	160 000	65	0	0	0	12	0
	3.10-3	10-4	160 000	65	0	33	26	13	1
THYMINE M=126	1,5.10-3	10-4	340 000	65	52	0	0	8	0
	1,5.10-3	10-4	340 000	65	104	140	33	9	1
TRYPTOPHAN M=203	5.10-2	10-4	6 000	65	0	0	0	-	1
3-INDOLE CA M=160	5.10-2	10-4	8 000	65	0	0	0	-	1

Tableau XV : Essais sur la microsonde LAMMA 1000 de différentes matrices de désorption pour l'amiodarone.

Acide Vanillique :

Le dépôt obtenu avec cette matrice est mauvais ; il se forme des cristaux.

D'autre part, on observe une fragmentation très importante de la molécule (spectres 2,3).

Adénine :

Les problèmes de solubilisation de la matrice dans l'eau sont extrêmement gênants. Sans addition de TFA, les fragments de hautes masses sont complètement inexistantes (spectre 12). Avec TFA, la molécule cible désorbe intacte : le pic moléculaire $(M+H)^+$ est présent ainsi que le fragment $(M-I)^+$ à $m/z = 518$ (spectre 13). L'allure générale du spectre reste médiocre.

Thymine

Les spectres LAMMA présentent les fragments connus de hautes masses de l'amiodarone ainsi qu'une fragmentation importante aux basses masses. En valeurs absolues, ce sont 65 nanogrammes d'amiodarone qui ont été déposés sur la plaque d'argent : la thymine joue davantage le rôle de codésorbant que de matrice proprement dite. Les spectres avec (spectre 9) et sans TFA (spectre 8) montrent que l'acide favorise la formation des ions de hautes masses par le biais de réactions ion-molécule dans la phase gazeuse.

Tryptophane et Acide 3-Indole Carboxylique :

Avec ou sans ajout de TFA, aucun fragment de l'amiodarone n'est obtenu. On obtient, dans les deux cas, seulement les fragments caractéristiques des matrices.

c- Alcool NitroBenzylique (NOBA)

Solutions déposées			AMIO DS MATRICE SOLIDE		SPECTRES			LAMMA	
MATRICE		AMIO			Int. (mv)			Réf.	'
NOM	CONC (M)	CONC (M)	CONC(ppm)	QTE (ng)	3 9 2	5 1 8	6 4 6		
NOBA M=153 d=1,3	PUR	un cristal			13	72	183	1	0
	PUR	10-4/NOBA	60	65	0	0	0	-	4
	PUR	10-4/NOBA	60	65	0	0	0	-	4
	+ 5% EtOH	10-3	500	650	0	59	183	10	0
	+ 5% EtOH	10-4	50	65	0	0	29	11	0
MELANGE 1 NOBA 2µl EAU 1µl METHANOL 3µl	2,8	10-3	1 500	650	0	59	209	5	1
		10-4	150	65	26	20	65	4	1
MELANGE 2 NOBA 2µl AMIO DS EAU 1µl METHANOL 3µl	2,8	10-3	250	215	0	0	39	16	0
		10-4	25	21,5	0	0	0	-	0
		10-3	250	215	26	0	62	17	1
		10-4	25	21,5	0	0	0	18	1
MELANGE 3 NOBA 0,5µl EAU 1µl METHANOL 3µl	0,94	10-4	450	65	26	72	163	29	1
		10-5	45	6,5	72	39	59	31	1
		10-6	4,5	0,65	0	0	0	-	1
MELANGE 4 MELANGE3 (1µl) NICAC(5.10-2M)(1µl)	0,47 0,025	10-4	850	65	26	78	134	28	1

Tableau XVI : Tests de désorption avec l'alcool nitrobenzylique

Un cristal d'amiodarone dans une goutte de NOBA donne effectivement un spectre classique du composé avec un ion quasimoléculaire $m/z=646$ de forte intensité et pratiquement aucune fragmentation en basses masses.

L'homogénéité de la solution préparée avec NOBA additionné de 5% d'éthanol est très mauvaise, car le NOBA est un liquide extrêmement visqueux. Pour la concentration en amiodarone égale à 500 ppm, le spectre présente un pic quasimoléculaire $(M+H)^+$ assez intense. A 50 ppm, le signal obtenu n'est pas totalement significatif. Compte tenu de l'inhomogénéité de la solution et donc de la qualité du dépôt analysé, les spectres obtenus ne sont pas forcément représentatifs.

Les mélanges 1, 2, 3 et 4 (définis dans le tableau XVI) ont été réalisés afin de s'affranchir des problèmes physiques que pose le NOBA. Au delà de 6 nanogrammes déposés sur la plaque, l'amiodarone n'est plus détectée dans cet environnement.

d- Acide Nicotinique (NICAC)

Solutions déposées			AMIO DS MATRICE SOLIDE		SPECTRES LAMMA				
MATRICE		AMIO			Int. (mv)			Réf.	*
NOM	CONC (M)	CONC (M)	CONC(ppm)	QTE (ng)	3 9 2	5 1 8	6 4 6		
NICAC M=123	5.10-2	10-4	10 000	65	137	72	0	7	0
	5.10-3	10-4	100 000	65	46	101	52	2 6	0/3
	5.10-2	10-4	10 000	65	101	83	18	2 3	2
	5.10-3	10-4	100 000	65	52	131	23	2 4	2
	5.10-2	10-4	10 000	65	188	167	44	6-2 1	1
	5.10-3	10-4	100 000	65	105	206	35	2 2	1
	5.10-3	10-5	10 000	6,5	72	29	0	2 5	1
	5.10-3	10-6	1 000	0,65	0	0	0	2 7	1
	5.10-4	10-5	100 000	6,5	0	0	0	-	
	5.10-4	10-6	10 000	0,65	0	0	0	-	

Tableau XVII : Tests de désorption avec l'acide nicotinique

Les tests avec l'acide nicotinique permettent de mettre en évidence les influences des concentrations absolues et relatives de la molécule cible et de la matrice. On constate que, lorsque 6 nanogrammes d'amiodarone sont déposés sur les 1 à 4 mm² du support, plus aucun signal sur le spectre ne permet de caractériser la molécule. Les meilleurs spectres présentent la plus faible fragmentation en basses masses et des ions caractéristiques de hautes masses (spectres 6, 7, 21, 23). Le sel d'iodure de sodium n'améliore en aucune façon l'allure générale du spectre (spectre 26). Son influence sur la désorption de l'amiodarone est illustrée par les valeurs des intensités des pics relevées sur le spectre. On peut constater qu'en présence d'iodure, le pic moléculaire est plus intense.

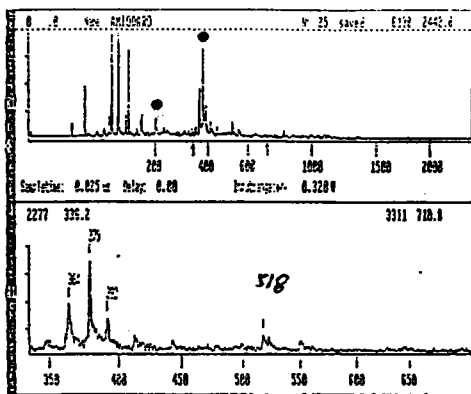
L'addition de TFA améliore l'aspect des spectres ((sans TFA) n°7 et (avec TFA) n°21). Le pic moléculaire inexistant sur le premier spectre a une intensité non négligeable sur le second. Ainsi l'acide permet de protoner la molécule dans les réactions en phase gazeuse. Bien que moins bon que le TFA, l'effet du TCA sur la désorption de l'amiodarone est effectivement non nul, puisque le pic moléculaire apparaît également en sa présence.

Le seuil de détection de l'amiodarone est atteint lorsque seuls 0,65 nanogrammes sont déposés sur le support, la concentration étant alors de 1000 ppm dans l'acide nicotinique. Les fragments de hautes masses sont inexistant ; on note, entre autres, la présence des fragments de masses $m/z = 86, 100$ et 201 .

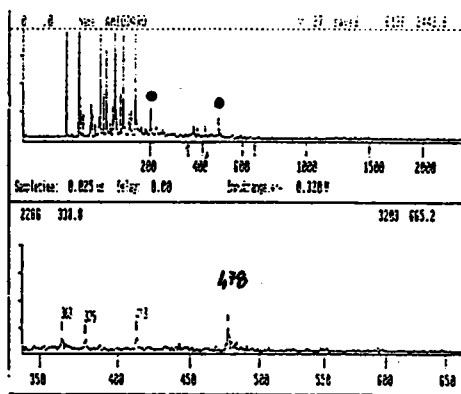
Le mélange des deux matrices (Nicac et Noba) n'apporte aucune amélioration quant à la désorption de l'amiodarone.

Nous ferons ici quelques remarques concernant les expériences réalisées sur la microsonde LAMMA 1000 :

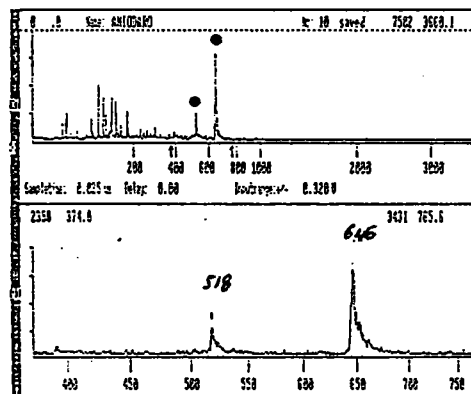
- La matrice NOBA allonge considérablement les temps de pompage dans la chambre d'échantillonnage du spectromètre. Cet inconvénient majeur exclura quasiment son utilisation sur la microsonde FTMS, dans laquelle le vide est encore plus poussé (entre 10^{-8} et 10^{-9} torr) que dans les microsondes LAMMA (10^{-6} à 10^{-7} torr).
- Des tests supplémentaires de reproductibilité auraient été nécessaires avant de conclure définitivement. Nous n'avons pas fait effectivement de séries d'expériences et les intensités des pics 392, 518 et 646 (données dans les tableaux XV, XVI et XVII) sont issues uniquement de spectres individuels.



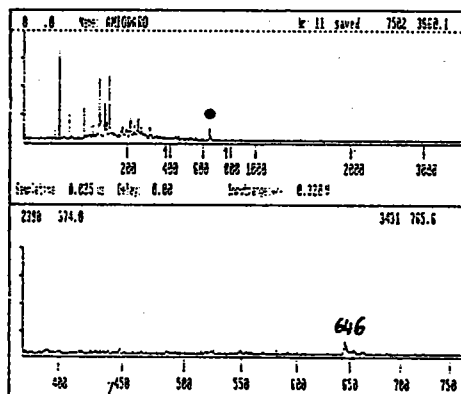
25: Amio-10⁻⁵ M dans ACIDE NICOTINIQUE / TFA



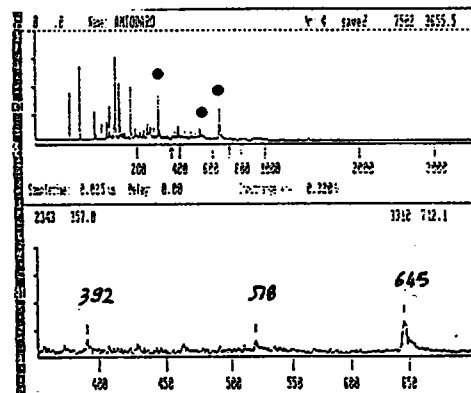
27: Amio-10⁻⁶ M dans ACIDE NICOTINIQUE / TFA



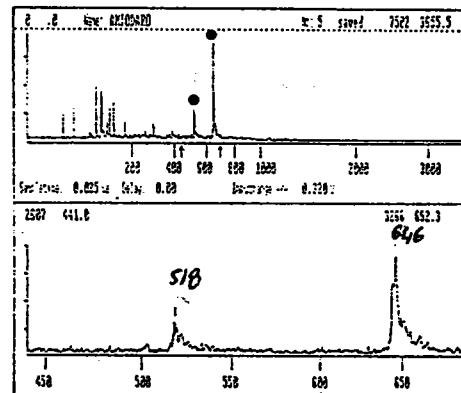
18: Amio-10⁻³ M dans NOBA+ETHANOL



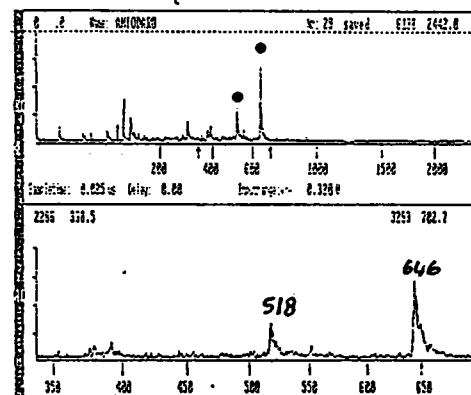
11: Amio-10⁻⁴ M dans NOBA+ETHANOL



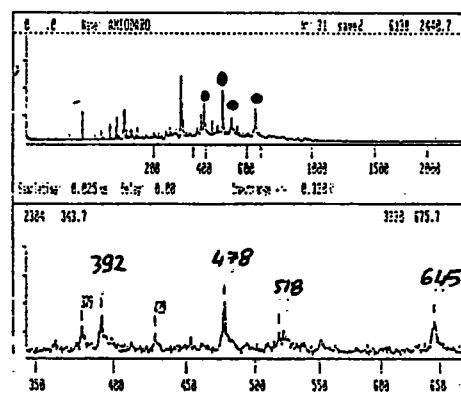
4: Amio-10⁻⁴ M dans NOBA/EAU/ETHANOL(1) + TFA



5: Amio-10⁻³ M dans NOBA/EAU/ETHANOL(1) + TFA

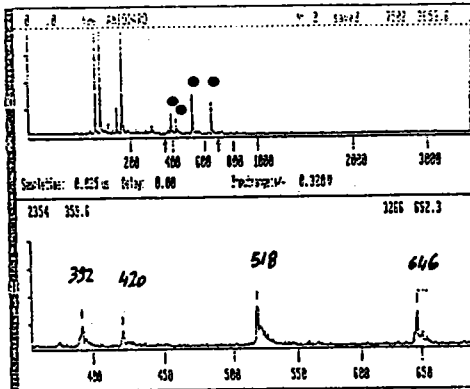


29: Amio-10⁻⁴ M dans NOBA/EAU/ETHANOL(3) + TFA

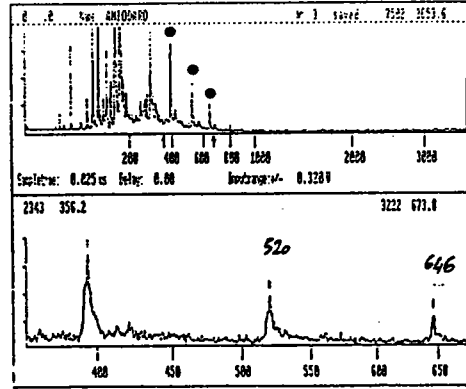


31: Amio-10⁻⁵ M dans NOBA/EAU/ETHANOL(3) + TFA

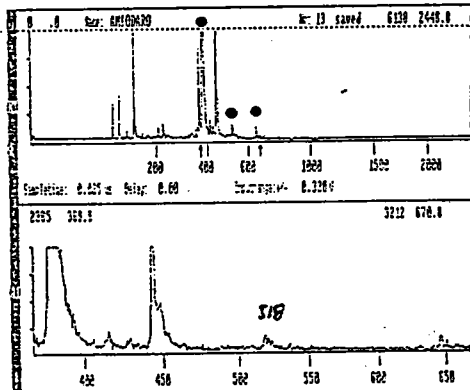
• Fragment Caractéristique de l'amiodorone



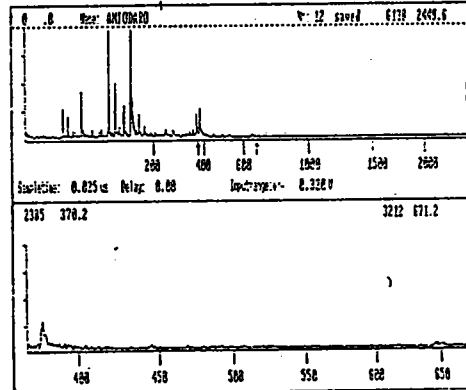
2 Amio-10⁻³ M dans ACIDE VANILIQUE + TFA



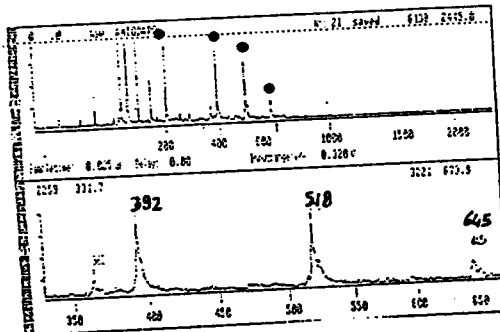
3 Amio-10⁻⁴ M dans ACIDE VANILIQUE + TFA



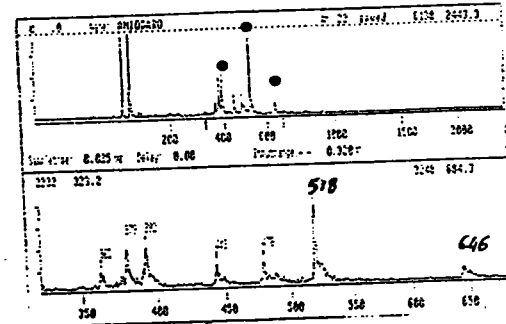
13 Amio-10⁻⁴ M dans ADENINE



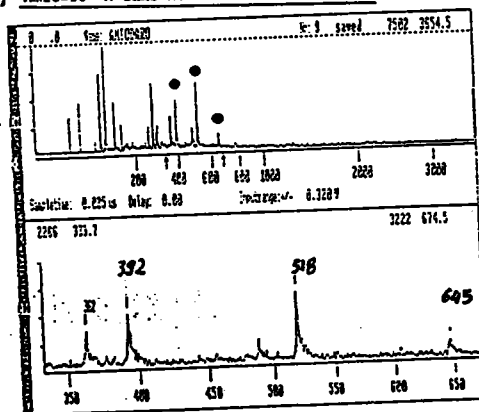
12 Amio-10⁻⁴ M dans ADENINE + TFA



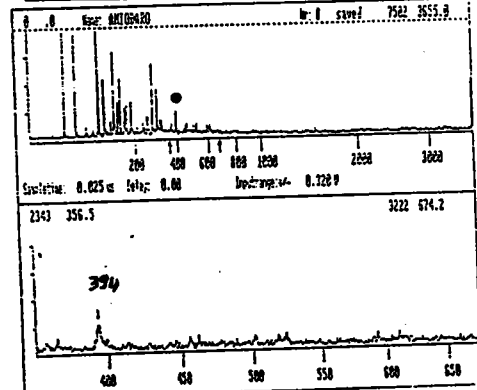
21 Amio-10⁻⁴ M dans ACIDE NICOTINIQUE + TFA



22 Amio-10⁻⁴ M dans ACIDE NICOTINIQUE + TFA



9 Amio-10⁻⁴ M dans THYMINE + TFA



8 Amio-10⁻⁴ M dans THYMINE

• Fragment caractéristique de l'amiodarone

4) Discussions

La désorption de molécules de très haut poids moléculaires, telles que les protéines, est un cas d'école pour cette nouvelle technique de désorption douce proposée par Hillenkamp. Dans les conditions standard, qu'il a définies pour désorber une protéine, les concentrations respectives de la protéine et de l'acide nicotinique sont 10^{-4}M et $5 \cdot 10^{-2}\text{M}$. L'exemple d'une molécule cible de masse moléculaire égale à 10 000 uma est pris. Sur le support, sont présentes environ une mole de protéine pour 500 moles d'acide ! L'application à l'amiodarone, petite molécule en comparaison, n'est pas simple. Le rapport molaire reste effectivement le même pour ces mêmes conditions de concentration, mais on passe de 16,3 % en poids de protéine dans l'acide nicotinique à 1% en poids d'amiodarone dans l'acide nicotinique.

Le choix d'une matrice idéale est motivé par les caractéristiques suivantes :

- * Ses propriétés intrinsèques sont essentielles, à savoir une bonne viscosité, une bonne solubilisation dans l'eau (compatible avec l'analyse des protéines), ou plus généralement dans un solvant courant, et, enfin un bon coefficient d'extinction molaire ϵ à la longueur d'onde utilisée.
- * Le mélange du composé à analyser et de la matrice doit être idéal et le dépôt très homogène, afin d'obtenir la meilleure répartition du composé dans la matrice. En d'autres termes, toutes les molécules du composé cible sont "solvatées" par les molécules de la matrice.

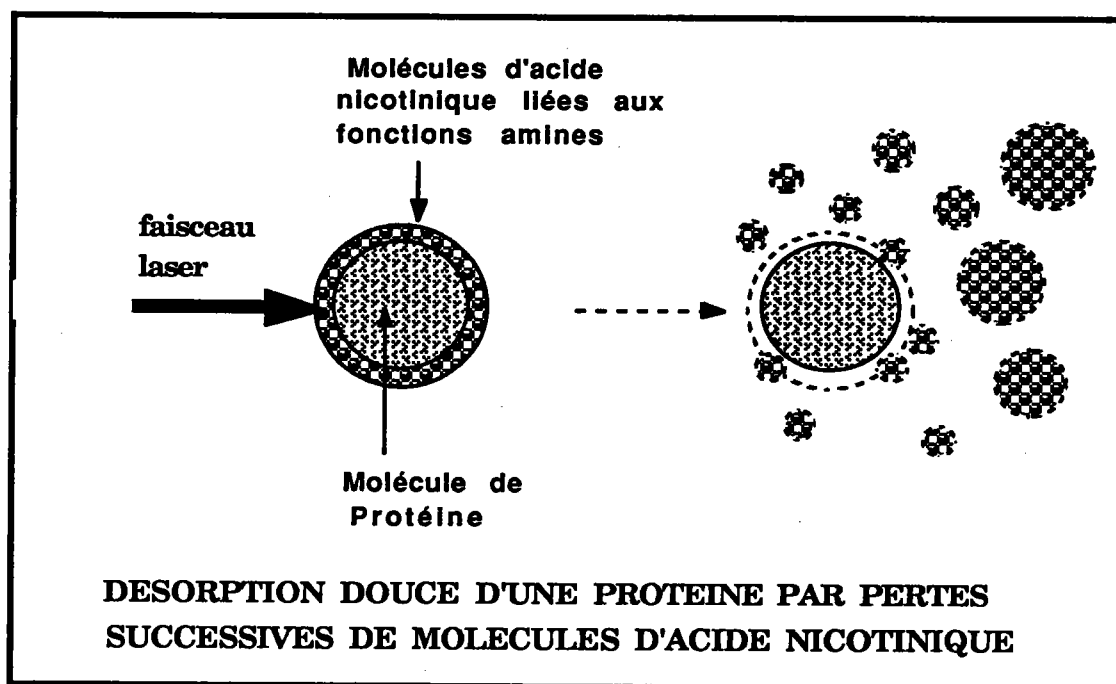
* La présence de la matrice doit induire une fragmentation très faible (ou mieux inexistante) de la cible aux basses masses et un meilleur rendement en ion moléculaire.

L'utilisation d'une matrice pour assister la désorption de l'amiodarone dans la configuration instrumentale en réflexion a permis d'atteindre effectivement d'autres limites que celles atteintes avec le LAMMA 500, configuration en transmission. L'analyse de l'amiodarone (une mole) dans l'acide nicotinique (dix moles) a été effectuée sur les deux LAMMA. Les intensités du pic moléculaire et du fragment majoritaire ($m/z=518$), données ici en rappel, sont extraites des tableaux XII et XVII.

INTENSITES (mv)	Amiodarone (1 mole) Acide Nicotinique (10 moles)	
	518	646
Pics de masse m/z	518	646
LAMMA 500	13	5
LAMMA 1000	101	52

Outre le facteur **post-accélération** supplémentaire difficilement quantifiable pour les ions de faibles masses, la géométrie du système d'analyse semble donc un facteur déterminant. Les intensités obtenues sur le LAMMA 1000 sont environ 10 fois supérieures à celles obtenues avec le LAMMA 500. En effet, on peut rappeler que, dans le cas du LAMMA 500, il faut absolument perforer l'échantillon tandis qu'avec le LAMMA 1000, la désorption est provoquée par le transfert d'énergie des molécules de matrice environnant l'amiodarone à cette dernière. La désorption, assistée par matrice, de biomolécules telles que les protéines fonctionne parfaitement pour la raison suivante. Chaque protéine possède un nombre très élevé de fonctions amines, qui sont en quelque sorte des points d'ancrage pour

fonctions amines, qui sont en quelque sorte des points d'ancrage pour les molécules de matrice. La molécule "solvatée" est alors désorbée en douceur lors de l'irradiation laser (voir le dessin ci-dessous).



L'amiodarone ne possède, quant à elle, qu'une fonction amine, seul site hydrophile de la molécule. On attribue souvent comme rôle principal à la matrice d'absorber préférentiellement à la molécule cible l'énergie, du fait de leurs coefficients d'absorption molaires respectifs. Or, l'amiodarone possède un coefficient relativement élevé à 266 nm ($\log \epsilon = 3,96$, tandis que pour l'acide nicotinique $\log \epsilon = 3,47$). Aussi peut-on affirmer, suite à cette remarque, que la matrice a des rôles multiples : même si elle n'absorbe pas l'énergie, elle permet d'isoler les molécules d'amiodarone les unes des autres et peut également aider à l'ionisation de la molécule cible dans la phase gazeuse.

5) Conclusions

Ces différents tests, effectués dans le but d'améliorer la désorption de l'amiodarone à 266 nm, ont permis de sélectionner deux matrices. Il s'agit de l'acide nicotinique et éventuellement du 3-nitrobenzylalcool. Grâce à l'utilisation de ces matrices, la limite de détection de l'amiodarone est atteinte pour des solutions aqueuses d'amiodarone à 10^{-6} M, soit une concentration de 1000 ppm dans la matrice nicotinique. L'optimisation de la concentration de la solution de matrice, dans le cas de l'acide nicotinique, et le choix d'un meilleur mélange, dans le cas de l'alcool nitrobenzylique, ont pu être réalisés.

Nous avons pu constater que l'acide trifluoroacétique ajoute un plus à la désorption de l'amiodarone dans le cas des matrices thymine, adénine, acide nicotinique et alcool nitrobenzylique. Cet acide est déjà connu comme additif pour améliorer la qualité des dépôts. Quant à l'acide trichloroacétique, il semble avoir un effet beaucoup moins marqué : ajouté à l'acide nicotinique, il n'apporte aucun gain en d'ionisation, contrairement aux résultats obtenus avec la microsonde LAMMA 500. Des tests supplémentaires permettraient de mieux cerner son impact sur la désorption organique.

D - TESTS AVEC LA MICROSONDE FTMS

1) Remarques préliminaires

Nos expériences précédentes sur les microsondes LAMMA 500 et 1000 ont montré qu'en plus de la post-accélération des ions, *la configuration en réflexion* est un facteur important pour bien désorber les molécules organiques de hauts poids moléculaires en présence d'une matrice. Les tests réalisés chez le professeur Hillenkamp constituent nos tests de référence en matière de désorption. Aussi, dans la suite de notre travail, la meilleure matrice a été conservée : l'acide nicotinique. Dans le but d'améliorer la qualité du dépôt, l'acide trifluoroacétique est très classiquement utilisé, aussi a-t'il été testé. Nous avons également testé la matrice nitrocellulose, dont la structure proche du saccharose et la nature polymérique permettraient une application possible pour des échantillons biologiques.

Le spectromètre de masse à transformée de Fourier (FTMS) possède la configuration adéquate pour les expériences de désorption assistée par matrice. Toutefois, il est essentiel de rappeler la différence fondamentale entre cet appareil et le LAMMA 1000 :

- Dans le premier cas, les ions sont piégés dans la cellule d'analyse avant d'être détectés.
- Dans le second cas, les ions sont extraits et analysés immédiatement par temps de vol. Les temps de réaction sont alors beaucoup plus courts, de l'ordre de la nanoseconde (au lieu de la milliseconde).

La désorption laser couplée à une microsonde FTMS est aujourd'hui couramment utilisée, le laser le plus souvent employé étant le laser

CO₂. Celui-ci induit des effets très importants de désorption thermique en couronne autour du point d'impact du laser. Dans notre cas, la microsonde FTMS est couplée à un laser excimère, qui selon les gaz lase à 193 (ArF) ou 249 nm (KrF). Dans un premier temps, les paramètres d'analyse appliquée à l'amiodarone ont été optimisés, puis l'influence de l'acide nicotinique sur sa désorption est étudiée. Les divers facteurs intervenant dans l'analyse seront discutés :

- le support,
- la qualité du dépôt,
- la défocalisation du laser,
- le nombre d'impacts laser.

2) Préparation des échantillons

* Pour préparer les dépôts, les solutions utilisées sont des solutions d'amiodarone dans l'eau (10⁻³M), de nitrocellulose dans l'acétone (10 mg pour 0,1 ml), d'acide nicotinique dans l'eau (5.10⁻²M).

* Le protocole de préparation est résumé dans le tableau XVIII :

	Préparation des dépôts	[AMIO] relative en poids
AMIO SEULE	d(2,0,0) - SΔ	100%
AMIO+NITROCELLULOSE	d(1,0,1) - Sa	0,60%
AMIO+NICAC	d(1,1,0) - SΔ	10%
AMIO+NICAC +NITROCELLULOSE	d(1,1,1) - Sa	0,60%
AMIO+NICAC SUR FILM DE NITROCELLULOSE	d(0,0,2) - Sa - d(1,1,0) - Sa	10%

Tableau XVIII : Protocole de préparation des dépôts pour l'analyse par microsonde FTMS.

- Amio= Amiodarone, Nicac= Acide Nicotinique
- d(a,b,c) = dépôt de a µl d'amiodarone, b µl d'acide nicotinique et c µl de nitrocellulose sur la plaque d'aluminium ou d'argent (surface couverte par le dépôt : environ 10 mm²)
- SΔ, Sa = séchages sous flux d'air chaud, à température ambiante

3) Expérimentations

a- Influence du support

Les expériences sur le LAMMA 1000 ont été effectuées sur des supports en *argent*. Sur la microsonde FTMS, les résultats obtenus avec ce métal ont induit des erreurs. Bien que les supports en argent soient connus pour donner un bon rendement ionique, certains auteurs (126) ont noté qu'il n'est pas toujours le meilleur, car des réactions de surface complexes peuvent rendre difficile l'interprétation des spectres de masse. En effet, on constate que l'analyse de l'amiodarone déposée sur argent donne naissance à un spectre de masse contenant des pics inconnus. Ils correspondent, à une ou deux unités de masse près, à la valeur du pic moléculaire et à un fragment caractéristique : 519, 648.

Dans le cas d'analyses sur support *en aluminium*, il apparaît également, dans les conditions optimisées pour les hautes masses, une série de pics inconnus : 493, 525, 551....

Or on constate que, pour ces deux métaux, les pics parasites existent même lorsque le support nu est analysé. Aussi avons-nous préférentiellement utilisé dans la suite de l'étude l'aluminium, car il n'induit pas d'erreur sur l'existence ou non des fragments de l'amiodarone. Les intensités de ces pics parasites sont très faibles comparées à celles des pics sur lesquels se portent notre intérêt.

b- Optimisation de la séquence de désorption

Les paramètres optimisés de la séquence laser sont présentés dans le chapitre II de cette partie, paragraphe C-2b.

4) Comparaison LAMMA 1000 - FTMS

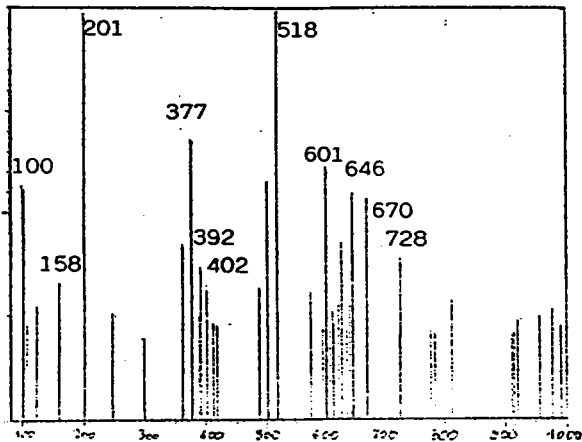
Une expérience préliminaire est faite sur la microsonde FTMS dans les mêmes conditions d'échantillonnage que sur le LAMMA 1000, exceptions faites donc du support (en aluminium) et de la longueur d'onde (193 au lieu de 266 nm).

L'énergie sur l'échantillon est de 25 μ J. Le laser est défocalisé, *de façon à faire varier l'irradiance*, en déplaçant horizontalement le télescope placé sur le chemin optique du laser et cette défocalisation est quantifiée en nombre de tours. Les paramètres optimisés du spectromètre de masse, tels qu'ils ont été définis précédemment, sont adoptés. Dans ces conditions, les spectres de masse de l'amiodarone sont collectés avec et sans acide nicotinique (spectres 19 page suivante). Le tableau XIX présente un bilan des observations faites :

Laser Excimère - 193 nm	ACIDE NICOTINIQUE (NICAC)	
	SANS	AVEC
Focalisé - diamètre:30microns Irradiance: 9,4 . 107W/cm2 Télescope : 0 tour	Iode I+ à m/z=127	I+ à m/z=127 (Nicac)+ à m/z=123
Défocalisé - diamètre:90microns Irradiance: 1,6 . 107W/cm2 Télescope : -5 tours	Idem	Apparition des pics de masses m/z=518 et 646 et massif important entre 200 et 400 amu
Défocalisé - diamètre:120microns Irradiance: 8,8 . 106W/cm2 Télescope : -10 tours	Apparition des pics de masses m/z=518 et 646 et massif important entre 200 et 400 amu	Beau spectre de l'amiodarone présentant ses fragments classiques.
Défocalisé - diamètre:140microns Irradiance: 6 . 106W/cm2 Télescope : -13 tours	Fragmentation caractéristique de l'amiodarone	Idem

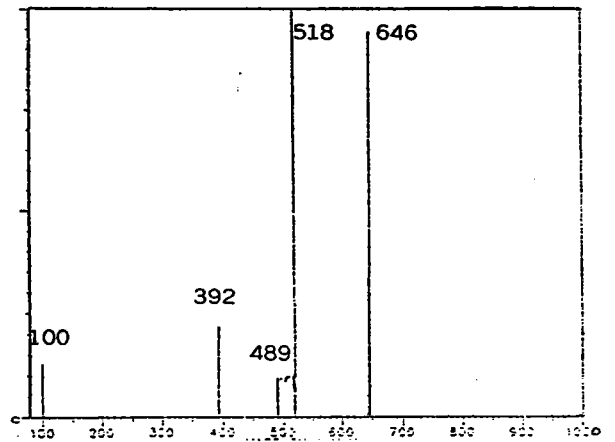
Tableau XIX : Spectres FTMS de l'amiodarone, avec et sans acide nicotinique, en fonction de la défocalisation du laser

AMIODARONE SEULE SUR Al

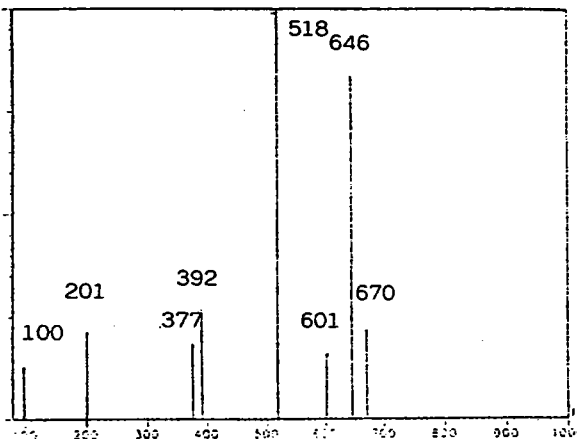
1°) IRRADIANCE : 9.10^6 W/cm^2 

Bruit de fond soustrait : 15 %

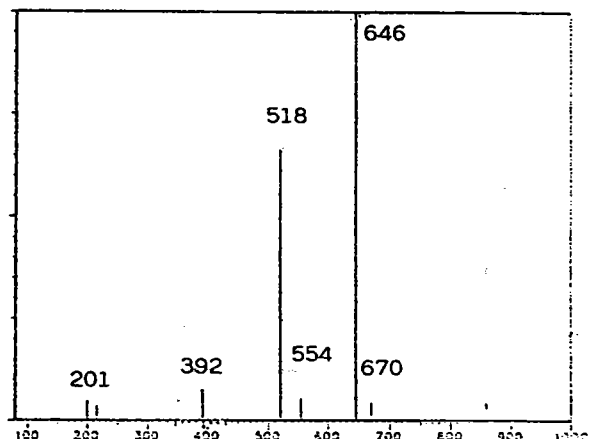
AMIODARONE AVEC ACIDE NICOTINIQUE SUR Al



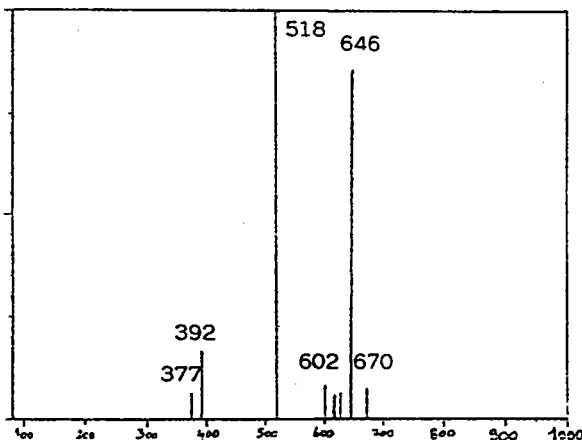
BF : 4 %

2°) IRRADIANCE : 7.10^6 W/cm^2 

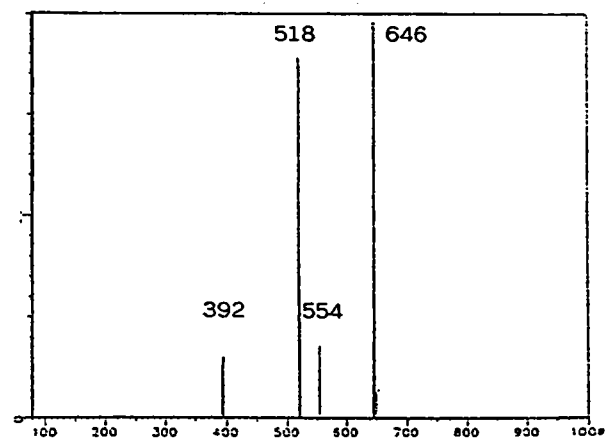
BF : 9 %



BF : 3 %

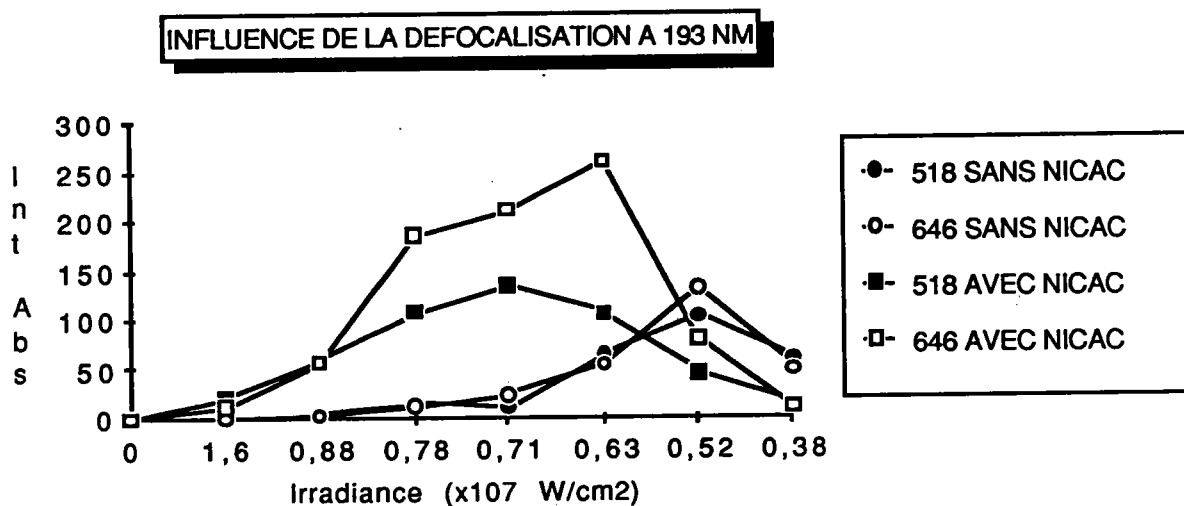
3°) IRRADIANCE : 5.10^6 W/cm^2 

BF : 4 %



BF : 3 %

Spectres 19 : Influence de l'acide nicotinique sur la désorption de l'amiodarone en FTMS à 193 nm



Courbe 4: Influence de la défocalisation du laser sur la désorption du pic moléculaire et du fragment mono-désiodé de l'amiodarone.

Les intensités absolues du fragment $m/z = 518$ et du pic quasimoléculaire $m/z = 646$ sont portées sur la courbe 4 en fonction de l'irradiance du laser. (Il existe une certaine incertitude sur les valeurs d'irradiance, lorsque la défocalisation est importante). On constate que, non seulement, le pic moléculaire apparaît à plus faible irradiance, mais, également plus intensément en présence d'acide nicotinique. Lorsque l'irradiance est inférieure ou égale à $6 \cdot 10^6$ W/cm², elle n'est plus optimale pour désorber l'amiodarone : le spectre reste encore caractéristique de l'amiodarone mais la valeur de l'intensité absolue du pic moléculaire chute. Cette remarque est aussi valable pour le fragment de masse $m/z=518$, la diminution de l'intensité absolue étant toutefois moins marquée.

Nos présentes expériences confirment les résultats obtenus sur microsonde LAMMA 1000 : l'acide nicotinique permet de désorber de manière plus efficace et sans fragmentation excessive l'amiodarone par microsonde FTMS, bien que son coefficient d'absorption molaire soit

inférieur à celui de l'amiodarone aussi bien à 193 nm qu'à 266 nm. Son rôle semble donc différent de celui qu'il tient vis-à-vis des protéines dans les expériences d'Hillenkamp. Dans notre cas, il dilue les molécules cibles et les isole les unes des autres. Nos résultats mettent en évidence ce paramètre de solvation de la molécule cible par les molécules de matrice. A haute température, des clusters constitués d'amiodarone et d'acide se forment dans le plasma. Quand la température baisse, des molécules d'acide sont libérées laissant l'amiodarone intacte, désorbée. A défaut d'absorber préférentiellement l'énergie, l'acide nicotinique aide à l'ionisation (127).

En conclusion, notre test préliminaire sur la microsonde FTMS a permis de reproduire les résultats obtenus sur microsonde LAMMA 1000. Les irradiances de désorption sont comparables : environ 10^7 W/cm² pour le LAMMA à 266 nm et $8 \cdot 10^6$ W/cm² pour le FTMS à 193 nm. Il faut simplement utiliser l'aluminium au lieu de l'argent comme support. Compte-tenu de la masse moléculaire de l'amiodarone relativement faible par rapport à celles des protéines, un processus tel que la post-accélération équipant la microsonde LAMMA ne nous fera pas défaut sur la microsonde FTMS et sa limitation pour les très hautes masses ($m/z \geq 3000$ uma) n'est pas, dans ce cas, critique.

5) Influences de la matrice et de la longueur d'onde

Les expériences précédentes ont montré l'influence de l'irradiance du laser sur les spectres de masse. Aussi pour les analyses suivantes, nous fixons l'irradiance à environ $9 \cdot 10^6$ W/cm² en adoptant toujours la même défocalisation, soit -10 tours au télescope. Les conditions expérimentales, qui restent constantes pour ces études d'influence de

paramètres (matrice et longueur d'onde), sont les suivantes :

- support : plaque d'aluminium
- laser : Excimère 193 ou 249 nm (préférence à 193 nm)
- diamètre : environ 120 μm (laser défocalisé)
- énergie : 25 μJ sur l'échantillon/irradiance : $9.10^6\text{W}/\text{cm}^2$.
- nombre d'impacts laser (NSW) :10
- Paramètres FTMS : SWR=600 Hz et $V_{\text{trap}}=0,25$ V.

Pour chacune des "combinaisons" : amiodarone, acide nicotinique, nitrocellulose présentées dans le tableau XVIII, dix spectres individuels sont enregistrés. Les intensités absolues des fragments caractéristiques ($m/z = 100, 201, 203, 392$ et 518) ainsi que celles des ions quasimoléculaires ($m/z = 644$ et 646) de l'amiodarone sont notées. Les moyennes sont calculées afin d'estimer l'influence de la matrice, et ceci aux deux longueurs d'onde de travail.

Ces données sont rassemblées dans le tableau XXa. Un deuxième tableau XXb est obtenu à partir du précédent en calculant, pour chaque fragment i , le rapport R_i égal à l'intensité absolue I_i du fragment i divisée par celle du fragment 518 (pic de base en général) I_{518} . Ces tableaux sont présentés page 185.

a- Influence de la matrice à 193 nm

Pour commenter l'effet qu'induit l'utilisation d'une matrice sur la désorption de l'amiodarone, nous nous affranchissons dans un premier temps du paramètre longueur d'onde ; il sera traité dans le paragraphe suivant.

On constate sur le tableau XXa que l'adjonction d'une matrice permet d'augmenter de façon notable la quantité d'ions moléculaires : leurs intensités absolues sont souvent supérieures, exception faite du mélange d'amiodarone, d'acide nicotinique et de nitrocellulose. Dans tous les cas, la matrice n'influe pas sur les proportions relatives du fragment principal $m/z=518$ et du pic quasimoléculaire $m/z=646$.

Concrètement, l'adjonction d'acide nicotinique ne donne pas un pic moléculaire plus intense. La fragmentation de la molécule cible reste très importante, mais les écarts standard sont pratiquement toujours inférieurs.

L'utilisation d'un film de nitrocellulose, avec ou sans acide nicotinique, n'apporte aucune amélioration.

Le mélange d'acide nicotinique et de nitrocellulose est une bonne matrice au sens où la fragmentation est plus faible et le pic moléculaire représente 115% du pic de base $m/z=518$. Les intensités absolues des fragments de hautes masses et de l'ion moléculaire sont toutefois inférieures à celles obtenues pour le produit pur, bien que la reproductibilité soit nettement améliorée. Par exemple, les intensités du pic moléculaire pour l'amiodarone seule et avec la matrice sont respectivement 48 ± 36 et $38 \pm 4,5$.

La présence de la nitrocellulose seule semble être un bon compromis à 193 nm. Le pic moléculaire représente 94% du pic de base ; les intensités absolues sont plus importantes pour les fragments de hautes masses et le pic quasimoléculaire. Les fragments de basses masses sont moins nombreux et la reproductibilité est de 25 à 30%, ce qui est une valeur tout à fait correcte en désorption laser.

b) Influence de la longueur d'onde

Nous avons constaté précédemment que l'utilisation d'une matrice pour désorber et ioniser l'amiodarone modifie les caractéristiques des spectres de masse. L'effet de la longueur d'onde est également notable.

Sur le composé pur, il est déjà possible de noter des différences entre les spectres enregistrés à 193 nm (formation préférentielle de photo-fragments) et à 249 nm (régime plus thermique et réactions en phase gazeuse) au niveau des intensités absolues. La fragmentation est similaire aux deux longueurs d'onde : le fragment $m/z = 518$ reste le pic de base, le pic quasimoléculaire représente 36% à 249 nm et 65 % à 193 nm du pic de base et le fragment $m/z=392,5$ 47% à 249 nm et 56% à 193 nm. On remarque que les écarts standard relatifs sont tout à fait équivalents aux deux longueurs d'onde (75 et 79 %).

De manière générale, l'irradiation laser à 193 nm donne naissance à des ions en quantités plus importantes. L'effet de la longueur d'onde est extrêmement profitable dans le cas des matrices nitrocellulose ou acide nicotinique :

- à **193 nm**, l'intensité du pic quasimoléculaire est multipliée par 3. Les écarts standard sont acceptables et la fragmentation est minime, particulièrement pour la nitrocellulose.
- à **249 nm**, pour ces matrices, il semblerait que les fragments mono et di-déiodés ($m/z = 392$ et 518) soient fortement favorisés dès qu'une matrice est utilisée.

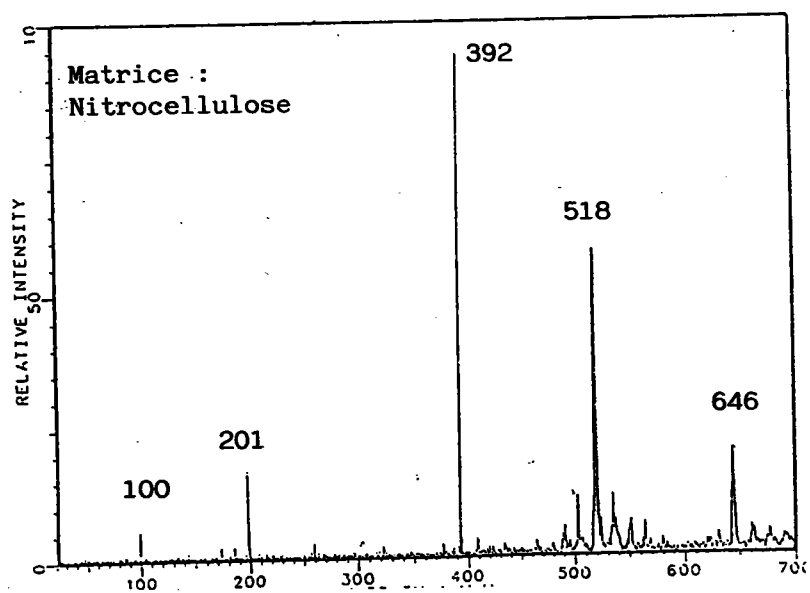
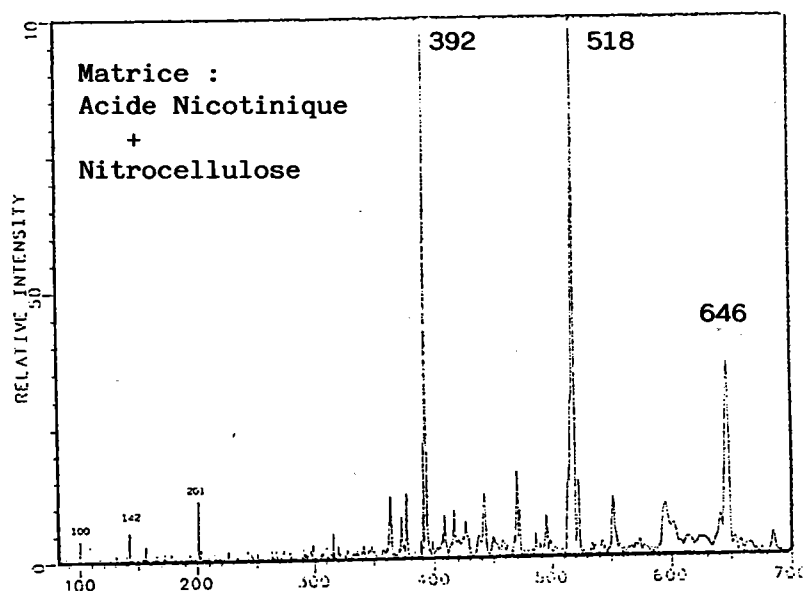
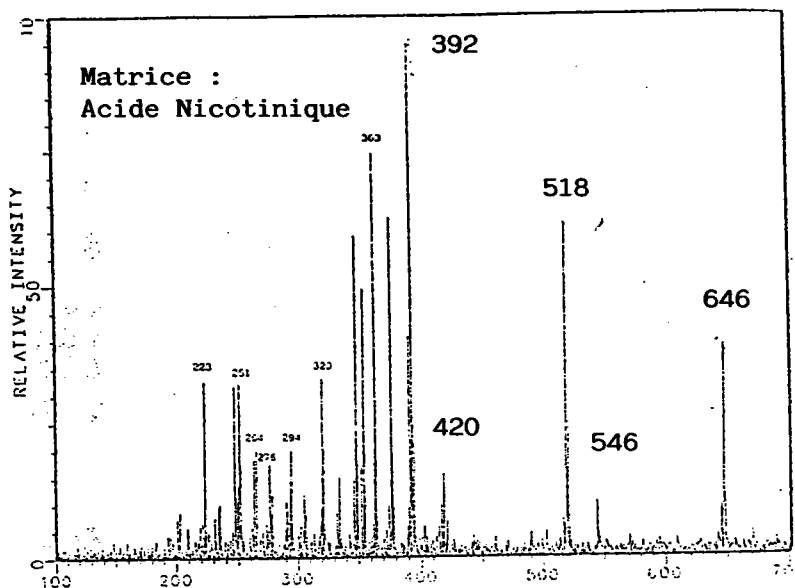
Tableau a

INTENSITES ABSOLUES des fragments et du pic moléculaire								
	249 nm	100	201	203	392	510	644	646
AMIO 10-3M	Intensité Abs.	8,02	9,7	-	14,3	35,9	4,3	11
	écart-type	4,7	4,1	-	10	32,3	8,3	8,7
	variation (%)	59%	42%	-	70%	90%	191%	79%
AMIO 10-3M + NITROCELLULOSE	Intensité Abs.	6,5	16,1	-	9,1	62,1	-	17,5
	écart-type	1,7	6,4	-	41,3	36,8	-	8,7
	variation (%)	26%	40%	-	45%	59%	-	50%
AMIO 10-3M + NICAC	Intensité Abs.	12,5	6,8	-	46,1	30,5	2,6	17,2
	écart-type	17,2	5,6	-	4,4	5,3	2,8	2,1
	variation (%)	138%	83%	-	10%	17%	107%	12%
AMIO 10-3M + NICAC + NITROCELLULOSE	Intensité Abs.	8,4	19,9	12,1	84,4	100	-	46,3
	écart-type	2,8	6,7	10,3	32	42,6	-	17,6
	variation (%)	33%	34%	85%	38%	43%	-	38%
193 nm								
	100	201	203	392	510	644	646	
AMIO 10-3M	Intensité Abs.	12,3	8,2	-	25,4	92	-	48
	écart-type	5,2	4,5	-	11,2	77	-	36
	variation (%)	42%	54%	-	44%	84%	-	75%
AMIO 10-3M + NITROCELLULOSE	Intensité Abs.	6,9	2,7	-	18,6	152	-	143
	écart-type	4,6	2,5	-	9	38,2	-	39
	variation (%)	67%	91%	-	49%	25%	-	28%
AMIO 10-3M + NICAC	Intensité Abs.	35	43	85,6	23,4	67,1	-	132,9
	écart-type	19	9,5	27,8	4,9	17,4	-	25,4
	variation (%)	54%	22%	32%	21%	26%	-	19%
AMIO 10-3M + NICAC + NITROCELLULOSE	Intensité Abs.	7,1	4,6	5	5,7	36,2	-	38
	écart-type	1,7	1,4	1,4	5,9	4,1	-	4,5
	variation (%)	24%	31%	29%	103%	11%	-	12%
AMIO 10-3M + NICAC sur film de NITROCELLULOSE	Intensité Abs.	10,5	16,7	12,9	40,2	106	-	94,1
	écart-type	3	19,5	12,8	24,5	42	-	40
	variation (%)	29%	116%	99%	61%	23%	-	43%

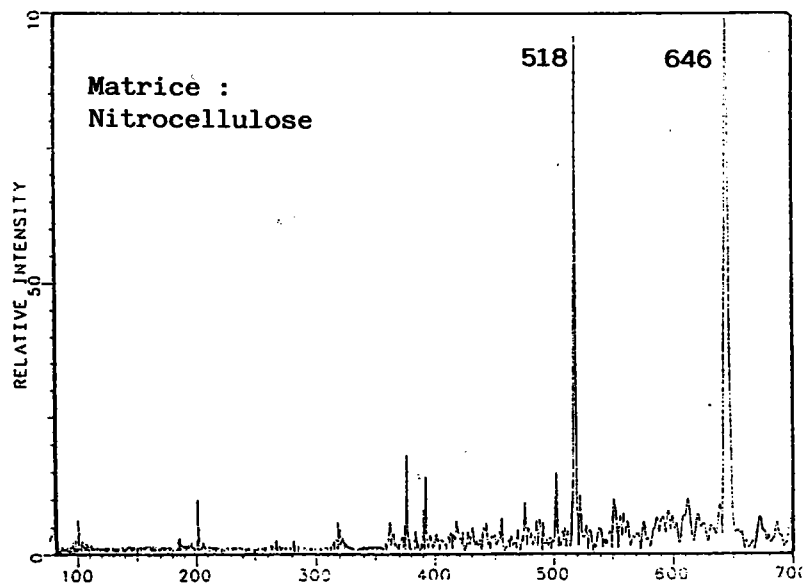
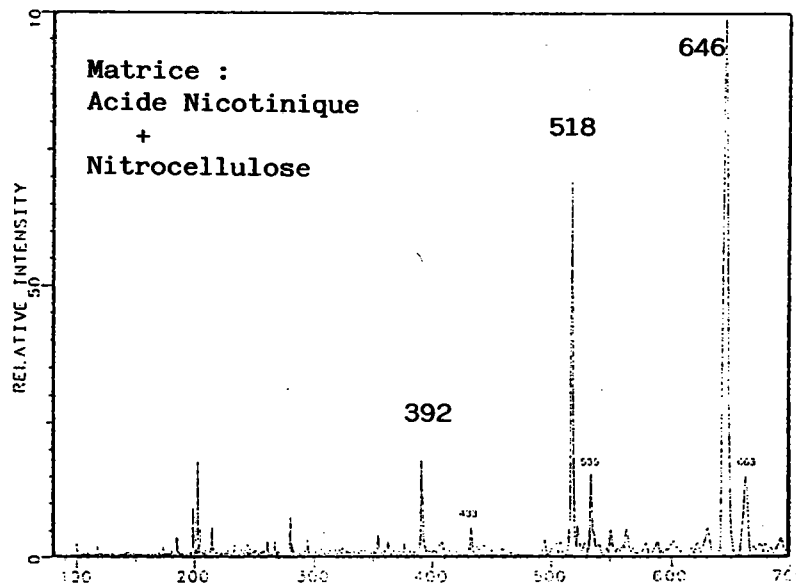
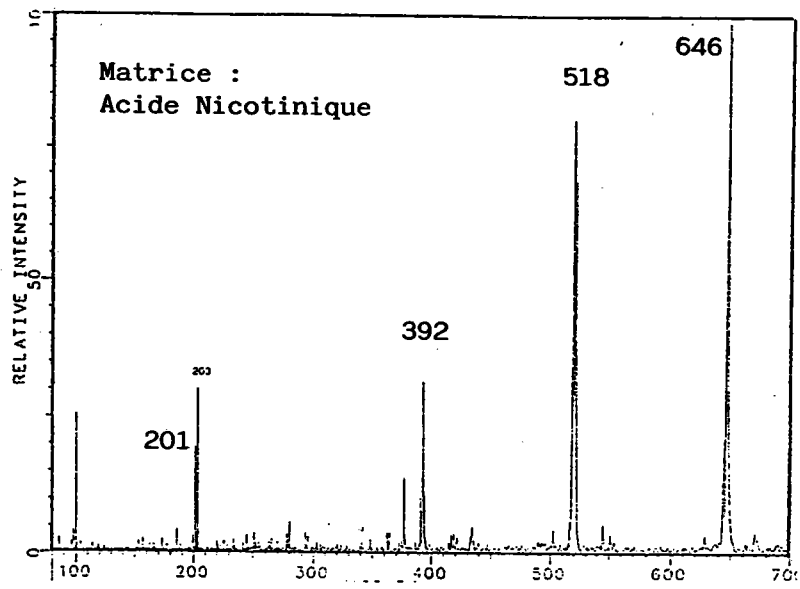
Tableau b

Rapport R = Int. Abs / Int. ABS. pic 510								
	249 nm	100	201	203	392	510	644	646
AMIO 10-3M	Rapport R	0,56	0,52	-	0,47	1	0,09	0,36
	écart-type	0,7	0,39	-	0,17	-	0,15	0,2
	variation (%)	127%	76%	-	35%	-	166%	57%
AMIO 10-3M + NITROCELLULOSE	Rapport R	0,11	0,25	-	1,38	1	-	0,3
	écart-type	0,05	0,12	-	0,41	-	-	0,13
	variation (%)	50%	50%	-	30%	-	-	45%
AMIO 10-3M + NICAC	Rapport R	0,37	0,21	-	1,55	1	-	0,58
	écart-type	0,47	0,18	-	0,37	-	-	0,12
	variation (%)	127%	87%	-	24%	-	-	20%
AMIO 10-3M + NICAC + NITROCELLULOSE	Rapport R	0,09	0,19	0,11	0,87	1	-	0,44
	écart-type	0,04	0,09	0,12	0,21	-	-	0,15
	variation (%)	43%	45%	106%	24%	-	-	34%
193 nm								
	100	201	203	392	510	644	646	
AMIO 10-3M	Rapport R	0,39	0,18	-	0,56	1	-	0,65
	écart-type	0,36	0,15	-	0,43	-	-	0,37
	variation (%)	91%	85%	-	76%	-	-	56%
AMIO 10-3M + NITROCELLULOSE	Rapport R	0,05	0,02	-	0,14	1	-	0,94
	écart-type	0,05	0,025	-	0,08	-	-	0,12
	variation (%)	97%	121%	-	60%	-	-	13%
AMIO 10-3M + NICAC	Rapport R	0,53	0,7	1,42	0,35	1	-	2,01
	écart-type	0,18	0,3	0,73	0,08	-	-	0,18
	variation (%)	33%	43%	52%	22%	-	-	9%
AMIO 10-3M + NICAC + NITROCELLULOSE	Rapport R	0,19	0,1	0,07	0,2	1	-	1,15
	écart-type	0,06	0,06	0,07	0,09	-	-	0,4
	variation (%)	34%	57%	100%	47%	-	-	34%
AMIO 10-3M + NICAC sur film de NITROCELLULOSE	Rapport R	0,06	0,07	0,07	0,24	1	-	0,55
	écart-type	0,02	0,04	0,08	0,11	-	-	0,25
	variation (%)	39%	63%	107%	48%	-	-	47%

Tableau XX a et b : Désorption par FTMS de l'amiodarone en fonction de la longueur d'onde et de la matrice.



Spectres 20 : Spectres FTMS de l'amiodarone à 249 nm



Spectres 21 : Spectres FTMS de l'amidarone à 193 nm

c- Bilan

Nous avons démontré en commentant les résultats de nos différents tests que plusieurs paramètres entrent en jeu pour désorber l'amiodarone et qu'il n'est pas évident de dissocier leurs effets. Toutefois, il est possible, en accordant arbitrairement des priorités aux effets constatés par l'adjonction d'une matrice ou l'utilisation d'une longueur d'onde particulière, de sélectionner une matrice acceptable pour l'amiodarone.

Nos critères de choix sont d'une part un gain en intensité, d'autre part une bonne reproductibilité et enfin une fragmentation minimum de la molécule cible. L'étude approfondie des tableaux XXa et b, ainsi que celle des spectres dont sont issus ces tableaux permet de préconiser l'utilisation de nitrocellulose seule pour désorber l'amiodarone à 193 nm. Le spectre d'absorption UV de la nitrocellulose révèle une unique bande d'absorption à 213 nm (coefficient d'extinction molaire = $860 \text{ L}^{-1} \cdot \text{mol} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 213 nm et 138 à 193 nm). L'amiodarone, quant à elle, possède un coefficient d'extinction molaire nettement supérieur ($16\ 800$ à 193 nm). Compte tenu des proportions dans lesquelles sont mélangées ces deux molécules : une mole d'amiodarone pour 100 unités à un cycle de nitrocellulose, on peut imaginer que la nitrocellulose absorbe tout de même une portion importante de l'énergie photonique et qu'il y a relaxation sous forme d'énergie vibrationnelle au niveau des liaisons hydrogène cible-matrice. Cette énergie est transmise à la molécule cible par toutes les unités polymériques qui l'entourent, lui permettant ainsi de se dégager intacte de sa matrice solide.

6) Conclusions sur les tests de désorption FTMS

Plusieurs paramètres ont été particulièrement remarqués lors des présentes expérimentations comme étant très influents sur les résultats obtenus. Il s'agit :

- du nombre d'impacts laser. On constate quelquefois, bien que ne sachant pas comment l'expliquer, que l'intensité absolue du pic quasimoléculaire de l'amiodarone est supérieure lorsque le nombre d'impacts sur l'échantillon est égal à un.
- du balayage de la surface de l'échantillon pendant la série de tirs laser.
- de la qualité du dépôt. Elle est bien évidemment essentielle pour obtenir des résultats reproductibles et optimums.

Sundqvist (119) a fait part de remarques très similaires, lorsqu'il a publié ses expériences de désorption laser assistée par l'acide nicotinique avec un TOF linéaire, sans qu'il n'apporte d'explication supplémentaire.

Concrètement, les tests de référence effectués sur la microsonde LAMMA 1000 ont pu être reproduits sur la microsonde FTMS. Effectivement, à 249 nm (les phénomènes sont pratiquement les mêmes qu'à 266 nm), l'acide nicotinique permet de mieux désorber l'amiodarone. Les tests sur microsonde LAMMA sont principalement qualitatifs, aussi la comparaison s'arrêtera là. Notre étude a permis de mettre en évidence que la nitrocellulose, composé polymérique proche par sa structure du saccharose, est un composé capable d'améliorer l'ionisation/désorption de l'amiodarone à 193 nm. L'influence de la longueur d'onde est aussi mise en lumière.

E - BILAN DU CHAPITRE III ET PERSPECTIVES

Les expériences de désorption assistée par matrice de l'amiodarone ont été réalisées sur trois microsondes différentes.

Sur microsonde LAMMA 500, nous avons pu mettre en évidence l'amélioration qu'apportent l'acide trichloroacétique et un iodure alcalin lorsqu'ils sont additionnés à la molécule cible. Ils favorisent la formation de l'ion quasimoléculaire $(M+H)^+$ par des réactions dans le plasma après l'irradiation de l'échantillon par le laser. En revanche, la désorption assistée de l'amiodarone par l'acide nicotinique, au sens où l'a définie Hillenkamp, n'est pas réalisable avec la configuration en transmission de cette microsonde.

D'autres expériences ont alors été effectuées sur la microsonde LAMMA 1000 à Münster (RFA). L'amiodarone est effectivement mieux détectée sur cet appareil en présence d'acide nicotinique. D'un point de vue instrumental, l'amélioration est attribuée d'une part à la configuration en réflexion de la microsonde et d'autre part à la post-accélération (20 kV) des ions juste avant la détection, ce qui permet de repousser les limites en masses réelles du spectromètre à temps de vol.

Ces derniers tests sont des tests références et ils ont été reproduit sur la microsonde FTMS, appareil possédant également la configuration préconisée. Les influences de différentes matrices ont pu être montrées ainsi que l'effet de la longueur d'onde. La matrice nitrocellulose a été particulièrement étudiée car sa structure ressemblant à celle du saccharose et sa nature polymérique permettraient d'extrapoler son utilisation aux coupes histologiques.

Effectivement, à 193 nm, cette matrice désorbe l'amiodarone de façon tout à fait satisfaisante en améliorant la formation de l'ion $(M+H)^+$ et en réduisant la fragmentation de la molécule. Cette nouvelle matrice est en effet extrêmement intéressante car, jusqu'à présent, toutes les matrices expérimentées étaient difficilement applicables aux échantillons biologiques. Celle-ci, de par sa nature, ouvre de nouveaux horizons à l'analyse moléculaire des coupes histologiques, à condition bien évidemment qu'une technique de préparation convenable puisse être trouvée, dans laquelle les matériaux classiques d'inclusion seraient remplacés par la matrice performante comme la nitrocellulose.

CONCLUSIONS
GENERALES

Notre travail a consisté à explorer la potentialité de la microsonde LAMMA 500 appliquée à la **localisation in-situ de cibles organiques dans des tissus biologiques** enrobés ou congelés. Ceci grâce à la reconnaissance du pic moléculaire ou de ses fragments caractéristiques.

Le choix de la technique LAMMA s'est justifié par la possibilité d'obtenir une excellente localisation du point d'impact (diamètre = $2\mu\text{m}$ - concrétisé par le point rouge du laser pilote Hélium-Néon, dont le faisceau est colinéaire au laser de puissance). Toutefois, si la microsonde LAMMA 500 a répondu aux exigences techniques, elle n'a pas permis de s'affranchir du problème inhérent à la nature de nos échantillons : le tissu biologique et le polymère d'enrobage induisent inmanquablement des effets de matrice, qui modifient les caractéristiques de désorption laser et d'ionisation du composé ou de l'élément à analyser.

Notre molécule test, l'amiodarone, est un médicament bien connu pour ses propriétés de régulateur cardiaque. Ce composé organique désorbe bien sous l'effet de l'irradiation laser et se fragmente de manière caractéristique.

La fragmentation de l'amiodarone par impact électronique a été étudiée en détail et comparée à celle obtenue dans les conditions de la désorption/ionisation laser. Nous avons pu émettre des hypothèses quant aux voies de fragmentation de l'amiodarone. Notre interprétation de la fragmentation en désorption laser est en accord avec le concept de formation préférentielle des ions à nombre pair d'électrons (EE^+). On constate que les spectres de masse de l'amiodarone en **désorption laser** se caractérisent notamment par deux ions majoritaires de masses $m/z=100$ et 518 . Ceux-ci se forment logiquement à partir de l'espèce protonée $(M+H)^+$ qui apparaît préférentiellement en désorption laser.

L'étape suivante dans notre travail a consisté à rechercher l'amiodarone dans une matrice polymérique. Dispersée dans un polymère époxy, sa détection par microsonde LAMMA en transmission n'a pas été obtenue, quels que soient les paramètres instrumentaux (potentiels, longueurs d'onde, focalisation du laser). Nos résultats expérimentaux sont en accord avec ceux qu'a publié Van Vaeck sur le même appareil : il a montré qu'il existe une épaisseur (5 nm) au delà de laquelle les molécules organiques ne s'ionisent plus.

La désorption de l'amiodarone par analyse directe d'un bloc de polymère a été tentée par FTMS (configuration en réflexion). L'amiodarone n'a jamais été détectée dans un bloc d'épon dopé de 0,4% à beaucoup plus. La même expérience tentée à 193 nm sur un bloc de technovit dopé en amiodarone a permis de sortir le fragment (M-I)⁺ à m/z=518. La limite de détection se situe alors entre 1 et 2 %. Cet effet de la longueur d'onde représente un espoir de détecter l'amiodarone in-situ si celle-ci se fixe dans certaines zones cellulaires avec un taux supérieur à 1%. Nous avons montré qu'au delà d'un certain seuil de concentration (variable selon le polymère d'enrobage), des interactions physico-chimiques sont prépondérantes et empêchent la désorption/ionisation de la molécule cible.

La recherche de l'amiodarone dans les tissus biologiques s'est soldée par un échec. En ions positifs, aucun signal suffisamment intense et significatif existe en hautes masses. En ions négatifs, l'iode est détecté mais la localisation de l'iode ne correspond pas forcément à une localisation exacte de l'amiodarone. Les interactions entre l'amiodarone, le tissu biologique et le polymère d'enrobage sont vraisemblablement responsables de la non localisation de ce composé. L'analyse de cryocoupes

aurait permis de s'affranchir de bon nombre des causes d'interaction avec la molécule cible par suppression du polymère d'inclusion (fort effet de matrice). Mais nous ne pouvons conclure quant à la réussite ou non de ces analyses, puisque le protocole de fixation des phospholipides n'était pas au point.

La difficulté à détecter l'amiodarone en matrice complexe nous a amené à optimiser le signal du pic moléculaire. Les expériences de désorption assistée par matrice de l'amiodarone ont été réalisées sur trois microsondes différentes.

Sur microsonde LAMMA 500 (analyse en transmission : θ angle entre le faisceau laser incident et l'axe d'extraction des ions = 180°), nous avons pu mettre en évidence l'amélioration qu'apportent l'acide trichloroacétique et un iodure alcalin lorsqu'ils sont additionnés à la molécule cible. Les résultats sont fort encourageants, mais difficilement applicables aux tissus biologiques.

Sur la microsonde LAMMA 1000 (analyse en réflexion : $\theta = 30^\circ$), l'amiodarone est effectivement bien détectée en présence d'acide nicotinique. D'un point de vue instrumental, l'amélioration est attribuée d'une part à la *configuration en réflexion* de la microsonde et d'autre part à la post accélération (20 kV) des ions juste avant la détection. D'un point de vue conceptuel, l'acide nicotinique favorise la désorption de l'amiodarone comme celle des protéines bien que l'amiodarone ne possède qu'une fonction amine. L'acide nicotinique isole les molécules cibles les unes des autres et les aide à désorber.

Sur la microsonde FTMS (analyse en réflexion : $\theta = 0^\circ$), les influences de différentes matrices ont pu être testées ainsi que l'effet de longueur d'onde. A 193 nm, l'acide nicotinique, le mélange acide nicotinique et la

nitrocellulose désorbent l'amiodarone de façon tout à fait satisfaisante en améliorant la formation de l'ion $(M+H)^+$ et en réduisant la fragmentation de la molécule. A cette longueur d'onde, la nitrocellulose semble être la meilleure matrice pour mettre en évidence $(M+H)^+$. Cette matrice est en effet extrêmement intéressante car, jusqu'à présent, toutes les autres, qui ont été expérimentées, étaient difficilement applicables aux échantillons biologiques. Celle-ci, de par sa structure (analogie avec le saccharose), ouvre de nouveaux horizons à l'analyse moléculaire des coupes histologiques, à condition bien évidemment qu'une technique de préparation convenable puisse être trouvée, dans laquelle les matériaux classiques d'inclusion seront remplacés par cette matrice performante.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- VIC, P., GOUY, D., LACHERETZ, F., VERSCHUERE, B., CROS, M., REMANDET, B., BERTHE, J. et MAZUE, G.
Intestinal Pathology in the Dog Induced by Sublethal Doses of Amiodarone. Receptors and Other Targets for Toxic Substances - Arch. Toxicol., Suppl. 8, (1985), 104 by Springer-Verlag.
- 2- MAZUE, G., VIC, P., GOUY, D., REMANDET, B., LACHERETZ, F., BERTHE, J., BARCHEWITZ, G. et GAGNOL, J.P.
Recovery from Amiodarone-Induced Lipidosis in Laboratory Animals : A Toxicological Study.
Fundamental and Applied Toxicology, 4, (1984), 992
- 3- REASOR, M.J.
Drug-Induced Lipidosis and the Alveolar Macrophage.
Toxicology, 20, (1981), 1-33
- 4- LULLMANN, H., LULLMANN-RAUCH R. et WASSERMANN, O.
Lipidosis Induced by Amphiphilic Cationic Drugs.
Biochemical Pharmacology, 27, (1978), 1103
- 5- KIRK, R.G., REASOR, M.J. et LEE, P.
Iodine in Rat Alveolar Macrophages following Amiodarone Treatment. Quantitative X-Ray Microanalysis
Experimental and Molecular Pathology, 42, (1988), 339
- 6- DE NOLLIN, S., JACOB, W., VAN VAECK, L., BERGER, Y., CAUTREELS, W., REMANDET, B. et VIC, P.
Subcellular Localisation of a Drug by two Independent Methods : Laser Microprobe Mass Analysis and Autoradiography.
Proceeding of the third Intern. Laser Microprobe Mass Spectrom., (1986), Anvers - Belgique.
- 7- LEHMANN, R., SLUKA, H. et SCHMIDT, P.F.
Unerwartete intrazelluläre Ablagerung von TiO₂ im Pulpagewebe.
Wissenschaft und Forschung, VIII, Heft 3, (1982), Referat n°6340
- 8 - SCHMIDT, P.F. et ILSEMANN, K.
Quantitation of laser-microprobe-mass-analysis results by the use of organic mass peaks for internal standards.
Scanning Electron Microscopy, 1, (1984), 77
- 9 - VERBUEKEN, A.H., PAULUS, G.J., VAN de VYVER, F.L., VERPOOTEN, G.A., VISSER, W.J., DE BROE, M.E. et VAN GRIEKEN R.E.
Lamma In Nephrotoxicity Studies.
Proceeding of the 2nd Lamma-Symposium, Borstel, (1983), 129
- 10- KAUFMANN, R., HILLENKAMP, F., WECHSUNG, R., HEINEN, H.J. et SCHURMANN, M.
Laser Microprobe Mass Analysis : Achievements and Aspects.
Scanning Electron Microscopy, 11, (1979), 279
- 11- MOENKE-BLANKENBURG, L.
Laser Microanalysis
Ed. John Wiley - Series in Chemical Analysis, 105, (1989), 219

- 12- SEYDEL, U. et LINDNER B.
Mass Spectrometry of Organic Compounds (< 2000 amu) and Tracing of Organic Molecules in Plant Tissue with Lamma.
in Ion Formation from Organic Solids, (1982), 240-244
Ed : A. Benninghoven, Heidelberg, Springer Series in Chemical Physics
- 13- MATHEY, A., GATZMANN, J. et MULLER, J.F.
TEM- und Lamma-Untersuchung von Kryoschnitten der Mikroflechte Phaeographina chryosocarpa (Raddi) Redinger.
Beitr. Elektronenmikroskop. Direktabb. Oberfl. 14, (1981), 631
- 14- KAUFMANN, R.L., HEINEN, H.J., SCHURMANN M.W. et WECHSUNG R.M.
Recent Advances of Laser Microprobe Mass Analysis (LAMMA) as applied to biological and engineering Specimens.
Microbeam Analysis, Ed. : D.E. Newbury, San Fransisco, (1979), 63
- 15- WINK, M., HEINEN, H.J., VOGT, H. et SCHIEBEL, H.M.
Cellular localization of quinolizidine alkaloids by laser desorption mass spectrometry (LAMMA 1000)
Plant Cell Rep., 3, (1984), 230
- 16- BERGER, Y.
Etude Physico-Chimique de l'Amiodarone.HCl.
Rapport Scientifique L3428 SANOFI Recherches
- 17- VAN SCHEPDAEL, J., KESENNE, B.
Etude clinique des effets anti-arthmiques de l'Amiodarone injectable.
Ars Medici, 34, (1979), 20
- 18- FARMAKIS, M., LITOS, G., MELISSINOS, Ch. et VIC, P.
Diffuse Interstitial Pulmonary Disease during Amiodarone Treatment.
Arzneim.-Forsch. / Drug Res. 34(1), N°2, (1984)
- 19- MICHEL, F.B., GODARD, P., AUBAS, P. et VIC, P.
Poumon, miroir des maladies iatrogènes. L'exemple de l'amiodarone.
Bull. Acad. Natle Méd., 170(1), (1986), 157-163
- 20- HARRIS, L. et RONCUCCI, R.
Amiodarone.
Ed:Medsi Paris (1986)
- 21- ANDREASEN, F. et coll.,
Eur. J. Clin. Pharmac., 19, (1981), 293P
- 22- STOREY, G.C.A., HOLT, D.W., HOLT, P. et CURRY, P.V.L.
High-Performance Liquid Chromatographic Measurement of Amiodarone and its Desethyl Metabolite : Methodology and Preliminary Observations.
Therapeutic Drug Monitoring, 4,(1982), 385-388
- 23- STOREY, G.C.A., ADAMS, P.C., CAMPBELL, R.W.F. et HOLT, D.W.
High-Performance Liquid Chromatographic Measurement of Amiodarone and Desethylamiodarone in small tissue samples after enzymatic digestion.
J. Clin. Pathol., 36, (1983), 785-9
- 24- PLOMP, T.A., VAN ROSSUM, J.M., ROBLES DE MEDINA, E.O., VAN LIER, T. et MAES, R.A.A.
Pharmacokinetics and Body Distribution of Amiodarone in Man
Arzmeim.-Forsch./ Drug Res. 34(1), N°4, (1984), 513-520

- 25- ESTRADA, A., FESTGE, C., SHENASA, M., DENKER, S. et AKHTAR, M.
Morbidity and Mortality in Patients treated with Amiodarone.
Clinical Research, 31(2), (1983), 181A
- 26- HEGER, J.J., PRYSTOWSKY, E.N. et ZIPES, D.P.
Relationships between Amiodarone dosage, drug concentrations, and adverse side effects.
American Heart J., 106, N°4, Part2, (1983), 931-5
- 27- SHEPERD, N.A., DAWSON, A.M., CROCKER, P.R. et LEVISON, D.A.
Granular cells as marker of early Amiodarone hepatotoxicity : a pathological and analytical study
J. Clin. Pathol., 40, (1987), 418-23
- 28- BJERREGAARD, P., EGE NIELSEN, C., ANDREASEN, F. et GOTZSCHE, H.
Dose, concentrations and effects of Amiodarone.
Proceedings of the S.P.S. and the B.P.S., (1982), 577P
- 29- KAUFMANN, R., HILLENKAMP, F. et WECHSUNG, R.
Laser Microprobe Mass Analysis.
European Spectroscopy News, 20, (1978), 41
- 30- KAUFMANN, R., HILLENKAMP, F., NITSCHKE, R., SCHURMANN M. et WECHSUNG, R.
The LASER Microprobe Mass Analyser (LAMMA) : Biomedical Applications.
Microscopica Acta, Suppl. 2, (1978), 297
- 31- FEIGL, P., SCHUELER, B. et HILLENKAMP, F.
Lamma 1000, a new instrument for bulk microprobe mass analysis by pulsed laser irradiation.
Intern. J. of Mass Spectrom. and Ion Physics, 47, (1983), 15
- 32- SINGH, S.
Laser Microprobe Mass Spectrometry.
Nature, 329, (1987), 183
- 33- VERBUEKEN, A.H., BRUYNSEELS, F.J. et VAN GRIEKEN, R.E.
Laser Microprobe Mass Analysis : a review of Applications in the life Sciences.
Biomedical Mass Spectrometry, 12(9), (1985), 438
- 34- KRIER, G. et MULLER, J.F.
La technique Lamma.
Mémoires et Etudes Scientifiques Revue Métallurgie, (1987), 275
- 35- SPURNY, K.R.
Natural Fibrous Zeolites and their carcinogenicity - a review.
The Science of the Total Environment, 30, (1983), 147-166
- 36- WECHSUNG, R., HEINEN, H.J. et VOGT, H.
Laser Microprobe Mass Analysis Lamma, applied to detect surface contaminants.
Proceeding of the Pittsburg Conference, (1984), rep.800
- 37- SIMONS, D.S., LINDNER, M. et LEICH, D.
Determination of the half-life of ¹⁸⁷Re by laser microprobe mass spectrometry.
Proceeding of the 3th Intern. Laser Microprobe Conference, (1986), Anvers-Belgique.

- 38- KRIER, G. et MULLER, J.F.
Study of some localized Corrosion Phenomena and metallic Surface Defects by Lamma.
Proceeding of the 3th Intern. Laser Microprobe Conference, (1986),
Anvers-Belgique.
- 39- VAN CRAEN, M.J., DENOYER, E.A., NATUSCH, D.F.S. et ADAMS, F.
Surface Enrichment of trace Elements in electric Steel Furnace Dust.
Environ. Sci. Technol., 17(7), (1983), 435
- 40- KAUFMANN, R., WIESER, P. et WURSTER, R.
Application of the laser microprobe mass analyser LAMMA in aerosol
Research.
Scanning Electron Microscopy, II, (1980) - SEM Inc., AMF O'Hare Chicago,
607-622
- 41- KRIER, G., VERDUN, F. et MULLER, J.F.
Coupling a Tunable Dye Laser to a Lamma 500 Microprobe.
Fresenius Z. Anal. Chem., 322, (1985), 379-82
- 42- O'SHEA, D.C., CALLEN, W.R. et RHODES, W.T.
Introduction aux lasers et à leurs applications
Ed. Eyrolles Paris (1977)
- 43- KARAS, M. et HILLENKAMP, F.
Prospects for laser Molecular Microprobing
Microbeam Analysis (1989) Ed. Ph Russell San Francisco
- 44- GROTEMEYER, J., BOESL, U., WALTER, K. et SCHLAG, E.W.
Biomolecules in the Gas Phase. 1. Multiphoton-ionization Mass Spectrometry of
Native Chlorophylls.
J. A.C.S., 108, (1986), 4233
- 45- GROTEMEYER, J., BOESL, U., WALTER, K. et SCHLAG, E.W.
Biomolecules in the Gas Phase. 2. Multiphoton Ionization Mass Spectrometry of
Angiotensin.
Org. Mass Spectrom., 21, (1986), 595
- 46- BERTHELOT, M. et GAL, J.F.
La résonance cyclotronique des ions et son application à l'étude des transferts de
protons en phase gazeuse
Chem. Phys. Letters, 25, (1974), 282
- 47- LAUDE, D.A., BROWN, R.S., JOHLMAN, C.L., WEIL, D.A. et WILKINS, C.L.
Fourier Transform Mass Spectrometry : Recent Instrumental Developments and
Applications
Mass Spectrometry Reviews, 5, (1986), 107
- 48- MULLER, J.F., TOLITTE, F., KRIER, G. et PELLETIER, M.
Brevet français n° 88 09438
- 49- PELLETIER, M., KRIER, G., MULLER, J.F., WEIL, D. et JOHNSTON, M.
Laser Microprobe Fourier Transform Mass Spectrometry
Rapid Comm. in Mass Spectrom., 2, (1988), 146
- 50- BECKEY, H.D.
Field Ionisation Mass Spectrometry
Int. J. of Mass Spectrom. Ion Physics, 2, (1969), 500-3

- 51- BECKEY, H.D.
Determination of the structures of Organic Molecules and Quantitative Analyses with the Field Ionization Mass Spectrometer.
In Biomedical Applications of Mass Spectrometry. Ed: G. R. Waller / Wiley Interscience - Tome 4 - 796
- 52- SCHULTEN H.R.
Analytical Application of Field Desorption Mass Spectrometry (Review).
In Ion Formation from Organic Solids. (1982), 14
Ed: A. Benninghoven / Springer-Verlag
- 53- BENNINGHOVEN A.
Secondary Ion Mass Spectrometry of Organic Compounds (Review).
In Ion Formation from Organic Solids. (1982), 64
Ed: A. Benninghoven / Springer-Verlag
- 54- OECHSNER, H. et GERHARD, W.
Mass Spectr. of Sputtere of Neutrals and its Applications for Surface Analysis.
Surf. Sciences, 44, (1974), 480
- 55- DE PAUW, E.
Liquid Matrices for Secondary Ion Mass Spectrometry.
Mass Spectrometry Reviews, 5, (1986), 191-212
- 56- BORMAN, S.
Progress in Molecular SIMS
Anal. Chem., 59, (1987), 588A
- 57- MALORNI, A., MARINO, G. et MILONE, A.
Effect of Matrix Modification by Strong Mineral Acids on the Positive Fast Bombard mass Spectra of Peptides.
Biomedical Environn. Mass Spectrometry, 13(9), (1986), 477
- 58- FENSELAU, C.
Anal. Chem., 54, (1982), 104A
- 59- DE PAUW, E., PELZER, G., DAO VIET, D. et MARIEN, J.
On the Influence of Hydrophobicity in the SIMS Spectra of AminoAcids in Glycérol Matrix.
Biochemical and Biophysical Research Commun., 123(1), (1984), 27
- 60- LARSEN, C., ANTHONI, U., NIELSEN, P.H. et CHRISTOPHERSEN, C.
FAB Mass Spectrometry with or without a Matrix.
Organic Mass Spectrometry, 22, (1987), 117
- 61- TORGERSON, D.F., SKOWRONSKI, R.P. et MAC FARLANE R.C.
New Approach to the Mass Spectroscopy of non volatile Compounds.
Biochemical and Biophysical Research Commun., 60, (1974), 616
- 62- GROTEMEYER, J., BEAVIS, R.C., LINDNER, J., KOSTER, C. et SCHLAG, E.W.
Multiphoton Ionization - a general Ionization method for Mass Spectrometry
Proceeding of the 11th Intern. Mass Spectrometry conf., Bordeaux/France, (1987)
- 63- DELLA NEGRA, S., DEPAUW, J., JORET, H. et LE BEYEC, Y.
SUPERDEPIL : un spectromètre modulaire par temps de vol à haute résolution
7ème Congrès National de Spectrométrie de Masse, (1989), Rennes

- 64 - LOO, J.A., WILLIAMS, E.R., AMSTER, I.J., FURLONG, J.J.P., WANG, B.H., MAC LAFFERTY, F.W., CHAIT, B.J. et FIELD, F.H.
Californium-252 Plasma Desorption with Fourier Transform Mass Spectrometry.
Anal. Chem., 59(14), (1987), 1880-2
- 65- VAN DORSSELAER, A.
Toujours plus : Besoins en résolution et en précision de mesure de masse pour la gamme 1 à 30 kDa.
7ème Congrès National de Spectrométrie de Masse, (1989), Rennes
- 66- BLAKLEY, C.R., CARMODY, J.J. et VESTAL, M.L.
Anal. Chem., 52, (1980), 1636
- 67 - VASTOLA, F.J. et PIRONE, A.J.
Ionization of Organic Solids by Laser Irradiation.
In *Advances in Mass Spectrometry*, 4, (1968), 107
- 68 - CONZENIUS, R.J. et CAPELLEN, J.M.
A Review of the Applications to Solids of the Laser Ion Source in Mass Spectrometry.
Intern. J. of Mass Spectrom. and Ion Physics, 34, (1980), 197
- 69- COTTER, R.J.
Laser Mass Spectrometry : An Overview of Techniques, Instruments and Applications.
Analytica Chimica Acta, 195, (1987), 45-59
- 70- MULLER, J.F.
Ionisation laser ponctuelle des solides et spectromètres de masse.
Spectra 2000, 15(120), (1987), 23
- 71 - HILLENKAMP, F.
Laser Induced Ion Formation from Organic Solids
Springer Series in Chem. Phys. 25, (1983), 190-205
- 72- ANTONOV, V.S., LETOKHOV, V.S. et SHIBANOV, A.N.
Non Thermal Desorption of Molecular Ions of Polyatomic Molecules Induced by UV Laser Radiation.
Applied Phys., 25, (1981), 71
- 73- VERDUN, F., MULLER, J.F. et KRIER, G.
Study of Photoionisation of Solids - Resonance Ionization.
Laser Chem., 5, (1985), 297
- 74- MULLER, J.F., KRIER, G., VERDUN, F., LAMBOULE, M. et MULLER, D.
Ionization of organic crystals with tunable dye laser connected with a LAMMA instrument
Int. J. of Mass Spectrom. Ion Processes, 64, (1985), 127
- 75- HERCULES, D.M.,
Laser Microprobe Mass Spectrometry : The Past, Present and Future.
Microchemical J., 38, (1988), 3-23
- 76- VAN DER PEYL, G.J.Q., HAVERKAMP, J. et KISTEMAKER, P.G.
Thermal Aspects of Laser Desorption Mass Spectrometry.
Intern. J. of Mass Spectrometry and Ion Physics, 42, (1982), 125

- 77 - HILLENKAMP, F.
Laser Induced Ion Formation from Organic Solids (Review).
in Ion Formation from Organic Solids. (1982), 190
Ed: A. Benninghoven / Springer-Verlag
- 78 - EGOROV, S.E., LETOKHOV, V.S. et SHIBANOV, A.N.
Molecular Photoion Production Processes Induced by Surface Laser Radiation.
Sov. Techn. Phys. Lett., 9(6), (1983), 303
- 79 - MATHEY, A., GATZMANN, J. et MULLER, J.F.
TEM und LAMMA Untersuchung von Kryoschnitten der Mikroflechte
Phaeographina Chrysocarpa (Raddi) Redinger.
Beitr. elektronenmikroskop. Direktabb Oberfl., 14, (1981), 631
- 80 - WILK, Z.A., VISWANADHAM, S.K., SHARKEY, A.G. et HERCULES, D.M.
Factors Affecting the Quantitation of Organic Compounds in Laser Mass
Spectrometry
Anal. Chem, 60, (1988), 2338
- 81 - BAHR, U., KARAS, M. et HILLENKAMP, F.
Influence of Laser Spot Size and Wavelength on UV-Laser Desorption Mass
Spectrometry of Organic Molecules
Third International Laser Microprobe Mass Spectrometry, Anvers (Belgique),
(1986), 17
- 82 - KARAS, M., BACHMANN, D. et HILLENKAMP, F.
Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption
Mass Spectrometry of Organic Molecules
Anal. Chem, 57, (1985), 2935
- 83 - VAN VAECK, L., CLAEREBOUDT, J., DE WAELE, J., ESMANS, E. et GIJBELS, R.
Approach for Structural Interpretation of Laser Microprobe Mass Spectra of
Organic Compounds
Anal. Chem, 57, (1985), 2944
- 84 - VAN VAECK, L., CLAEREBOUDT, J., VELDEMAN, E., VERMEULEN, M. et GIJBELS, R.
Structural Analysis of Organic Compounds by Laser Microprobe Mass
Spectrometry (LAMMA)
Bull. Soc. Chim. Belg., 95, N° 5-6, (1986), 351
- 85 - VAN VAECK, L., VAN ESPEN, P., GIJBELS, R. et LAUWERS, W.
Structural Characterisation of Drugs and Oxygenated Metabolites by Laser
Microprobe Mass Spectrometry (LAMMA)
Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, 16, (1988), 121
- 86 - HILLENKAMP, F.
Ion Formation by Desorption for Laser-Micro-Mass-Spectrometry
Proceeding of the 24th annual Conf. of the Microbeam Analysis - Asheville
(USA) / Ed. in Microbeam Analysis - P.E. Russel - San Francisco (1989), 277
- 87 - CLAEYS, N. et SION, R.
Rapport scientifique et technique - Code produit L 3428
Document non publié SANOFI-Recherche
- 88 - PORTER, Q.N.
Mass Spectrometry of Heterocyclic Compounds
Ed John Wiley, (1985), 146

- 88 - GOWER, J.L.
Matrix Compounds for Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry
Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, 12, n°5, (1985), 191
- 89 - TAKAYAMA, M., FUKAI, T., NOMURA, T. et NOJIMA, K.
Further Study of the Matrix Effect on the Extent of Fragmentation in Molecular Ions M^+ produced under Fast Atom Bombardment (FAB) Conditions
Int. J. of Mass Spectrometry and Ion Processes, 96, (1990), 169
- 90 - ROESPSTORFF, P., NIELSEN, P.F., SUNDQVIST, B.U.R., HAKANSSON, P. et JONSSON, G.
The Influence of Sample Preparation on Molecular Ion Formation in Plasma Desorption Mass Spectrometry of Peptides and Proteins
Int. J. of Mass Spectrometry and Ion Processes, 78, (1987), 229
- 91 - VAN VAECK, L., CLAEREBOUDT, J., DE NOLLIN, S., JACOB, W., GIJBELS, R. et CAUTREELS, W.
On the Use of LAMMA for Microprobing of Organic Compounds in Biological Samples
10th Int. Mass Spectrom. Conf., Swansea (U.K.) - 1985
Edit. in Advances in Mass Spectrometry by JF Todd (1986) - John Wiley & Sons
- 92 - VAN VAECK, L., VAN ESPEN, P., JACOB, W., GIJBELS, R. et CAUTREELS, W.
In-Depth Limitation of the LAMMA 500 for the in situ Localization of Organic Compounds in Biological Embedded Tissue Samples
Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, 16, (1988), 113
- 93 - VAN VAECK, L., CLAEREBOUDT, J., VAN ESPEN, P., ADAMS, F., GIJBELS, R. et CAUTREELS, W.
Optimisation of the LAMMA Instrumentation for the Analysis of Organic Compounds
10th Int. Mass Spectrom. Conf., Swansea (U.K.) - 1985
Edit. in Advances in Mass Spectrometry by JF Todd (1986) - John Wiley & Sons
- 94 - ADAMS, F. et MAUNEY, F.
Laser Microprobe Mass Analysis for Microscopic Characterization
10th Int. Mass Spectrom. Conf., Swansea (U.K.) - 1985
Edit. in Advances in Mass Spectrometry by JF Todd (1986) - John Wiley & Sons
- 96 - BONATI, M., GASPARI, R., D'ARANNO, V., BENFENATI, E., NEYROZ, P., GALLETI, F. et TOGNONI, G.
Physicochemical and Analytical Characteristics of Amiodarone.
J. of Pharmaceutical Sciences, 73(6), (1984), 829-31
- 97 - ECHLIN, P., SAUBERMANN, A., FRANKS, F. et LE B.SKAER, H.
The Use of Polymeric Cryoprotectants in the Preparation of Biological Material for X-Ray MicroAnalysis.
Microscopica Acta, J. of Microscopic Equipment, Methods and Applications, Suppl.2 : Microprobe Analysis in Biology and Medicine.
Ed.: P. Echlin, (1978), S. Hirzel Verlag Stuttgart
- 98 - DE NOLLIN, S., JACOB, W., VAN VAECK, L., BERGER, Y., CAUTREELS, W., REMANDET, B. et VIC, P.
Subcellular Localisation of a Drug by two Independent Methods : Laser Microprobe Mass Analysis and Autoradiography
Third International Laser Microprobe Mass Spectrometry, Anvers (Belgique), (1986), 53

- 99 - VAN DER PEYL, G.J.Q., ISA, K., HAVERKAMP, J. et KISTEMAKER, P.G.
Gas Phase Ion Molecule Reactions in Laser Desorption Mass Spectrometry.
Organic Mass Spectrometry, 16 (9), (1981), 416-420
- 100 - HEINEN H.J.
On Ion Formation in Laser Desorption Mass Spectrometry with Lamma.
Intern. J. of Mass Spectrom. and Ion Physics, 38, (1981), 309
- 101 - SEYDEL U., LUTHJE H., WOLLENWEBER H. et LINDNER B
Cation Specific Fragmentation of Organic Compounds in Lamma.
Proceeding of the Third Intern. Laser Microprobe Mass Spectrometry,
(1986), Anvers-Belgique, 175
- 102 - VAN DER PEYL, G.J.Q., ISA, K., HAVERKAMP, J. et KISTEMAKER, P.G.
Cationization in Laser Desorption Mass Spectrometry.
Nuclear Instruments and Methods, 198, (1982), 125-130
- 103 - STOLL, R. et ROLLGEN, F.W.
Cationization by Alkali Ion Attachment in Laser Desorption Mass Spectrometry
Z. Naturforschung, 37a, (1982), 9-14
- 104 - HILLENKAMP F.
Intern. J. of Mass Spectrom. and Ion Physics, 45, (1982), 305
- 105 - BALASANMUGAN, K., DANG, T.A., DAY, R.J. et HERCULES, D.M.
Some Cation and Anion Attachment Reactions in Laser Desorption Mass
Spectrometry.
Anal. Chem., 55, (1983), 2424
- 106 - VAN DER PEYL, G.J.Q., HAVERKAMP, J. et KISTEMAKER, P.G.
Thermal Aspects of Laser Desorption Mass Spectrometry
Intern. J. of Mass Spectrom. and Ion Physics, 42, (1982), 125-41
- 107 - LINDNER, B., HELANDER, I. et SEYDEL, U.
On the Influence of Alkali Admixture on the Spectral Features in LDMS :
Application to the Structural Elucidation of Lipopolysaccharides.
Proceeding of the 11th Intern. Mass Spectrometry Conf. Bordeaux.
Ed. in *Advances in Mass Spectrometry*, (1988) by P. Longevialle, Heyden & Sons,
1484
- 108 - WRIGHT, L.G., COOKS, R.G. et WOOD, K.V.
Matrix Enhanced Laser Desorption in Mass Spectrometry and Tandem Mass
Spectrometry
Biomedical Mass Spectrometry, 12, n°4, (1985), 159
- 109 - ROCZKO, A.W., NISWANADHAM, S.K., SHARKEY, A.G. et HERCULES, D.M.
Study of Cationization of Saccharides by Laser Mass Spectrometry
Fresenius Z. Anal. Chem., 334, (1989), 521
- 110 - BEAVIS, LINDNER, GROTEMEYER et SCHLAG
Matrix Effects in Infrared Desorption of Neutral Molecules
Proceeding of the 11th Intern. Mass Spectrometry Conf. Bordeaux.
Ed. in *Advances in Mass Spectrometry*, (1988) by P. Longevialle, Heyden & Sons
- 111 - CHIARELLI, M.P. et GROSS, M.L.
Amino Acid and Tripeptide Mixture Analysis by Laser Desorption Fourier
Transform Mass Spectrometry
Anal. Chem., 61, (1989), 1895

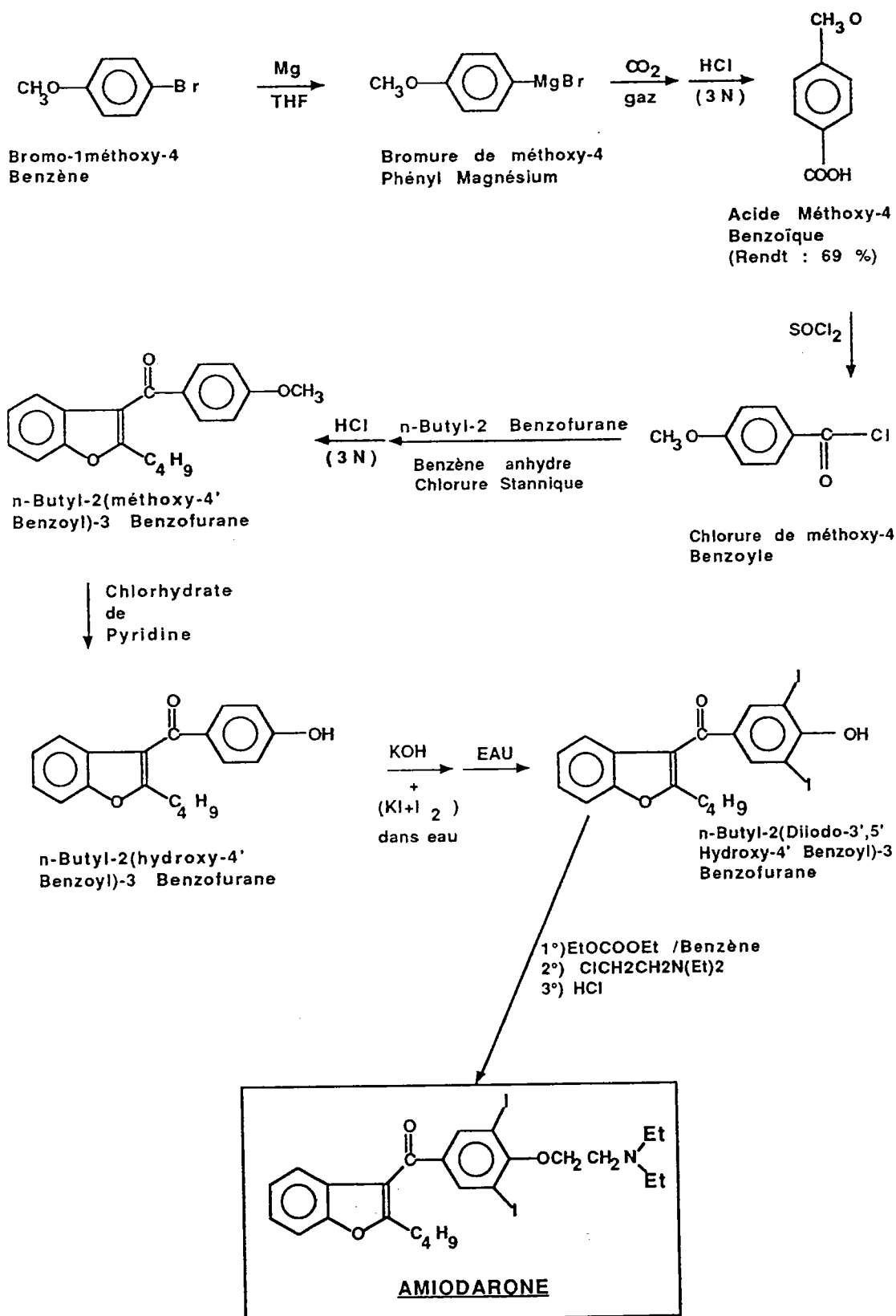
- 112- LINDNER B. et SEYDEL, U.
Laser Desorption Mass Spectrometry of Nonvolatiles under Shock Wave
Conditions
Anal. Chem., 57, (1985), 895
- 113- TODD, P.J., LEIBMAN, C.P. et MAMANTOV, G.
Lewis Acid Enhanced Emission of Secondary Molecular Ions
10th Int. Mass Spectrom. Conf., Swansea (U.K.) - 1985, p 1561
Edit. in Advances in Mass Spectrometry by JF Todd (1986) - John Wiley & Sons
- 114- SCHULTEN, H.R. et BECKEY, H.D.
Org. Mass Spectrometry, 6, (1972), 885
- 115- KEOUGH, T., DE STEPHANO, A.J.
Anal. Chem., 53, (1981), 25
- 116- KARAS, M., BACHMANN, D., BAHR, U. et HILLENKAMP, F.
Matrix-Assisted Ultraviolet Laser Desorption of Non-Volatile Compounds
Int. J. of Mass Spectrometry and Ion Processes, 78, (1987), 53
- 117- KARAS, M. et HILLENKAMP, F.
UV-L Matrix Désorption Mass Spectrometry of Proteins in the 100.000 Daltons
Range
Int. J. of Mass Spectrometry Ion Process, 92, (1989), 231
- 118- TANAKA, K., WAKI, H., IDO, Y., AKITA, S., YOSHIDA, Y. et YOSHIDA, T.
Protein and Polymer Analyses up to $m/z=100\ 000$ by Laser Ionization
Time-of-flight Mass Spectrometry
Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2, n°8, (1988), 151
- 119- SALEHPOUR, M., PERERA, I., KJELLBERG, J., HEDIN, A., ISLAMIAN, M.A.,
HAKANSSON, P. et SUNDQVIST, B.U.R.
Laser-Induced Desorption of Proteins
Rapid Communications in Mass Spectrometry, 3, n°8, (1989), 259
- 120- BEAVIS, R.C. et CHAIT, B.T.
Factors Affecting the Ultraviolet Laser Desorption of Proteins
Rapid Communications in Mass Spectrometry, 3, n°7, (1988), 233
- 121- BEAVIS, R.C. et CHAIT, B.T.
Cinnamic Acid Derivatives as Matrices for Ultraviolet Laser Desorption Mass
Spectrometry of Proteins
Rapid Communications in Mass Spectrometry, 3, n°12, (1988), 432
- 122- BEAVIS, R.C. et CHAIT, B.T.
Matrix-assisted Laser -desorption Mass Spectrometry Using 355 nm Radiation
Rapid Communications in Mass Spectrometry, 3, n°12, (1989), 436
- 123- NELSON, R.W., RAINBOW, M.J., LOHR, D.E. et WILLIAMS, P.
Volatilization of High Molecular Weight DNA by Pulsed Laser Ablation of Frozen
Aqueous Solutions
Science, 246, (1989), 1585
- 124- HERCULES, D.M., NOVAK, F.P. et WILK, Z.A.
Applications of LAMMA-1000 to Organic Analysis
Proceeding of the Third Intern. Laser Microprobe Mass Spectrometry,
(1986), Anvers (Belgique), 101

- 125- VERRIER, M.
Contribution à l'étude in vitro de la photosensibilisation médicamenteuse.
Réactivité photochimique de l'Amiodarone et de ses analogues
Thèse de l'université Paul Sabatier de Toulouse, France - Sciences -Chimie
Moléculaire(1986)
- 126- KAMBARA, H., HISHIDA, S. et NAGANAWA, H.
Secondary Ion Mass Spectra of Oligopeptides
Organic Mass Spectrometry, 17, n°2, (1982), 67
- 127- HILLENKAMP, F., KARAS, M., INGENDOH, A. et STAHL, B.
Matrix Assisted UV-Laser Desorption/Ionization : A New Approach to Mass
Spectrometry of Large Biomolecules
Proceeding of th 2nd Int. Symposium on Mass Spectrometry in the Health and
Life Sciences, A. Burlingame & J.A. McCloskey eds, Elsevier Pub. (1988)

ANNEXES

ANNEXE 1 :

SYNTHESE DE L'AMIODARONE



CALIBRATION DES SPECTRES LAMMA 500 AVEC DEUX REFERENCES ✓

La calibration des spectres se déroule de façon différente si le temps "zéro" (instant où l'impulsion laser est déclenchée) est connu ou non.

a- le temps zéro est connu :

On assimile le temps que met l'ion à parcourir le tube à la longueur parcourue : $t_{\text{total}} = L$

$$t_{\text{total}} = C_1 + C_2 \sqrt{m}$$

Puisque le temps zéro est connu : $C_1 = 0$ d'où $L = C_2 (m)^{1/2}$

Pour calibrer, les éléments alcalins sont souvent utilisés comme masses références : par exemple, pour ^{23}Na ou ^{39}K : $L_1 = C_2 (m_1)^{1/2}$ avec $m_1 = 23$ ou 39 et le pic de masse inconnue à la distance L_x s'écrit $C_2 (m_x)^{1/2}$

avec L_1 : distance entre le point zéro et le signal de l'ion de masse connue m_1 (23, 39,...)

L_x : distance entre le point zéro et le signal de l'ion de masse inconnue m_x

La constante C_2 est égale à :

$$C_2 = \frac{L_1}{\sqrt{m_1}} = \frac{L_x}{\sqrt{m_x}}$$

D'où :

$$m_x = m_1 \left(\frac{L_x}{L_1} \right)^2$$

Si tous les paramètres instrumentaux et les potentiels d'extraction des ions restent fixés pendant la série d'analyses, le rapport m_1 / L_1^2 est constant (C) et connu. On écrit alors :

$$m_x = C \cdot L_x^2$$

b- le temps zéro n'est pas connu

Les constantes C_1 et C_2 sont calculées à partir des deux masses connues m_1 et m_2 (figure 8).

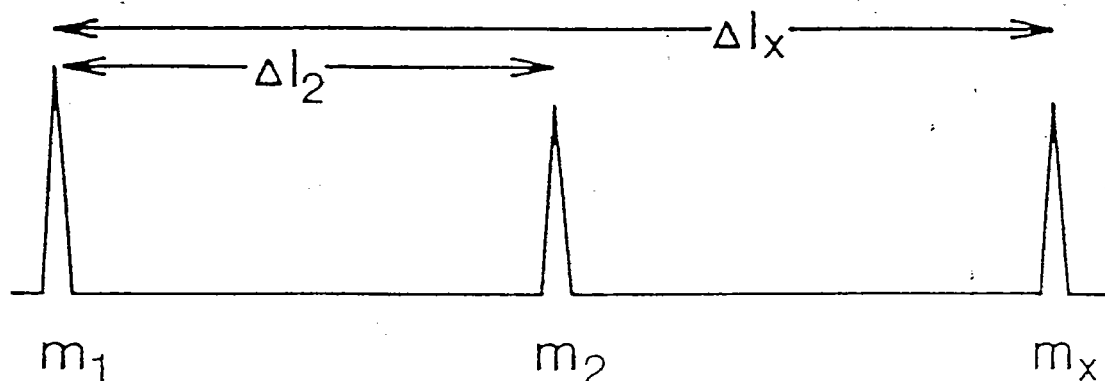


Figure 8 : Calibration d'un spectre de masse LAMMA à partir de deux masses connues m_1 et m_2

La distance $(L_1 - L_2)$ entre les deux pics de masses connues est lue sur le spectre. Elle est, par ailleurs, égale à $[C_1 + C_2 \cdot (m_1)^{1/2}] - [C_1 + C_2 \cdot (m_2)^{1/2}]$. De ceci, la constante C_2 est facilement calculée.

De la même façon, il est possible de lire sur le spectre de masse la distance $(L_x - L_1)$ séparant le pic de masse connue m_1 du pic de masse inconnue m_x .

Cette différence sera égale à $[C_1 + C_2 \cdot (m_x)^{1/2}] - [C_1 + C_2 \cdot (m_1)^{1/2}]$.

Soit : $\Delta L_x = L_x - L_1 = C_2 \cdot (m_x^{1/2} - m_1^{1/2})$

Finalement, pour chaque pic distant du pic de masse m_1 de L_x , il est possible de connaître la valeur de la masse m_x correspondante :

$$\sqrt{m_x} = \sqrt{m_1} + \frac{\Delta L_x}{C_2}$$

TITRE

Contribution à l'étude de la désorption laser in-situ de médicaments. Cas de l'amiodarone.

MOTS-CLES

- * Désorption Laser
- * Spectrométrie de Masse
- * Microsonde LAMMA
- * Microsonde laser FTMS
- * Amiodarone
- * Tissu biologique
- * Désorption assistée par matrice

RESUME

Ce travail, concernant l'étude de la désorption laser in-situ de l'amiodarone, comporte trois parties principales :

La première est relative à l'étude de la fragmentation de l'amiodarone en spectrométrie de masse et à la reconnaissance des différents fragments. Nos résultats par désorption laser sont en accord avec le concept de la formation préférentielle des ions à nombre pair d'électrons. En effet, les ions majoritaires répondent d'une part à ce critère et, d'autre part, on explique leur présence à partir de l'espèce moléculaire protonée, formée principalement par désorption laser.

Dans la deuxième partie, nous avons exploré la potentialité de la microsonde LAMMA pour la localisation de cibles organiques dans un tissu biologique. Le cas de l'amiodarone est étudié d'abord dans une matrice polymérique, ensuite dans un tissu biologique enrobé. L'analyse des cryocoupes est également abordée. Nous montrons ainsi qu'au delà d'un certain seuil de concentration (variable selon le polymère d'enrobage), des interactions physico-chimiques sont prépondérantes et empêchent la détection de la molécule cible. L'effet de longueur d'onde représente toutefois un espoir de détecter l'amiodarone in-situ si celle-ci se fixe dans certaines zones cellulaires avec un taux supérieur à 1%.

La difficulté de détecter l'amiodarone en matrice complexe nous a amené à optimiser le signal du pic moléculaire. Aussi, la troisième partie de ce travail est consacrée à la désorption assistée de l'amiodarone par microsondes LAMMA et FTMS. Nous nous sommes attachés à mettre en évidence les effets de matrice ainsi que les effets de longueur d'onde sur la détection du pic quasimoléculaire $(M+H)^+$ de l'amiodarone. Nos résultats permettent de proposer une nouvelle matrice de désorption susceptible d'être utilisée comme polymère d'enrobage des tissus biologiques à une longueur d'onde donnée.

DS2

X(10022)

~~S/11/~~
90/20
2 ex

S/11/2
90/10

