



HAL
open science

Etude des mécanismes de la désorption : ionisation laser assistée par matrice

Pascal Manuelli

► **To cite this version:**

Pascal Manuelli. Etude des mécanismes de la désorption : ionisation laser assistée par matrice. Matière Condensée [cond-mat]. Université Paul Verlaine - Metz, 1995. Français. NNT : 1995METZ020S . tel-01776921

HAL Id: tel-01776921

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01776921v1>

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>

VB 105711

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Metz
(Spécialité : Chimie-Physique)

par

Pascal MANUELLI

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19950378
Cote	SM3 95/20
Loc	Magasin

**Etude des mécanismes de la Désorption/Ionisation
Laser Assistée par Matrice.**

Soutenue le 13 novembre 1995 devant la Commission d'examen :

Pr Jean François MULLER, Directeur de Thèse et Président de Jury

Dr Yannik HOPPILLIARD, Rapporteur

Dr Alain VAN DORSSELAER, Rapporteur

Dr Jean Claude BLAIS, Examineur

Pr Catherine LANGE, Examineur

Pr Alain MARSURA, Examineur

Dr Angélique VICHOT, Examineur

« Quand vient la Sagesse, sa première leçon est de dire : “ La connaissance n'existe pas ; il y a seulement des aperçus de la Divinité infinie.”

La connaissance pratique est chose différente, c'est-à-dire qu'elle est réelle et commode, mais jamais complète. Par conséquent, la systématiser et la codifier est nécessaire, mais fatal. »

Sri Aurobindo

à Valérie et Aurélie,

à mes Parents,

et mes Soeurs Florence et Véronique,

à mon Frère Patrick.

Remerciements

Que Monsieur le Professeur Jean-François Muller, Directeur du Laboratoire de Spectrométrie de Masse et Chimie Laser (LSMCL) de l'Université de Metz, trouve ici l'expression de ma très profonde gratitude pour m'avoir permis de découvrir la spectrométrie de masse. Il m'a très tôt (dès la licence) donné l'occasion de m'épanouir au sein de son Laboratoire et de découvrir "le monde" de la recherche. Nos échanges ont toujours été marqués par le sérieux, le respect, voire même une certaine complicité. Je le remercie de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse et pour l'expérience qu'il m'a permis de vivre, à la fois, au cours des travaux présentés dans ce mémoire et dans l'ensemble de ceux que nous avons menés en parallèle. J'espère que nous pourrons, dans l'avenir, avoir l'occasion de travailler encore ensemble.

Je remercie Madame le Docteur Yannik Hoppilliard, Directeur de Recherches au CNRS à l'Ecole Polytechnique d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Que Monsieur le Docteur Alain Van Dorsselaer, Directeur de Recherches au CNRS à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg soit remercié d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Qu'il soit également remercié de m'avoir permis de travailler à plusieurs reprises au sein de son Laboratoire. Je tiens également à remercier l'ensemble du personnel du LSMBO pour leur accueil et plus particulièrement Emmanuelle Vagner-Leize avec laquelle nous avons mené les travaux sur les β -CD polyméthylées.

Que Madame le Professeur Catherine Lange de l'Université de Rouen, Monsieur le Professeur Alain Marsura de l'Université Henri Poincaré de Nancy, Monsieur le Docteur Jean-Claude Blais, Chargé de Recherches au CNRS à l'Université Pierre et Marie Curie à Paris, Mademoiselle le Docteur Angélique Vichot du Centre Technique Groupe Italcementi-Ciments Français soient remerciés pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier le Centre Technique Groupe Italcementi-Ciments Français et plus particulièrement Monsieur le Docteur Pierre Colombet, Directeur de Recherche, pour avoir financé une partie des travaux effectués dans ce mémoire.

Que Monsieur Gabriel Krier, Ingénieur de Recherches au Laboratoire soit également remercié ici. C'est le "Gourou" des lieux et ses miracles techniques ne sont plus dénombrables. Mais "Gaby" (ou plutôt *Ange Gabriel*) par pitié ne part plus en vacances ... c'est à chaque fois la catastrophe!

Je ne peux pas ne pas avoir ici une pensée amicale pour Eric Poitevin, Responsable Recherches et Développement chez Vittel, avec qui j'ai commencé ces travaux.

Que notre si dévouée Martine (Ti-Tine pour les intimes ...) soit ici remerciée de sa disponibilité et de sa perpétuelle bonne humeur qui résiste à toutes les épreuves.

Je n'oublierai pas ici tous mes collègues de Laboratoire qui m'ont soutenu et aidé pendant ces années et plus particulièrement au moment de la rédaction et de l'édition de ce mémoire : Adam, Sandrine, Anne, Cathy, Lionel, Paul-Eric, Pierre, Abdel, Benoit M., Pierre-Jean et Christophe.

Mon souvenir va également à tous les autres : Eric M., Jean-Jacques, Nadine, Benoit K, Nouari, Philippe, Frédéric, Paul et Suzana.

Table des matières

Introduction	I
1. Les techniques d'ionisation	1
1.1 Préambule : les lasers	3
1.1.1 Absorption et émission spontanée	4
1.1.1.1 Absorption des photons	4
1.1.1.2 Emission spontanée	4
1.1.2 Emission stimulée	5
1.1.3 Principes physiques de fonctionnement du laser	6
1.1.3.1 Le milieu actif : base atomique du système	6
1.1.3.2 Le pompage : création d'une inversion de population	7
1.1.3.3 La cavité résonante	9
1.1.4 Principales propriétés du rayonnement laser	9
1.1.4.1 Cohérence	10
1.1.4.2 Directivité	10
1.1.4.3 Monochromaticité	10
1.1.4.4 Brillance spectrale	10
1.2 L'interaction laser / matière	11
1.2.1 Effet de la localisation par rapport au point d'impact du laser	12
1.2.2 Effet de la longueur d'onde	13
1.2.2.1 Interaction de type thermique	13
1.2.2.2 Interaction de type photochimique	13
1.2.3 Mécanismes en fonction de l'irradiance laser	16
1.2.3.1 Mécanismes à faible irradiance	16
1.2.3.2 Mécanisme à forte irradiance	18
1.2.4 Mécanismes en fonction du temps et de la température	20
1.2.4.1 Principaux mécanismes en fonction du temps	20
1.2.4.2 Evolution de la température en fonction du temps	20
1.3 La Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI)	22
1.3.1 Principe de la méthode	23
1.3.1.1 Description générale	23
1.3.1.2 La matrice	25
1.3.1.3 Préparation des échantillons	26
1.3.2 Mécanismes du MALDI	28
1.3.3 Les avantages du MALDI	30

1.4	L'electrospray (ES)	31
1.4.1	Description du processus de désorption/ionisation ES	31
1.4.2	La source ES	32
1.4.3	Performances et limitations	33
1.5	Bibliographie	36
2.	Les techniques de séparation des ions	37
2.1	La spectrométrie de masse à Transformée de Fourier	39
2.1.1	Principe	39
	2.1.1.1 Excitation du mouvement cyclotronique	41
	2.1.1.2 Détection du mouvement cyclotronique cohérent	42
2.1.2	Descriptif expérimental	45
	2.1.2.2 La cellule	45
	2.1.2.3 Séquence expérimentale	46
	2.1.2.4 Le dispositif laser	49
	2.1.2.5 Visualisation et déplacement de l'échantillon	49
2.1.3	Performances et limites de la microsonde laser FTMS .	49
	2.1.3.1 Performances	49
	3.1.3.2 Limitations	50
2.2	La spectrométrie de masse à temps de vol	51
2.2.1	Principe de séparation des ions dans un temps de vol	52
2.2.2	Descriptif expérimental	53
	2.2.2.1 Le LAMMA 500	53
	2.2.2.2 Le Biflex	55
2.2.3	Performances et limitations	55
	2.2.3.1 Le LAMMA	55
	2.2.3.2 Le Biflex	56
2.5	Bibliographie	58
3.	Comparaison de la FTMS et du TOF appliqués à l'étude de peptides par MALDI	60
3.1	Protocole opératoire	61
3.1.1	Les molécules étudiées	61
3.1.2	Préparation des échantillons	61
3.2.	Optimisation de la séquence d'analyse FTMS	63
3.2.2	Limitation du nombre d'ions dans la cellule	63
3.2.2	Limitation du temps globale de l'analyse	64
3.3	Comparaison des résultats FTMS et TOF	65

3.3	Pourquoi de telles différences entre les 4 peptides?	67
3.3.1	Influence des AA basiques	67
3.3.2	Influence du choix de la matrice	72
3.4	Conclusion	74
3.5	Bibliographie	76
4.	Etude du rôle de polymères comme matrice de co-désorption	77
4.1	Spectroscopie UV	78
4.1.1	Optimisation des matrices polymériques de désorption	79
4.1.1.1	La Nitrocellulose	80
4.1.1.2	l'Acide Nicotinique	82
4.1.1.3	les mélanges	83
4.2	Etude par spectrométrie de masse	85
4.2.1	Désorption Laser de l'AMP à 249 nm	86
4.2.1.1	AMP pur	86
4.2.1.2	AMP + Acide Nicotinique (AN)	87
4.2.1.3	AMP + Nitrocellulose (NC)	88
4.2.1.4	AMP + Benzophénone (BZ)	89
4.2.2	Désorption Laser de l'AMP à 193 nm	92
4.2.2.1	AMP + NC	92
4.2.2.2	AMP + AN	94
4.2.2.3	AMP + PES	95
4.2.3	Optimisation de la désorption du nucléotide	97
4.2.3.1	AMP + NC + AN	97
4.2.3.2	AMP + PES + AN	98
4.3	Utilisation du mélange NC/AN pour caractériser diverses molécules	101
4.3.1	Les molécules étudiées	101
4.3.2	Résultats expérimentaux	102
4.4	Application du MALDI à l'étude de molécules volatiles	105
4.1.1	Molécules étudiées	105
4.1.2	Choix de la méthode	106
4.1.3	Mode opératoire	106
4.1.4	Résultats et discussions	106
4.1.5	Conclusion	109
4.5	Bibliographie	110

5.	Etude comparée de l'ablation/ionisation laser et de la Pyrolyse/GC/MS des matrices MALDI.	111
5.1	Etude par FTMS des ions formés lors de la vaporisation de la matrice	114
5.2.1	Formation de dimères : l'acide ferulique	115
5.2.2	Formation de dimères décarboxylés : l'acide a cyano-3-hydroxycinnamique	117
5.2.3	Formation de monomères décarboxylés : l'acide a cyano-4-hydroxycinnamique	119
5.2	Etude par Py/GCMS des neutres formés lors de la vaporisation de la matrice	121
5.3.1	Principe de la Py/GCMS	121
5.3.2	Résultats expérimentaux	122
4.3.2.1	L'acide ferulique	123
4.3.2.2	L'acide a cyano-3-hydroxycinnamique	124
5.3.2.3	L'acide a cyano-4-hydroxycinnamique	126
5.3	Conclusions	127
6.	Partie VI : Caractérisation par MALDI de dérivés de la β-cyclodextrine	129
6.1	Etude par MALDI de β-cyclodextrines polyméthylées	132
6.1.1	Conditions expérimentales	132
6.1.2	Préparation des échantillons	133
6.1.3	Résultats et discussion	134
6.1.4	Conclusion	138
6.2	Etude de complexes entre des β-cyclodextrines et des molécules organiques	140
6.2.1	Etude RMN	141
6.2.1.1	Nomenclature et numérotation	141
6.2.1.2	Interprétation des spectres RMN	142
6.2.2	Conditions expérimentales	144
6.2.2	Préparation des échantillons	145
6.2.2.1	Choix du solvant	146
6.2.2.2	Choix du porte-échantillon	146
6.2.2.3	Choix de la matrice	147
6.2.3	Analyse des complexes	147
6.2.3.1	Etude à 266 nm	148
6.2.3.2	Etude à 355 nm	149
6.2.4	Conclusions et perspectives	151
6.3	Bibliographie	153
	Conclusion générale	154

Introduction

Les premiers essais de désorption laser couplée à la spectrométrie de masse appliquée aux molécules organiques datent de 1978. Les résultats étaient excellents pour certaines molécules non volatiles, mais désastreux pour les autres. Le mécanisme correspondant a été schématisé par Hercules. Cependant de nombreux points d'ombre subsistaient.

Les premiers travaux du laboratoire sur l'irradiation/désorption résonante ont été réalisés entre 1983 et 1985 avec la microsonde LAMMA 500. Ils ont permis de montrer qu'au cours d'une impulsion laser de quelques nanosecondes, il y avait une réabsorption de photons par la phase gazeuse induite (microplasma s'il y a ignition ou nuage gazeux dans le cas de la désorption laser). Ce mécanisme peut s'appliquer tant au niveau moléculaire qu'au niveau atomique.

Cette ouverture a guidé les travaux de l'équipe de F. Hillenkamp dans sa conceptualisation de l'effet de matrice pour désorber des molécules cibles de haut poids moléculaire. F. Hillenkamp, concepteur des microsondes LAMMA 500 (transmission) et 1000 (réflexion), a modifié ce dernier instrument pour augmenter la sensibilité de détection des ions de haute masse. Pour ce faire, l'application de tensions voisines de 30 kV, juste avant le détecteur, induit la post-accélération des ions.

Parallèlement aux travaux d'Hillenkamp et coll., entre 1985 et 1988, nous avons mis au point une nouvelle microsonde laser permettant d'étudier les mécanismes de désorption laser en haute résolution.

Les travaux d'Hillenkamp et coll., présentés pour la première fois à Bordeaux en 1988, sur la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) a pris un essor considérable et il n'est de semaine sans publication sur le sujet.

Cependant, le mécanisme du MALDI dont nous décrivons les éléments connus dans ce mémoire n'est toujours pas totalement compris.

Notre travail de recherche est une contribution afin de mieux cerner certains aspects de ce mécanisme complexe. Après l'étude bibliographique, ce mémoire s'articule autour de quatre axes :

- ✓ tout d'abord une étude comparée des résultats obtenus par spectrométrie de masse à temps de vol (TOF¹), qui est la technique de référence dans ce domaine, et à transformée de Fourier (FTMS²), technique utilisée lors de nos expériences,
- ✓ dans un second temps, nous avons tenté de comprendre le rôle de la matrice (notamment polymérique) en tant que matière subissant la désorption laser. A ce niveau, l'influence de la longueur d'onde incidente a été particulièrement étudiée,
- ✓ puis, nous avons réalisé une étude comparée des ions issus de la désorption laser de la matrice (par spectrométrie de masse à transformée de Fourier) et des molécules neutres (par pyrolyse flash couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse). Ceci se justifie dans la mesure où la grande majorité des particules formées lors d'une impulsion laser (dans les conditions énergétiques du MALDI) sont des molécules neutres,
- ✓ enfin, pour illustrer notre propos, nous avons détaillé les résultats obtenus sur des dérivés et des complexes à base de β -cyclodextrines qui font ressortir les avantages mais aussi les limites de cette technique.

¹ TOF : Time Of Flight

² FTMS : Fourier Transform Mass Spectrometry

1. Les techniques d'ionisation

L'impact laser sur une surface induit la formation d'un plasma ou d'un micro plasma qui comporte en son sein des ions (positifs ou négatifs), des radicaux, des molécules neutres et des électrons. De ce fait, l'utilisation du laser en spectrométrie de masse a été possible et intéressante pour plusieurs raisons :

- ✓ le laser est une source de photons externe (vis à vis de l'échantillon) par essence non polluante,
- ✓ la longueur d'onde accordable peut induire des mécanismes différents soit au niveau du solide, soit en phase gazeuse (processus mono à multiphotoniques),
- ✓ l'énergie "déposée" sur l'échantillon est modulable permettant ainsi d'ajuster la valeur la mieux adaptée pour désorber une molécule donnée :
 - ☞ soit en faisant varier le diamètre de l'impact laser de quelques microns¹ à quelques centaines de microns,

¹ Les limites de focalisation des lasers dépendent des lois de la diffraction et par conséquent de la longueur d'onde du laser.

- ☞ soit en maintenant le diamètre constant mais en intercalant au cours du chemin optique une lame semi-transparente,
- ☞ soit en jouant sur l'amplificateur du laser,
- ☞ soit en décalant le déclenchement des cellules de Pockels par rapport au maximum de fluorescence.

En spectrométrie de masse, les lasers peuvent être utilisés de deux façons :

- ✓ soit comme source d'ionisation primaire (c'est le cas des microsondes laser LAMMA² et FTMS³ présentes au laboratoire),
- ✓ soit comme source annexe pour réaliser de la photofragmentation ou de la post-ionisation. Dans ces deux cas de figure, le flash laser a lieu dans la phase gazeuse préalablement obtenue à l'aide d'un laser ou d'une autre source ionisante (par exemple bombardement d'ions primaires ou d'atomes neutres rapides : FAB⁴ ou SIMS⁵ par exemple).

Ce chapitre va s'articuler autour de deux grands axes :

- ✓ la présentation des lasers les plus adaptés pour la spectrométrie de masse,
- ✓ les mécanismes de l'interaction laser-matière.

² LAMMA : LAsEr Microprobe Mass Analysis

³ FTMS : Fourier Transform Mass Spectrometry

⁴ FAB : Fast Atom Bombardment

⁵ SIMS : Secondary Ions Mass Spectrometry

1.1 Préambule : les lasers [1,2]

Le principe de l'émission stimulée, préambule indispensable à la découverte du phénomène laser⁶, avait été décrit par Einstein en 1917. Ce sont deux français : Jean Brossel et Alfred Kastler⁷ qui ont mis au point en 1950 une méthode de pompage optique pour obtenir l'inversion de population nécessaire à la génération d'un faisceau de lumière cohérent. Finalement, c'est en 1960 que Maiman met au point le premier laser à rubis ; quelques temps plus tard, Javan développe le laser visible hélium-néon.

Les progrès réalisés depuis et la diversification des longueurs d'onde accessibles ont favorisé le développement de l'utilisation du laser dans de nombreux domaines. En effet, le laser est devenu un instrument d'usage courant (dans les lecteurs CD, à la caisse des supermarchés pour la lecture des codes barres) qui est également utilisé dans le domaine biomédical (bistouri lors d'interventions chirurgicales, opération de la rétine ou du cristallin, etc ...) ou encore dans l'industrie pour réaliser des découpes ou des soudures. On espère également pouvoir utiliser la puissance des lasers afin de réaliser la fusion nucléaire.

Le développement de l'utilisation du laser en chimie analytique, et plus spécialement en spectrométrie de masse, a été assez lent. Le couplage ablation laser/spectrométrie de masse est longtemps resté le fait de quelques laboratoires universitaires travaillant, dans un premier temps, essentiellement sur l'analyse de surface. Ceci est en grande partie dû à un problème économique : les lasers sont longtemps restés des appareillages coûteux. Au cours des cinq dernières années, la mise au point de la technique dite de Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI) et la commercialisation de petits lasers peu coûteux (lasers à azote), ont permis leur généralisation.

⁶ LASER : Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

⁷ Prix Nobel en 1966

1.1.1 Absorption et émission spontanée

1.1.1.1 Absorption des photons

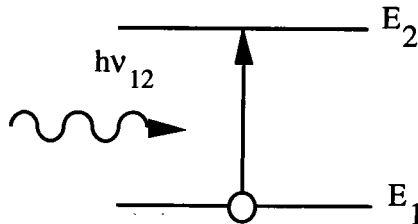


Figure 1. Absorption des photons

Les électrons gravitant autour du noyau d'un atome peuvent occuper des orbites différentes de positions bien connues. L'éloignement d'un électron par rapport au noyau correspond à une augmentation de l'énergie interne de l'atome.

On appelle état fondamental celui qui correspond à l'énergie minimale. Les autres états, d'énergie supérieure à celle du fondamental, sont dits "excités". Le passage de l'état fondamental à l'état excité (ou d'un état excité à un autre, d'énergie supérieure) se produit lors de l'absorption d'une énergie extérieure à l'atome. Cette énergie d'excitation peut être cinétique (chocs de particules, d'atomes, de molécules..) ou électromagnétique. Dans ce dernier cas, le rayonnement arrivant sur l'atome sera partiellement ou totalement absorbé. On sait que l'énergie transportée par un photon est $E = h\nu$, où ν est la fréquence du rayonnement électromagnétique associée à ce photon, et h la constante de PLANCK ($h = 6,62 \cdot 10^{-34}$ J.s).

L'absorption d'énergie électromagnétique par un atome (ou un ion, ou une molécule) obéit donc à la relation $\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu$, dans laquelle E_1 est l'énergie du niveau initial de l'atome et $E_2 > E_1$ l'énergie du niveau où il se trouve porté par absorption du photon de fréquence ν_{12} .

1.1.1.2 Emission spontanée

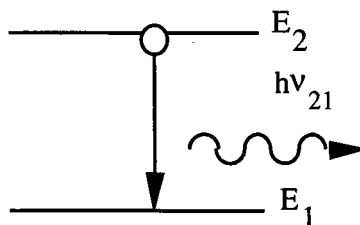


Figure 2. Emission spontanée

L'énergie acquise par l'atome pourra ensuite être perdue spontanément. L'excédent d'énergie libéré à la suite du retour à un niveau inférieur peut être notamment transformé en énergie cinétique au cours de collisions. Ceci conduit à une augmentation de température. Il peut aussi donner lieu à l'émission d'une radiation électromagnétique obéissant à la même relation que dans le cas de l'absorption : $\Delta E = h\nu$, ΔE représentant l'énergie perdue par l'atome et ν_{21} la fréquence du rayonnement émis. Cette émission spontanée, ou fluorescence, n'a pas lieu simultanément pour tous les centres excités.

L'émission spontanée est incohérente : chaque atome émet indépendamment des autres, à un instant quelconque, et pendant une durée très brève. Il n'y a pas de relation de phase, de direction, de polarisation entre toutes ces émissions : le rayonnement est omnidirectionnel. La fréquence de la radiation émise dépend de la différence d'énergie entre les niveaux concernés.

1.1.2 Emission stimulée

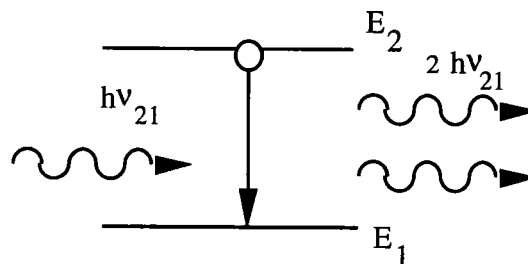


Figure 3. Emission stimulée

Le phénomène d'émission stimulée correspond, comme pour l'émission spontanée, à la libération d'un photon par retombée d'un atome excité à un niveau d'énergie inférieur.

La fréquence du rayonnement est toujours donnée par la relation $\Delta E = h\nu$ mais l'émission n'est plus spontanée, elle est provoquée par l'arrivée d'un photon, de même énergie que celle susceptible d'être libérée par l'atome retombant au niveau inférieur. En d'autres termes, le photon "inducteur" doit avoir la même fréquence que celui dont il va induire l'émission.

Cette émission stimulée possède des propriétés remarquables : les rayonnements inducteurs et induits ont la même phase, la même direction et la même polarisation. Il n'y a donc aucune discrimination physique possible entre le photon inducteur et le photon induit et tout se passe comme si il y avait une véritable "amplification de lumière par émission stimulée de rayonnement".

1.1.3 Principes physiques de fonctionnement du laser

Un oscillateur laser doit comporter au minimum trois éléments fondamentaux :

- ✓ un milieu actif,
- ✓ un système de pompage,
- ✓ une cavité résonante.

Précisons la nature de chacun de ces éléments.

1.1.3.1 Le milieu actif : base atomique du système

Le matériau actif d'un laser peut être un solide, un liquide ou un gaz.

C'est un milieu qui possède une structure appropriée de niveaux d'énergie discrets s'excitant facilement et possédant la capacité de stocker l'énergie reçue de l'extérieur. L'émission laser se fait à une longueur d'onde déterminée par deux états d'énergie de cette structure, sur une transition où le système présente une émission spontanée correspondant à une durée de vie relativement longue du niveau supérieur (état métastable).

Les principaux milieux actifs solides sont :

- ✓ *le rubis* : cristal d'alumine contenant des ions Cr^{3+} ,
- ✓ *le verre au Néodyme* : verre dopé par des ions Nd^{3+} ,
- ✓ *le Nd-YAG* (Yttrium Aluminum Garnet), c'est à dire un grenat d'yttrium et d'aluminium, dopé par des ions Nd^{3+} .

Les principaux milieux actifs gazeux sont :

- ✓ *le mélange ArF* : délivre une longueur d'onde de 193 nm. Il est constitué d'un mélange d'argon et de fluor dans un gaz tampon (hélium ou néon),
- ✓ *le mélange KrF* : délivre une longueur d'onde de 249 nm. Il est

constitué d'un mélange de krypton et de fluor dans un gaz tampon (hélium ou néon),

- ✓ *le mélange XeCl* : délivre une longueur d'onde de 307 nm. Il est constitué d'un mélange de xénon et de chlore dans un gaz tampon (hélium ou néon),
- ✓ *le dioxyde de carbone CO₂* ,
- ✓ *l'azote N₂*.

1.1.3.2 Le pompage : création d'une inversion de population

Examinons les conditions dans lesquelles peut se produire l'émission stimulée. Considérons N atomes à deux niveaux d'énergie possibles, N_1 atomes étant à l'état fondamental d'énergie E_1 et N_2 atomes à l'état excité d'énergie E_2 ($E_2 > E_1$). Il n'y a donc pratiquement pas d'atomes à l'état excité dans un corps à l'équilibre à la température ambiante. Un rayonnement incident a une probabilité voisine de zéro de provoquer une émission stimulée et une probabilité très proche de un d'être absorbé. Pour avoir une émission stimulée importante, il faut $N_2 > N_1$. Cette inversion de population sera réalisée, hors de l'équilibre thermique, par une excitation extérieure appelée "pompage". Le pompage permet en effet de porter les atomes du milieu actif dans leurs niveaux énergétiques supérieurs et de maintenir ainsi le déséquilibre thermodynamique nécessaire à l'inversion de population.

Si le milieu actif d'un laser comprenait seulement deux niveaux (l'état fondamental et un état excité), il serait impossible de placer la majorité des atomes dans l'état excité et de réaliser la condition $N_2 > N_1$. C'est pourquoi les systèmes atomiques ou moléculaires couramment utilisés fonctionnent soit sur trois ou quatre niveaux, soit encore avec un transfert résonant d'énergie.

Nous ne donnerons ici que l'exemple du système de pompage à quatre niveaux qui est le plus communément utilisé (par exemple dans le cas des lasers Nd-Yag) :

Dans un système à quatre niveaux, le niveau terminal E_1 de la transition laser possède une énergie supérieure à celle du niveau fondamental.

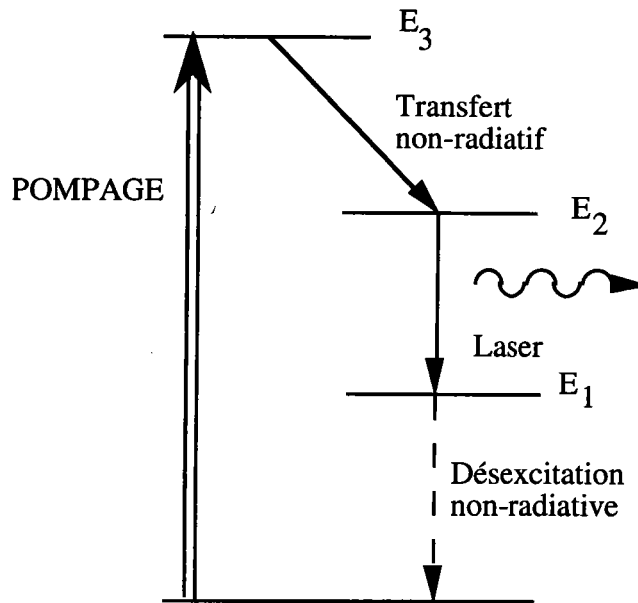


Figure 4. Système de pompage à 4 niveaux

Ce système évite d'avoir à fournir un pompage excessif. En effet, les transferts non radiatifs entre E_3 et E_2 d'une part, et E_1 et E_0 d'autre part, sont en général très rapides (collisions, vibrations d'un cristal). Le niveau E_1 reste essentiellement vide tandis que le niveau métastable E_2 est constamment repeuplé, même à pompage modéré. Ainsi, une faible population dans ce niveau est suffisante pour que l'inversion se maintienne.

Les méthodes de pompage les plus couramment employées sont :

- ✓ Pompage optique incohérent (lampe flash, lampe à arc) ou cohérent (autre laser),
- ✓ Pompage électronique (décharges électriques ou faisceaux d'électrons),
- ✓ Pompage thermique (détente hydrodynamique),
- ✓ Pompage chimique (combustions chimiques exothermiques (flammes) ou combustions rapides (explosions)),
- ✓ Pompage par particules lourdes (faisceaux d'ions, produits de fission d'un réacteur),
- ✓ Pompage par rayonnement ionisant (explosion nucléaire ou source de rayons X).

1.1.3.3 La cavité résonante

Elle est constituée de deux miroirs hautement réfléchissants parallèles placés face à face : ces réflecteurs renvoient l'onde électromagnétique en de multiples passages aller et retour dans le milieu actif, amplifiant ainsi le champ électromagnétique dans la cavité. Le couplage optique vers l'extérieur s'effectue en rendant semi-transparent un des miroirs ou encore en perçant un orifice dans un des miroirs.

Nous disposons maintenant des trois éléments constitutifs d'un laser, le pompage, le milieu actif et la cavité résonante, ce qui permet de construire un schéma de principe comme celui qui est représenté ci-dessous :

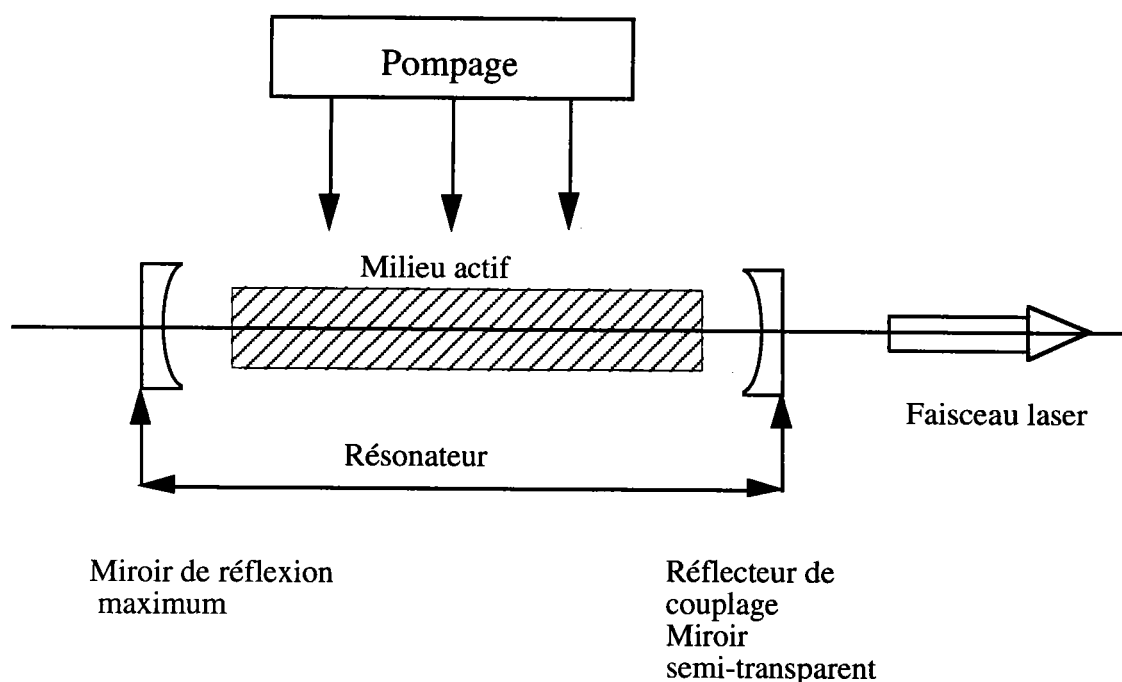


Figure 5. Schéma de principe de la cavité résonante

1.1.4 Principales propriétés du rayonnement laser

Le rayonnement laser se distingue des rayonnements ordinaires par de nombreuses propriétés qui expliquent son utilisation dans des domaines aussi variés que l'holographie, les télécommunications, la physique fondamentale, l'analyse ou l'usinage des matériaux.

1.1.4.1 Cohérence

La conséquence des propriétés de l'émission stimulée et de la présence d'une cavité résonante, est l'identité de phase (et de longueur d'onde) des différents photons émis par un laser. On dit que l'émission est cohérente. La cohérence de l'émission laser se présente sous deux aspects, la cohérence temporelle et la cohérence spatiale.

1.1.4.2 Directivité

Une propriété fondamentale du rayonnement laser est sa directivité. Elle est seulement limitée par la diffraction due à la taille finie du faisceau. Pour désigner cette propriété, on peut dire que le rayonnement laser est caractérisé par une grande "concentration angulaire". Pour un laser vert ($\lambda=500$ nm) et une surface de sortie de l'ordre de 5 mm^2 , si la divergence angulaire est de 10^{-4} rd, cela veut dire que le diamètre du faisceau à 1 km n'est que de 20 cm.

1.1.4.3 Monochromaticité

Les lasers délivrent des faisceaux monochromatiques (c'est à dire ne comportant qu'une longueur d'onde). L'utilisation de lasers ayant une largeur spectrale très faible n'est en général pas utile en spectrométrie de masse. Seules quelques applications concernant par exemple les mécanismes d'ionisation peuvent recourir à des lasers de ce type.

1.1.4.4 Brillance spectrale

La brillance représente la puissance émise par unité de surface, de fréquence et par stéradian. Le rayonnement laser possède une brillance élevée. Pour donner un ordre de grandeur, le soleil a une brillance spectrale dans le visible $\beta = 1,5 \cdot 10^{-12} \text{ W.cm}^{-2}.\text{sr}^{-1}.\text{Hz}^{-1}$ alors qu'un laser verre-Néodyme d'une puissance de 10.000 MW, fonctionnant en mode bloqué à une longueur d'onde de 1064 nm, a une brillance spectrale $\beta = 2 \cdot 10^8 \text{ Wcm}^{-2} \text{ sr}^{-1}.\text{Hz}^{-1}$ soit 10^{20} fois plus élevée.

1.2 L'interaction laser / matière

Les caractéristiques de l'ionisation laser sont différentes suivant que la cible est sous forme gazeuse ou solide.

En phase gazeuse, les processus d'ionisation sont assez bien connus. En général, l'ionisation nécessite une énergie relativement faible. On peut appliquer les principes généraux de la spectroscopie électronique des atomes ou des molécules.

Les mécanismes qui régissent l'ionisation des solides sont beaucoup plus complexes. En effet, le même laser doit à la fois permettre le passage de la matière de l'état condensé à l'état gazeux et l'ionisation d'une partie des atomes et des molécules. De ce fait, les mécanismes de l'ionisation laser des matériaux condensés sont très complexes et très difficiles à modéliser. Nous allons essayer de comprendre le rôle du faisceau laser dans chacun de ces deux phénomènes. Ce mémoire ne traitera que de l'ionisation en phase solide.

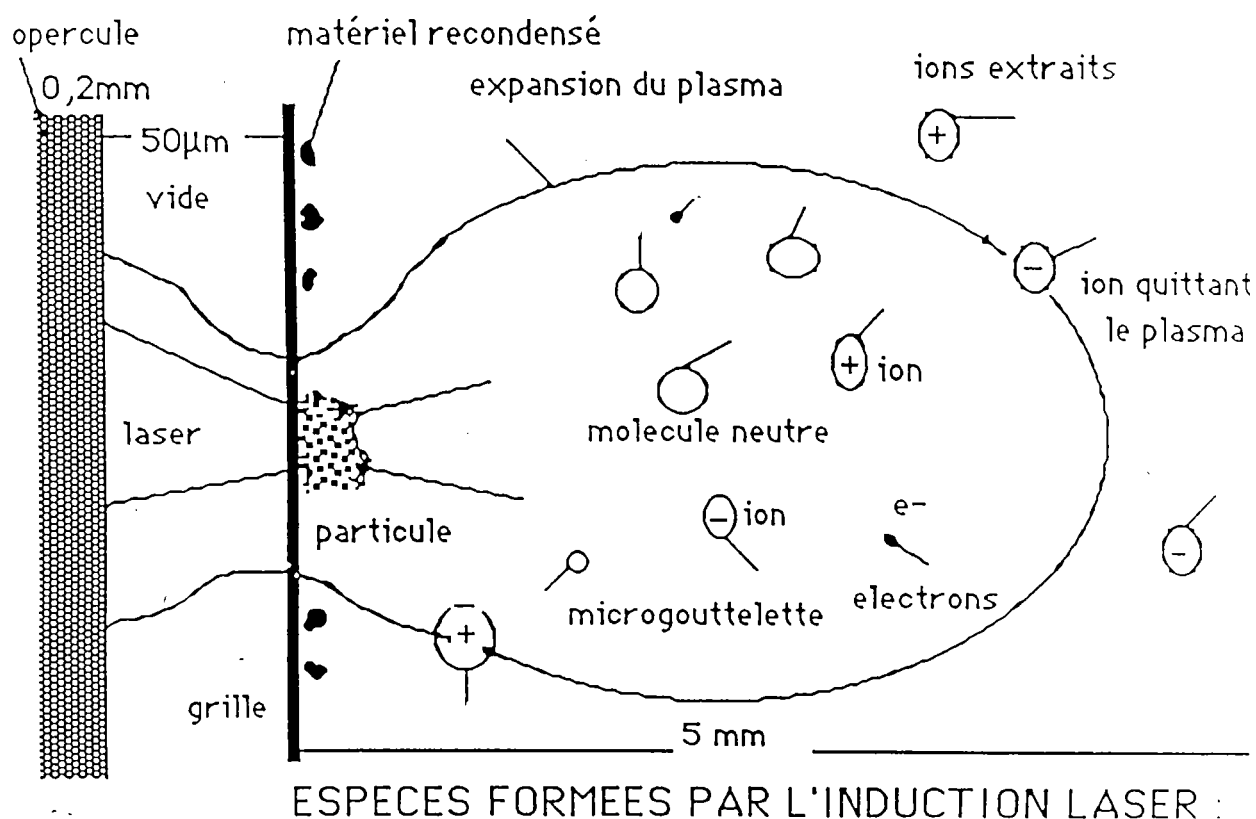


Figure 6. Schéma général de l'ablation laser

1.2.1 Effet de la localisation par rapport au point d'impact du laser

L'un des plus anciens modèles sur l'ablation/ionisation laser est celui qui a été proposé par Hercules en 1982 [3]. Lors de l'impact entre un faisceau laser et la surface d'un matériau, de nombreux processus interviennent. Les principaux d'entre eux sont décrits figure 8. L'importance des zones décrites ci-après ainsi que l'épaisseur de la partie ablatée dépendent, pour un matériau donné, essentiellement de la longueur d'onde et de l'irradiance du faisceau laser incident. L'influence de ces deux paramètres sera décrite dans les chapitres ultérieurs.

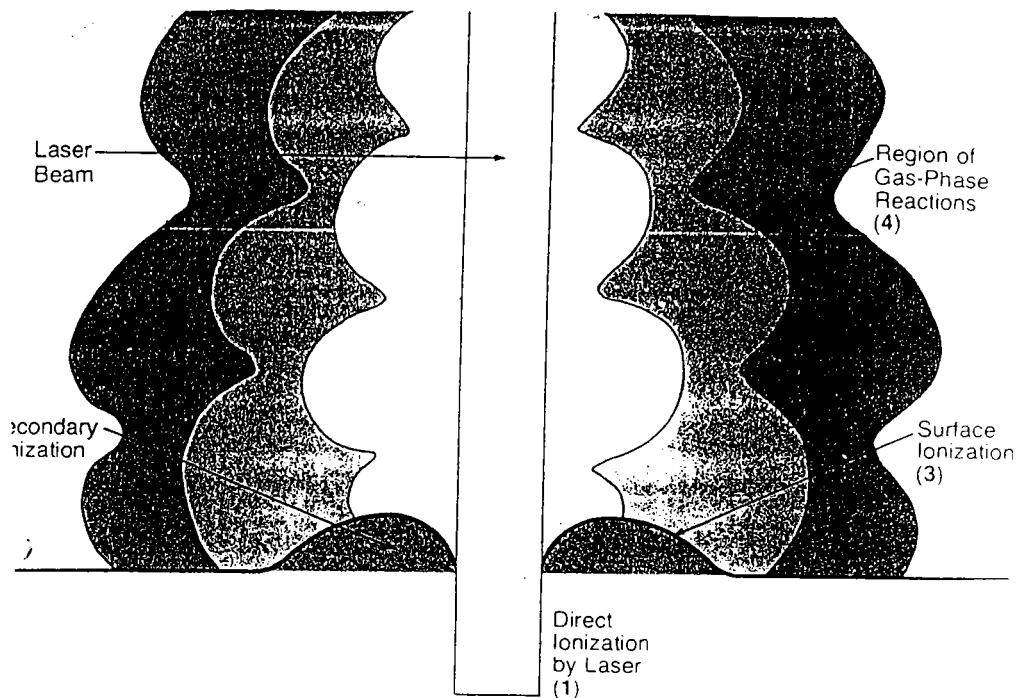


Figure 7. Différentes zones de l'ablation laser selon Hercules

Lorsque l'on considère une vaporisation/ionisation laser, on peut différencier quatre types de mécanismes correspondant à différentes zones géographiques de la surface :

- ✓ la région (1), où se produit l'impact laser, est caractérisée par une ionisation directe du matériau solide. La température dans cette zone peut atteindre 3000 à 6000K. Dans ces conditions, il apparaît que seuls des ions atomiques et quelques fragments moléculaires peuvent être émis.

- ✓ la région (2), adjacente à la région (1), est le siège d'une ionisation secondaire. Elle est caractérisée par un fort gradient thermique dû à l'onde de choc issue de l'impact laser. Les ions de haut poids moléculaire ainsi que les molécules neutres sont émis dans cette zone. D'autre part, un certain nombre d'ions résultant de réactions en phase solide proviennent également de cette zone.
- ✓ la région (3) correspond à la surface d'ionisation, c'est à dire à l'espace de libération des ions dans le vide du spectromètre de masse.
- ✓ la région (4) correspond à la phase gazeuse où se déroule la plupart des réactions ions-molécules responsables de la formation des ions pseudomoléculaires et des clusters (dans le cas où des molécules sont présentes en surface).

1.2.2 Effet de la longueur d'onde

En fonction de la longueur d'onde du laser incident, les mécanismes d'ablation peuvent être très différents. Dans l'infra-rouge, les mécanismes seront de type thermique alors que dans l'ultra-violet ils seront plutôt photochimiques.

1.2.2.1 Interaction de type thermique

L'énergie apportée par le rayonnement laser se disperse dans le matériau par conduction thermique. Les photons ne sont pas assez énergétiques pour réaliser une ionisation photochimique du matériau. Par contre, ils sont très nombreux et provoquent un échauffement de la surface par chocs successifs. Il en résulte une fusion et une vaporisation du matériau. On peut considérer, en première approximation, que l'effet du rayonnement laser est identique à celui d'une source de chaleur disposée en surface du matériau. Il s'en suit une propagation du front de chaleur en profondeur. L'épaisseur ablatée par impact laser dépend de la longueur d'onde du laser utilisé ainsi que de son irradianance.

1.2.2.2 Interaction de type photochimique

D'après Srinivasan [4], le processus d'ablation peut se décomposer en trois grandes étapes successives :

- ✓ absorption des photons UV par le matériau,
- ✓ rupture des liaisons les plus faibles,
- ✓ ablation du matériau.

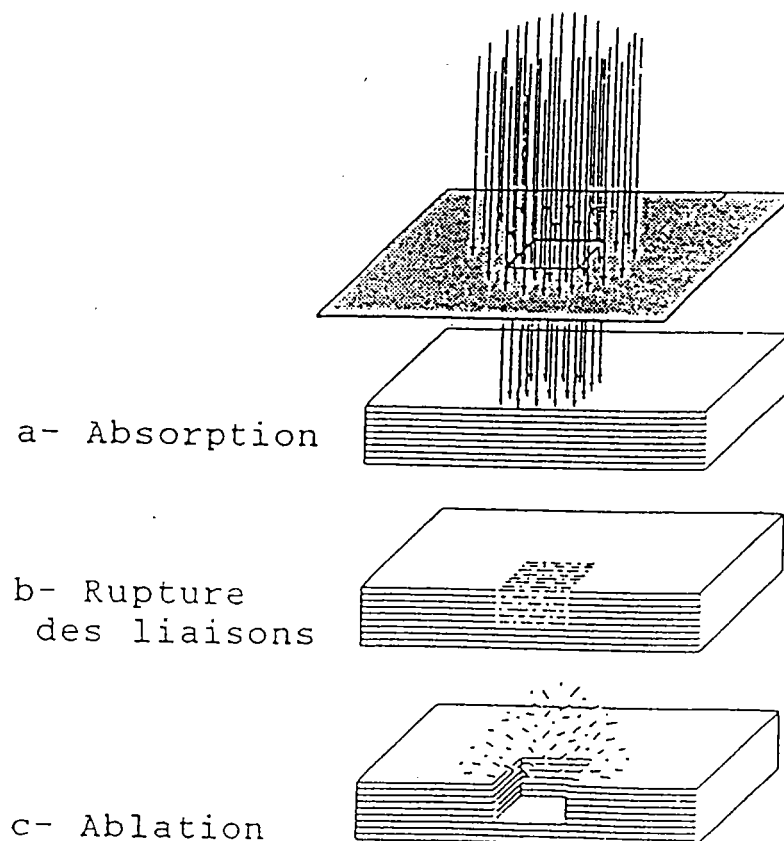


Figure 8. Principe de l'ablation des polymères selon Srinivasan.

L'absorption de photons UV par le matériau conduit à des transitions entre les états électroniques de la molécule (c'est notamment le cas pour les polymères). On considère que la décomposition du matériau est ablative.

Toujours d'après Srinivasan, trois mécanismes peuvent conduire à cette décomposition ablative :

- ✓ tout d'abord, absorption de photons UV conduisant les molécules cibles à des niveaux énergétiques supérieurs à leur limite de dissociation. Cette étape purement photochimique est extrêmement courte : $t \ll 1\text{ ns}$ et elle conduit directement à l'ablation du substrat.
- ✓ les molécules excitées (mais non ablatées) se relaxent par redistribution de l'excès d'énergie sous forme de mouvements rotationnels et vibrationnels aux molécules voisines. Ceci se caractérise par un échauffement brutal et localisé de l'échantillon. L'absorption de plusieurs photons successifs dans une même zone permet l'obtention de températures suffisantes pour permettre une décomposition thermique des molécules au niveau de leurs liaisons les plus faibles (liaisons hydrogènes, interactions ioniques ...).
- ✓ l'absorption des premiers photons UV provoque un échauffement de la surface au point d'impact conduisant à un peuplement des états vibrationnels excités de la molécule. Si la durée de vie de cet état vibrationnel est suffisamment longue pour qu'il y ait réabsorption d'un second (voir d'un troisième) photon provenant de la même impulsion laser, on peut alors constater une dissociation photochimique des molécules.

Si le nombre de liaisons cassées par l'ensemble de ces processus est suffisant, on assiste à une augmentation brutale de la pression locale conduisant à une éjection explosive de matière. L'excès d'énergie apporté par le faisceau laser se dissipe en énergie de translation. Les modèles simples mis au point sur les polymères peuvent être étendus à d'autres matériaux. On peut, en première approximation, déterminer la profondeur ablatée par impact laser :

$$Z_c = \frac{1}{a} \ln \left(\frac{F}{F_c} \right)$$

Z_c profondeur ablatée par impact laser en cm,

a coefficient d'absorption du matériau à la longueur d'onde du laser en cm^{-1} ,

F fluence du laser incident en J/cm^2 ,

F_c fluence au seuil d'ablation en J/cm^2 ,

1.2.3 Mécanismes en fonction de l'irradiance ⁸ laser [5]

La plupart des ions (négatifs ou positifs) donnant des informations sur la nature du matériau analysé sont formés lors de la phase d'expansion du nuage gazeux induit par l'impact laser. La nature de ce nuage gazeux est différente selon l'irradiance du laser.

De plus, il apparaît que le rapport ions/neutres formés lors d'une impulsion laser dépend directement de l'irradiance laser. En effet, pour des irradiances très supérieures à 10^9 W/cm² il peut atteindre des valeurs comprises entre 0,1 et 0,01 alors qu'il ne serait plus que de 10^{-5} pour des irradiances inférieures à 10^8 W/cm² (cf Hercules).

On peut ainsi distinguer trois processus d'ablation/ionisation en fonction de l'irradiance sur l'échantillon :

- ✓ entre 10^4 - 10^6 W/cm² (seuil d'ablation ⁹ selon les matériaux) et 10^7 à 10^8 W/cm², on rencontre les processus de désorption laser. Ils permettent, dans de nombreux cas, de mettre en évidence les ions moléculaires ou pseudomoléculaires ¹⁰.
- ✓ entre 10^8 W/cm² (seuil d'ignition du plasma ¹¹ qui dépend de la nature du matériau étudié) et 10^{10} W/cm² : les ions élémentaires sont généralement toujours présents mais accompagnés d'agrégats ionisés dont la nature dépend du solide étudié,
- ✓ à irradiance élevée ($I > 10^{10}$ W/cm²) : formation essentiellement d'ions élémentaires.

1.2.3.1 Mécanismes à faible irradiance

A faible et moyenne irradiance, le phénomène d'ablation laser se déroule en deux grandes étapes :

- ✓ dans un premier temps, il y a absorption des photons émis par le faisceau laser par le matériau solide. Cette étape est gouvernée

⁸ Irradiance : énergie déposée sur l'échantillon rapportée à l'unité de surface. L'unité la plus couramment utilisée est le W/cm².

⁹ seuil d'ablation : énergie minimum à fournir au matériau pour qu'il y ait perte de matière.

¹⁰ Ion pseudomoléculaire : ion positif obtenu par protonation ou cationisation de la molécule ou dans le cas d'un ion négatif par déprotonation.

¹¹ pratiquement, on peut déterminer le seuil d'ignition du plasma par la présence sur l'écran de visualisation d'un "flash" au point d'impact du laser.

par le coefficient d'absorption linéaire α (cm^{-1}) du matériau solide. Plus ce coefficient est élevé, plus le seuil d'ablation du matériau est faible. Ce coefficient peut-être mis en relation avec la longueur d'onde à laquelle le matériau absorbe. Plus le matériau est transparent à la longueur d'onde du laser utilisé, plus le seuil d'ablation est élevé.

- ✓ une fois le seuil d'ablation franchi, un effet d'écran [6] est observé. Celui-ci est dû aux particules émises par le matériau (ions, radicaux, molécules neutres, électrons). De ce fait, la totalité des photons du pulse laser n'est pas efficace pour l'ablation. La vitesse instantanée d'ablation mesurée en Å/ns est proportionnelle à la différence entre l'intensité laser "efficace" (c'est à dire arrivant réellement sur la surface) et le seuil d'ablation. Cette différence représente en fait la quantité d'énergie réellement utilisée pour l'ablation :

$$v = k(I_0 e^{-\beta x} - I_S)$$

- v vitesse de propagation de l'interface mouvante,
- k constante de vitesse d'ablation,
- I_0 intensité instantanée atteignant l'interface solide-gaz,
- β coefficient d'absorption de la phase gazeuse formée par les fragments éjectés,
- x position de l'interface,
- I_S intensité instantanée au seuil d'ablation.

Cet effet d'écran a notamment été décrit par V. Granier et S Lazare [6] pour des polymères.

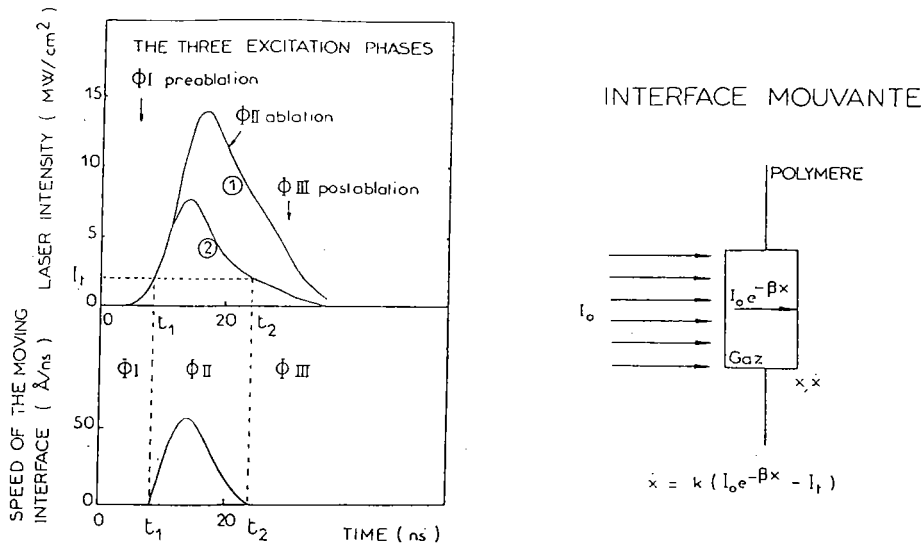


Figure 9. L'effet d'écran selon V. Granier et S. Lazare.

On constate sur ces courbes que l'intensité laser sur l'échantillon en fonction du temps $I(t)$ est bien inférieure à l'intensité théorique émise par le laser $I_0(t)$. La détermination du coefficient d'écran β a été réalisée par microbalance à quartz.

1.2.3.2 Mécanisme à forte irradiance [7]

L'exemple choisi pour décrire ce mécanisme est celui d'un impact laser ($\lambda = 248$ nm, laser excimère) de $100 \mu\text{m}$ de diamètre sur une cible d'aluminium avec une fluence de 5 J/cm^2 ($\tau = 25$ ns). L'expansion du plasma est schématisée figure 10. On peut distinguer quatre zones distinctes :

- ✓ la zone 1 est caractérisée par une absorption de type "Bremstrahlung" maximale. La pression (100 kbar) et la densité critique ($1,1 \times 10^{21} / \lambda^2$ (mm)) sont très élevées. La température moyenne est de l'ordre de 0,2 eV. L'énergie thermique est transférée par conduction à la cible,
- ✓ la zone 2 est appelée couche de Knudsen. Dans cette zone, l'expansion a un caractère tridimensionnel avec, comme en zone 1, un taux très élevé de collisions. La température est, en général, comprise entre 2 et 5 eV,
- ✓ la zone 3 est la région coronaire. Les électrons sont chauffés par le rayonnement dit de "bremstrahlung inverse". Le taux de collisions est considérablement plus faible mais c'est pourtant la zone la plus chaude,
- ✓ la zone 4 correspond à l'éjection des électrons "chauds" et des ions. La densité est notablement réduite (10^{12} cm^{-3}). La perte des électrons

qui provoque un retour de quelques ions vers la région du panache de plus haute énergie.

La profondeur de la pénétration thermique durant l'impulsion laser de durée τ est donnée par la relation suivante :

$$x = 0,969 (K\tau)^{1/2} \gg 1/\alpha$$

où $K = K/\rho C$ représente la diffusivité thermique et $1/\alpha$ la profondeur de pénétration du rayonnement laser [α : coefficient d'absorption].

Le seuil d'ignition du plasma généré dans le vide est donné par l'expression :

$$I \tau^{1/2} \gg B \quad 4 \cdot 10^4 \text{ W} \cdot \text{s}^{-1/2} \cdot \text{cm}^{-2}$$

En d'autres termes, plus l'impulsion est courte, plus l'intensité I (en W/cm^2) doit être élevée pour atteindre le seuil d'ignition du plasma.

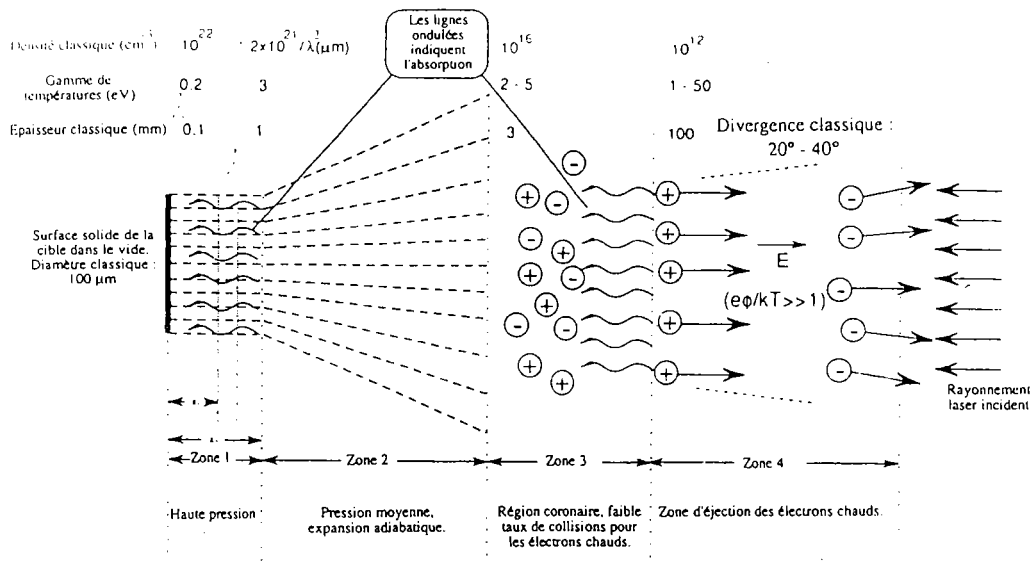


Figure 10. Ablation laser des matériaux à irradiane élevée.

1.2.4 Mécanismes en fonction du temps et de la température

Lors de l'impact laser, il y a "évaporation" du matériau cible. Ceci résulte d'une absorption des photons émis par le faisceau laser et d'une succession de phénomènes physiques ultra-rapides. Nous allons essayer de décrire les principaux de ces phénomènes en fonction de leur déroulement chronologique puis en fonction de la température régnant au sein du nuage gazeux :

1.2.4.1 Principaux mécanismes en fonction du temps

$t \leq 0,01$ ns	Absorption non linéaire des photons	Emission de photoélectrons
$t \leq 0,1$ ns	Formation d'excitons Emission thermoionique	Apparition de charges en surface
$t \leq 1$ ns	Ionisation de la surface	Emission d'ions secondaires
$t = 2$ ns	Formation du plasma	Emission d'ions, de radicaux, d'atomes et de molécules neutres Emission de photons
$t = 5$ ns ---> 100 μ s	Expansion du nuage gazeux ("plume") ou du plasma si l'ignition est atteinte	Réactions ions/molécules Emission d'agrégats ionisés

Tableau 1 : Principaux mécanismes de l'ablation laser en fonction du temps.

1.2.4.2 Evolution en fonction de la température [8]

Vertes et al. ont décrit un modèle qui, à faible irradiance, décrit les conditions de température et de densité de fragments dans la plume. Ils ont pu montrer que, contrairement à ce qui est constaté pour les plasmas laser (irradiance élevée), les températures obtenues dans ces conditions étaient très faibles :

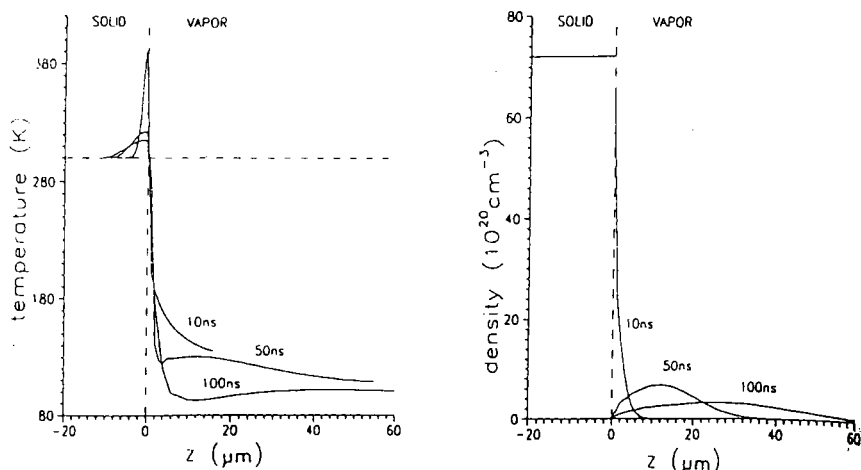


Figure 11. Evolution de la température et de la pression dans le nuage gazeux en fonction du temps selon Vertès.

L'étude de ces courbes en fonction du temps montre que la densité de matière à proximité de la surface évolue très rapidement en fonction du temps. Ils ont pu estimer que la vitesse des particules au barycentre du nuage gazeux induit par l'impact d'un laser Nd-Yag quadruplé en fréquence ($\lambda=266 \text{ nm}$) à une irradiane de 10^7 W/cm^2 était de 340 m/s . Si ce résultat est traduit en terme d'énergie cinétique, cela correspond à $E_c = 60 \text{ meV}$.

D'autre part, l'étude de la courbe représentant la température en fonction du temps permet de mettre en évidence une élévation de température très faible. En effet, si l'on compare ces résultats ($T_{\text{max}} = 400 \text{ K}$) à ceux estimés pour un impact laser focalisé (T_{max} de l'ordre de 3000 à 6000 K), on peut mieux expliquer la possibilité de détecter certaines molécules thermolabiles (biomolécules notamment) dans ces conditions.

1.3 La Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI)

Les premières études de composés par désorption (ou ablation) laser couplée à la spectrométrie de masse ont été réalisées il y a une vingtaine d'années [9]. Cependant, cette technique est limitée en masse.

C'est en 1988 que le concept de Désorption/Ionisation laser Assistée par Matrice (MALDI ¹²) apparaît pour la première fois, simultanément dans les travaux de Hillenkamp et coll. [10] et dans ceux de Tanaka et coll. [11]. L'originalité de cette technique de désorption est d'inclure les molécules à détecter dans une matrice. Cette dernière doit présenter une forte absorption à la longueur d'onde du laser incident. Cette méthode permet le passage en phase gazeuse de molécules de hauts poids moléculaires intactes. Ses principales applications concernent les études de biopolymères : peptides, protéines, polynucléotides, oligosaccharides, ... Plus récemment, de nouvelles applications touchant à l'analyse de polymères synthétiques [12] ont été décrites.

Les techniques proposées par Hillenkamp et coll. et par Tanaka et coll. diffèrent essentiellement par le choix de la matrice utilisée :

- ✓ dans la méthode d' Hillenkamp, l'échantillon est dilué dans un composé organique (à l'origine l'acide nicotinique) et la longueur d'onde utilisée est 266 nm,
- ✓ dans les travaux de Tanaka, la matrice utilisée est une suspension de particules de cobalt finement divisé (le diamètre des particules est de l'ordre de 300 Å) dans le glycérol. La longueur d'onde est de 337 nm. En fait, ce sont les particules de cobalt qui constituent les sites d'absorption des photons.

La méthode décrite par Hillenkamp est apparue plus sensible et plus facile à mettre en oeuvre. Elle s'est développée très rapidement aux dépens de celle proposée par Tanaka.

Le premier spectromètre de masse couplé à cette technique d'ionisation a été un spectromètre à temps de vol (TOF ¹³). En effet, il présente le gros avantage (théorique) de ne pas avoir de limite en masse. En tout état de cause, c'est le séparateur en masses qui permet l'étude des molécules de plus haut poids moléculaire. Par la suite, d'autres séparateurs ont été testés tels que les spectromètres de masse à transformée de Fourier

¹² MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation

¹³ TOF : Time of Flight

[13] (FTMS¹⁴) ou les pièges à ions [14] (ITMS¹⁵). Ces deux derniers types de couplages sont intéressants à la fois pour obtenir des résolutions plus élevées et pour effectuer des études dites de MS/MS¹⁶.

Les études réalisées au laboratoire ont été faites à l'aide d'un couplage MALDI/FTMS.

1.3.1 Principe de la méthode

Dans la suite de ce mémoire, l'utilisation du terme "MALDI" sera effectué selon la description faite par Hillenkamp et Col.

1.3.1.1 Description générale

Les échantillons MALDI sont préparés en mélangeant en solution une faible quantité de molécules cibles avec un gros excès de matrice. Quelques microlitres (μl) du mélange obtenu sont déposés sur un porte-échantillon en métal inerte (par exemple en acier inoxydable), puis le solvant est évaporé. Le dépôt solide cristallisé résultant est irradié par un laser à impulsions dont la longueur d'onde correspond à une bande d'absorption de la matrice. Pour obtenir un résultat optimal, il est préférable que la molécule cible à analyser n'absorbe pas à cette longueur d'onde (ou très peu).

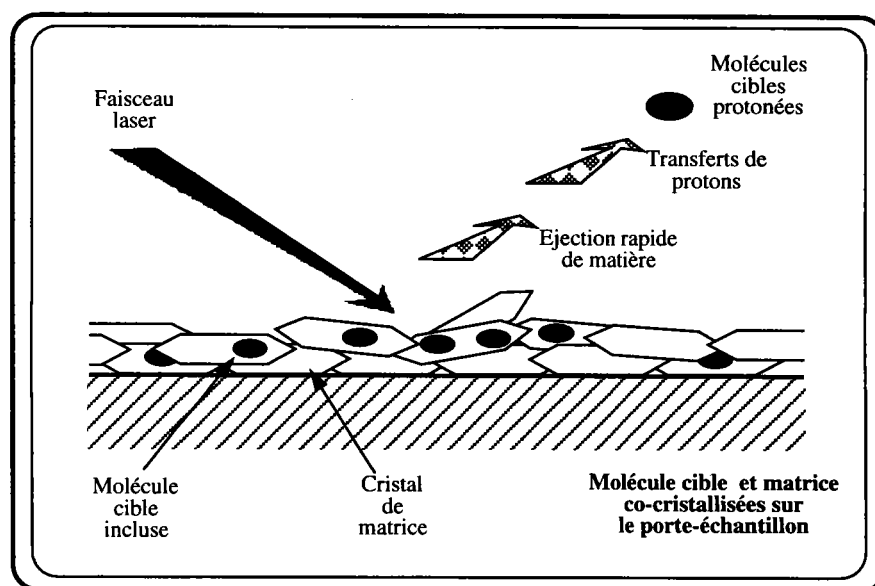


Figure 12. Schéma de principe de la technique MALDI.

14 FTMS : Fourier Transform Mass Spectrometry

15 ITMS : Ion Trap Mass Spectrometry

16 MS/MS : analyse séquentielle des ions et de leurs fragments par dissociations induites par collisions (CID)

Lors du processus d'éjection qui suit l'impact laser, des molécules de matrice intactes, fragmentées, neutres ou ionisées, sont éjectées. Les molécules cibles sont quant à elles désorbées, normalement intactes, sous forme neutre et en faible partie ionisée le plus souvent par déprotonation, protonation ou cationisation suivant les cas (figure 12).

Les principaux atouts de cette méthode sont :

- ✓ les ions pseudomoléculaires émis sont majoritairement du type : $(M+H)^+$, $(M+Na)^+$, $(M+K)^+$, ou $(M-H)^-$,
- ✓ on obtient dans certains cas (essentiellement pour les molécules de plus de 10.000 u) des ions multichargés du type M^{2+} , M^{3+} , M^{4+} , M^{2-} , M^{3-} , M^{4-} , ...
- ✓ la détection de peu ou pas de fragments,
- ✓ la rapidité et la simplicité de ce type d'analyse,
- ✓ la sensibilité élevée, qui rend l'utilisation de cette technique compatible avec les exigences des biologistes : la quantité de produit à analyser déposée sur le porte-échantillon est (en routine) de l'ordre de la picomole,
- ✓ la détermination précise de la masse molaire (de l'ordre de 0,1%),
- ✓ la faible sensibilité (relative) aux contaminants en comparaison avec d'autres techniques de spectrométrie de masse telle que l'electrospray.

Les principales difficultés rencontrées lors des expériences MALDI proviennent de la faible résolution des pics (notamment en haute masse). Ceci est essentiellement dû à la présence de pics satellites résultant de cationisations multiples et / ou de la présence d'adduits de matrice.

Cette première présentation générale de la technique MALDI nous amène à mettre en évidence une limitation importante du développement de cette méthode d'analyse. En effet, les mécanismes qui régissent les étapes de désorption/ionisation sont très mal connus et le développement du MALDI s'est essentiellement fait de façon empirique. On essaiera, tout

au long de ce mémoire, de donner quelques éléments permettant une meilleure compréhension de ces mécanismes.

La multiplicité des travaux publiés fait ressortir l'importance particulière de deux paramètres :

- ✓ la matrice,
- ✓ la préparation des échantillons.

Nous allons nous attarder un peu plus sur chacun de ces deux facteurs.

1.3.1.2 La matrice

La matrice est généralement un acide organique qui enrobe, tel un "cocon protecteur", la molécule cible. Le tableau 2 récapitule la liste des principales matrices citées dans la littérature ainsi que les longueurs d'onde auxquelles elles sont utilisées.

Nom	Structure	Forme	Longueurs d'onde
Acide 2,5-dihydroxy-benzoïque		Solide	266, 337, 355 nm 2,94 μm, 10,6 μm
Acide sinapinique		Solide	266, 337, 355 nm 2,94 μm, 10,6 μm
Acide Nicotinique		Solide	266, 248 nm 2,94 μm, 10,6 μm
Acide α-cyano-4-hydroxycinnamique		Solide	337, 355 nm
Acide cafféique		Solide	266, 337, 355 nm 2,94 μm, 10,6 μm
Acide vanillique		Solide	266 nm 2,94 μm, 10,6 μm
Acide succinique	HOOC-CH ₂ -CH ₂ -COOH	Solide	2,94 μm, 10,6 μm

Tableau 2 : Liste des principales matrices utilisées en MALDI.

Les critères de choix d'une "bonne" matrice sont multiples. En effet, cette dernière doit :

- ✓ favoriser la séparation des molécules cibles les unes des autres. La matrice est présente en gros excès et sert donc "d'agent dispersant". De ce fait, les forces intermoléculaires sont réduites,
- ✓ être soluble dans des solvants compatibles avec ceux utilisés pour les molécules cibles. Ce critère de choix est parfois très limitant, notamment pour les polymères synthétiques qui sont souvent difficiles à solubiliser,
- ✓ être inerte chimiquement vis à vis des molécules cibles : l'intégralité de ces dernières doit être préservée,
- ✓ permettre une "co-cristallisation" de la molécule cible : la capacité d'une matrice à former une "solution solide" avec les molécules cibles (après évaporation du solvant utilisé pour la préparation), est essentielle,
- ✓ avoir un coefficient d'extinction molaire élevé ($\epsilon > 10^3 \text{ l.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$) pour absorber préférentiellement à la longueur d'onde laser incidente. Ce paramètre est difficilement quantifiable (si on ne dispose pas d'un spectrophotomètre en réflexion diffuse) en raison des déplacements du maximum d'absorption constatés entre les solutions (utilisées pour faire les mesures) et l'état solide (caractéristique des échantillons MALDI),
- ✓ permettre la formation de liaisons hydrogènes intermoléculaires favorisant les transferts d'énergie au sein de l'échantillon,
- ✓ favoriser l'ionisation en induisant notamment des transferts de protons de la matrice vers les molécules cibles.

1.3.1.3 Préparation des échantillons

De nombreux paramètres interviennent au cours des différentes étapes qui constituent une analyse MALDI. L'une des étapes les plus importantes est la préparation des échantillons. En effet, la qualité du dépôt va conditionner l'ensemble des résultats obtenus.

Typiquement, la préparation des échantillons se fait en mélangeant quelques μl d'une solution 10^{-6} M de la molécule cible dans un solvant (compatible avec celui de la matrice) et un même volume d'une solution de matrice à une concentration comprise entre 10^{-3} M et la saturation. Le rapport molaire molécule cible/matrice est compris entre 1/100 et 1/100000

[15]. Quelques μl de la solution ainsi obtenue sont ensuite déposés sur un porte-échantillon en métal inerte et séchés soit sous vide soit en appliquant un léger courant d'air tiède. Dans la plupart des cas, les dépôts obtenus sont inhomogènes [16]. Cette dernière caractéristique explique la variation des résultats d'un impact à l'autre.

Il existe maintenant un certain nombre de variantes en ce qui concerne la préparation des échantillons. La plus connue est certainement celle proposée par Roepstorff et Col. [17] qui consiste à déposer séparément la matrice et la molécule cible. Classiquement on utilise une solution saturée d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique dans l'acétone. On dépose quelques μl de cette solution sur le porte-échantillon et on évapore très rapidement le solvant. On obtient un dépôt très homogène composé de petites sphérules de 1 à 5 μm de diamètre. La molécule cible est quant à elle solubilisée dans de l'eau, 0,1 % d'acide trifluoroacétique (TFA¹⁷). On dépose 1 μl de cette solution sur le dépôt obtenu précédemment. La matrice utilisée présente la particularité de n'être que faiblement soluble dans l'eau. De ce fait, il n'y a qu'une faible redissolution de la matrice en extrême surface. L'avantage d'une telle technique est de permettre des lavages d'échantillon limitant ainsi la contamination par les sels et donc une amélioration de la résolution des spectres (peu de pics de cationisation).

La plupart des matrices sont solides après évaporation du solvant et, à quelques exceptions près, forment un réseau de microcristaux plus ou moins régulier. La structure du dépôt obtenu dépend de la cristallisation. De nombreux paramètres interviennent à ce stade tels que : la matrice, le solvant, la rugosité du porte échantillon ou la vitesse d'évaporation du solvant. La capacité des grosses molécules à s'insérer de façon homogène dans les cristaux de matrice fut une des surprises observée lors de l'étude de la co-cristallisation des échantillons MALDI [18,19].

L'obtention d'une "solution solide" homogène de molécules cibles dans la matrice est indispensable pour obtenir un résultat reproductible [20].

Le choix judicieux du solvant est également un facteur de réussite lors de ce type d'analyses. Il dépend essentiellement du type de molécule cible. Pour la plupart des biopolymères, on utilise un mélange eau / 0,1% TFA (voir dans certains cas eau pure) ou eau / solvant organique (alcool ou acétonitrile essentiellement). Pour les autres molécules (polymères synthétiques, ...) le choix n'est pas toujours facile et il ne dépend que de la molécule cible. Plusieurs exemples illustreront ce problème dans les chapitres ultérieurs.

17

TFA Trifluoroacetic acid

1.3.2 Mécanismes du MALDI

La technique MALDI a jusque là plutôt été développée de façon empirique. Cependant l'obtention de résultats toujours meilleurs (plus hautes masses, meilleure résolution, ...) nécessite une bonne compréhension des mécanismes impliqués.

De nombreuses expériences ont été réalisées pour caractériser chacun des paramètres essentiels du MALDI. On a notamment étudié les effets de l'irradiance [21,22], de la longueur d'onde [22] et de la durée de l'impulsion laser [23] sur le rendement d'ions. Il a été observé que de bons résultats étaient obtenus uniquement dans une gamme d'irradiances très étroite supérieure ou égale au seuil de formation des ions qui est typiquement de 10^6 à 10^7 W/cm² selon la longueur d'onde et l'échantillon analysé [24].

Bien qu'il ait été démontré qu'un certain nombre de composés de différentes classes chimiques (acides, bases...) constituent des matrices convenables pour la MALDI, une grande incertitude persiste quant au(x) rôle(s) possible(s) de la matrice. Les propriétés d'une "bonne" matrice évoquées précédemment sont basées principalement sur l'expérience pratique.

Les mécanismes d'interaction entre la molécule cible et la matrice, que ce soit à l'état solide, liquide, ou en phase gazeuse, sont très mal compris. Toutefois, des facteurs tels que la morphologie de l'échantillon [25] et la co-cristallisation moléculaire [20] ont été soulignés comme étant importants pour l'obtention de bons résultats.

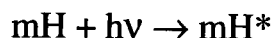
Deux problèmes mécanistiques essentiels restent posés :

- ✓ le premier est la conversion des molécules d'échantillon de la phase condensée à la phase gazeuse (processus de désorption),
- ✓ le deuxième est le passage des molécules désorbées à l'état ionique (processus d'ionisation).

Bien que plusieurs modèles aient été proposés pour décrire les processus de désorption [26,27] et d'ionisation [28,29,30], de nombreuses questions sur le mécanisme et de formation des ions restent sans réponse.

L'une des hypothèses concernant le mécanisme MALDI (la plus communément admise) est décrite ci-après ; on désignera les molécules de matrice par mH (notation indiquant la présence d'un atome d'hydrogène labile dans la molécule) et les molécules cibles par M.

Sous l'effet d'une impulsion laser, les molécules de matrice sont excitées électroniquement par absorption de photons :

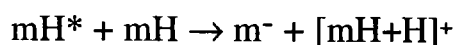
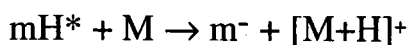


Les molécules excitées mH^* produites possèdent un excès d'énergie qu'elles redistribuent ensuite soit en subissant des fragmentations soit par transfert d'énergie vibrationnelle aux molécules cibles et de matrice environnantes.

Il s'ensuit une transition de phase instantanée d'un petit volume (quelques couches moléculaires) de l'échantillon au cours de laquelle il y a co-éjection de molécules de matrice intactes ou fragmentées et de molécules cibles intactes sous forme gazeuse.

Le gaz très dense résultant de cette éjection de matière subit ensuite une expansion adiabatique dans le vide sous forme d'un jet supersonique.

L'ionisation des molécules cibles est supposée intervenir dans ce gaz en expansion et peut être décrite en terme de réaction acide/base [30]. Les molécules de matrice excitées mH^* agissent comme des acides, transférant des protons aux molécules cibles ou à celles de la matrice environnantes. Sous l'effet du faisceau laser, il y a déprotonation de certaines molécules de matrice pour former l'espèce m^- . Les protons ainsi libérés peuvent réagir sur les molécules cibles pour donner les espèces pseudo-moléculaires de type $(M+H)^+$:



Un tel processus est également susceptible d'intervenir à l'état solide, juste après l'impact laser, ou encore dans le gaz dense éjecté avant son expansion, lorsque le nombre de molécules mH^* présentes est le plus élevé. Jusqu'ici, il n'a pas été prouvé de façon certaine à quel moment exact l'ionisation intervient.

1.3.3 Les avantages du MALDI

Les avantages de la technique MALDI couplée à la spectrométrie de masse sont :

- ✓ des temps d'analyse relativement courts : une analyse nécessite environ **30 minutes en incluant le temps de préparation de l'échantillon** et le temps de pompage de la chambre d'échantillonnage du spectromètre de masse,
- ✓ une grande sensibilité : la quantité d'échantillon nécessaire pour une analyse est inférieure à la picomole (quantité déposée sur le porte-échantillon),
- ✓ sa capacité à analyser des mélanges liée à la faible influence des propriétés physicochimiques des molécules étudiées,
- ✓ une tolérance relativement élevée envers des contaminants organiques ou inorganiques tels que des sels ou des tampons, lesquels sont souvent utilisés pour la préparation et la stabilisation des molécules biologiques,
- ✓ une large gamme de masses accessible pouvant aller jusqu'à 300 000 u en standard [31],
- ✓ une tendance à produire des ions à nombre pair d'électrons tels que des molécules protonées et/ou cationisées intactes du type $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, et $[M+K]^+$, qui fournissent des données facilement interprétables en permettant d'accéder directement à la masse moléculaire du composé analysé.

1.4 L'electrospray (ES)

La spectrométrie de masse électrospray (ES), comme le MALDI, a connu un important développement depuis maintenant dix ans. La perspective de son utilisation dans de nombreux domaines nécessite la compréhension du mécanisme par lequel les ions sont générés en phase gazeuse à partir des ions en solution.

1.4.1 Description du processus de désorption/ionisation ES

L'ionisation-désorption ES a été introduite en spectrométrie de masse par Yamashita et Fenn en 1984 [32]. Cependant, ce procédé a déjà été énoncé depuis plus de deux siècles [33]. Les mécanismes de base de la formation du "spray" sous l'effet d'un fort champ électrique ont été décrits dans le livre de Bailey en 1988 [34]. Le mécanisme de production des ions en phase gazeuse à partir des ions en solution, point clé pour l'interprétation des études faites en spectrométrie de masse ES, n'est toujours pas très bien compris. L'état des connaissances sur l'émission des ions en phase gazeuse a été récemment décrit par Kebarle en 1993 [35].

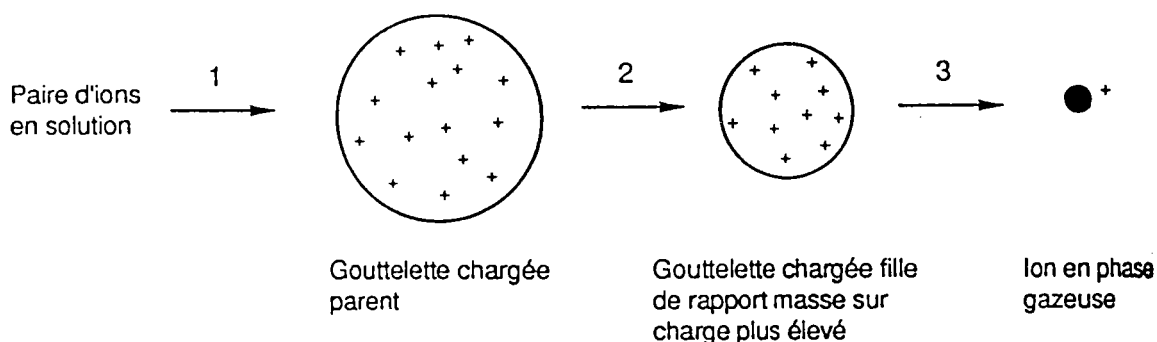


Figure 13. Description du mécanisme d'ionisation-désorption ES.

1. Production de gouttelettes chargées à partir d'un électrolyte en solution.
2. Fission des gouttelettes chargées mères par évaporation du solvant et explosions coulombiennes successives qui conduit à des gouttelettes filles très petites et très chargées.
3. Emission des ions en phase gazeuse à partir des gouttelettes filles.

Le processus d'ionisation-désorption ES se déroule à pression atmosphérique et peut se scinder en trois phases majeures (Figure 13) :

- ✓ la production de gouttelettes chargées (solvant + ions) à partir d'un électrolyte (paire "molécule chargée étudiée/contre-ion") solubilisé dans un solvant,
- ✓ la fission des gouttelettes chargées par évaporation du solvant qui conduit par une succession d'explosions coulombiennes à des gouttelettes filles très petites et très chargées capables de produire des ions en phase gazeuse,
- ✓ l'émission des ions en phase gazeuse à partir des gouttelettes filles.

1.4.2 La source ES

Le processus d'ionisation-désorption ES décrit précédemment se fait dans la partie du spectromètre de masse qui est à pression atmosphérique appelée source ES. Plusieurs types de sources ES ont été développés depuis celle de Fenn en 1985 [36]. La source ES présentée ci-dessous a été développée par la société VG BioTech (Figure 14).

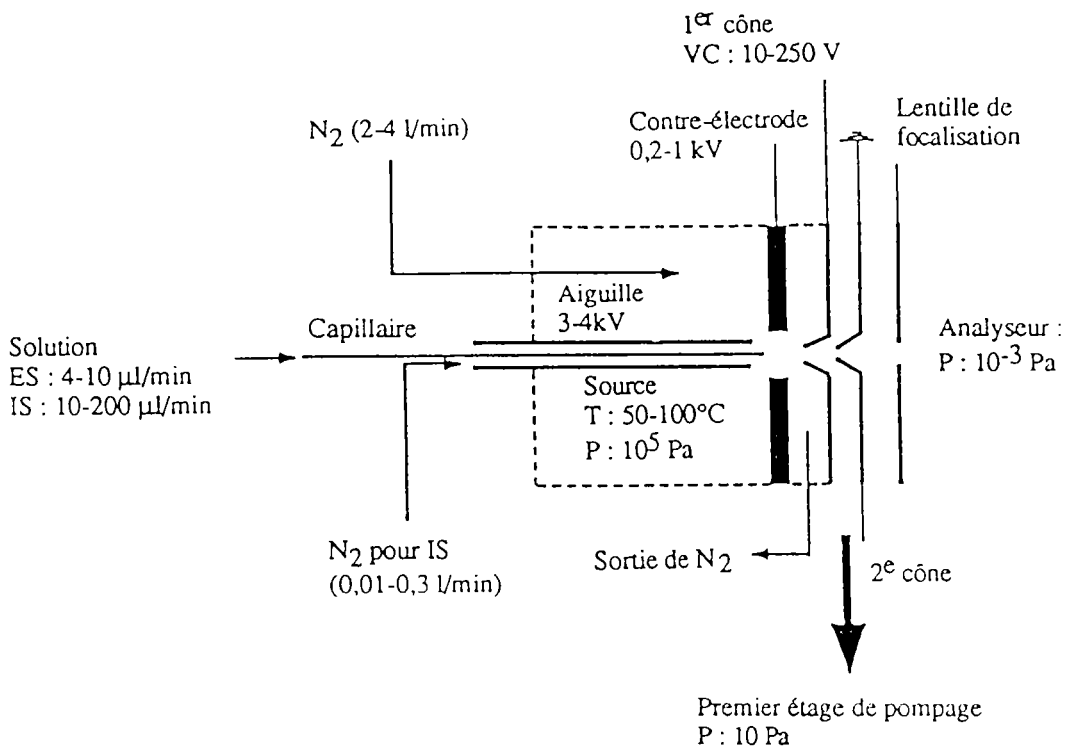


Figure 14. Schéma de la source ES développée par VG BioTech (Altringham, U.K.).

La solution contenant l'électrolyte étudié est introduite dans la source ES par l'intermédiaire d'un capillaire métallique (diamètre interne variant de 50 à 100 μm) à un débit de 4 à 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ (introduction directe). L'addition d'un flux d'azote coaxial au capillaire est nécessaire lorsque le débit est supérieur à 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, afin d'obtenir un "spray" stable. Dans ce cas on ne parlera plus d'ES mais d'ionspray (IS). L'émission des ions en phase gazeuse à partir des ions en solution est permise par l'application d'un champ électrique intense E entre l'extrémité du capillaire métallique (tension appliquée variant de 3 à 4 kV) et la contre-électrode (tension appliquée variant de 0,2 à 1 kV). Dans la source ES développée par VG BioTech, l'évaporation du solvant nécessaire à l'obtention d'ions en phase gazeuse est rendue possible par l'introduction d'un flux d'azote chaud (température variant de 50 à 100 $^{\circ}\text{C}$) dans la source ES.

Le transport et l'accélération des ions de la source ES (pression atmosphérique) vers l'analyseur de masses (pression = 10^{-3} Pa) sont obtenus grâce à la différence de potentiel appliquée entre le premier cône appelé "nozzle", "buse" en français, (tension appliquée : V_c appelée tension d'accélération des ions) et le deuxième cône appelé "skimmer" ou "écrémeur" en français, (lentille à la terre) et grâce au gradient de pression imposé par la géométrie de l'interface ES.

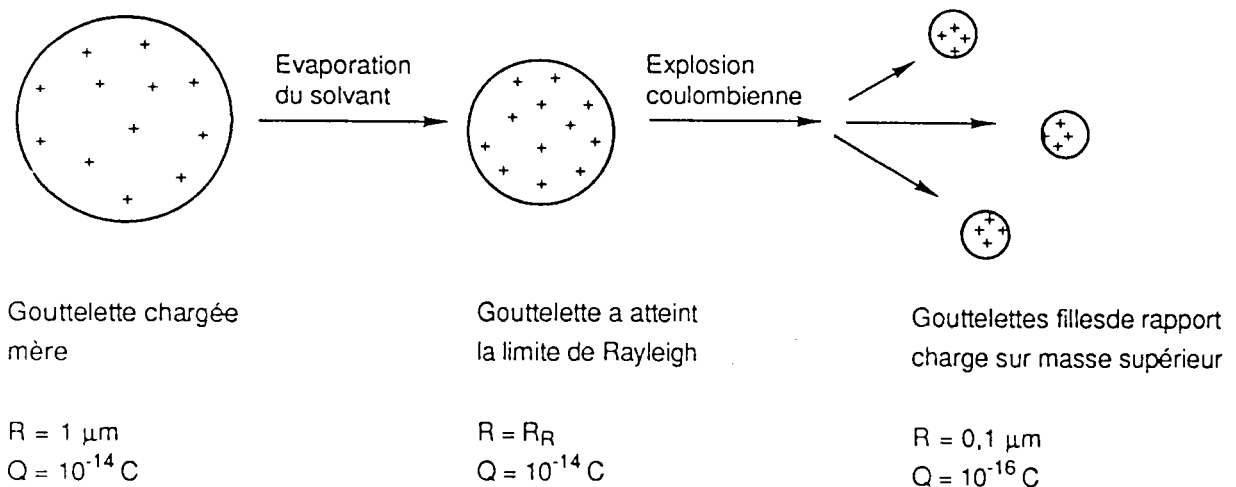


Figure 15. Rupture de la gouttelette chargée mère par évaporation du solvant et explosion coulombienne.

1.4.3 Performances et limitations

Les performances dépendent du type de séparateur d'ions utilisé. De nombreux couplages existent (quadripôle, analyseur à secteur magnétique, temps de vol, résonance cyclotronique des ions, ...) mais le plus couramment rencontré reste le quadripôle. Les performances et limitations

données ci-après correspondent à ce dernier cas.

Elles dépendent bien sûr de la géométrie (distance r_o entre les électrodes, longueur L du quadripôle,...) et des caractéristiques du quadripôle (tensions U_o et V_o , pulsation de la radiofréquence ω , pression dans l'analyseur,...) et sont les suivantes :

- ✓ résolution $R = 1000$,
- ✓ gamme de m/z : 0 - 4000.

Le couplage de la source ES avec un analyseur quadripolaire permet la mesure de masses moléculaires élevées (200 kDa)¹⁸ [37] avec des précisions de 0,01 % (sur la mesure de masses de l'ordre de 20 kDa) et des sensibilités de l'ordre de la picomole [38].

Les principales limitations de cette technique sont de deux types :

- ✓ la nécessité de pouvoir solubiliser les échantillons,
- ✓ la grande sensibilité envers les contaminants (sels, ...).

¹⁸ de telles masses sont accessibles si la molécule comportent de nombreux sites de protonation.

1.5 Bibliographie

- [1] The Laser Guidebook (Second edition)
J. Hecht . MC GRAW HILL
- [2] Principles of Lasers (Third edition)
O. Svelto. PLENUM
- [3] Hercules D.M, Day R.J, Balasanmugam K, Dang T.A, Li D.C.P, Anal Chem, 1982, **54**, 280A
- [4] Srinivasan R., Braren B., Chem. Rev., 1989, **89**, 1303
- [5] Muller J.F, Pelletier M, Krier G, Weil D, Campana J, Micribeam Analysis Ed. P.E. Russel, San Francisco Press, 1989, 311
- [6] Lazare S, Granier V, Laser Chem, 1989, **10**, 25
- [7] Phipps C.R, Dreyfus R.W, Ed Vertes A, Gijbels R, Adams F, J. Wiley & Sons, New York, 1993.
- [8] Vertes A, Juhasz P, De Wolf M, Gijbels R, Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc., 1989, **94**, 63.
- [9] Kupka K.D, Hillenkamp F, Schiller C, Advances in Mass Spectrometry, Heyden & Sons : London 1980, 8A, 935.
- [10] Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 1987, **78**, 53.
- [11] Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida S, Yoshida T, Rapid Commun. Mass Spectrom, 1988, **2**, 151.
- [12] Sheng L.S, Shew, S.L, Winger B.E, Campana J.E, American Chemical Society Symposium Series, American Chemical Society: Washington, D.C, 1994.
- [13] Chambers D.M, Goeringer D.E, McLuckey S.A, Glish G.L, Anal Chem, 1993, **65**, 14.
- [14] Castro J.A, Koster C, Wilkins C, Rapid Commun Mass Spectrom, 1992, **6**, 239.
- [15] Bolbach G, Riahi K, Spiro M, Brunot A, Breton F, Blais J.C, Analisis, 1993, **21**, 10
- [16] Blais J.C, Bolbach G, Riahi K, Spiro M, Brunot A, Breton F, J. chim Phys, 1993, **90**, 1399
- [17] Vorn O., Roepstorff P., Mann M., Anal. Chem., 1994, **66**, 3281
- [18] Strupat K, Karas M, Hillenkamp F, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 1991, **111**, 89.

- [19] Bridson J.N, Beavis R.C, J. Phys-D, 1993, **26**, 442.
- [20] Bahr U, Karas M, Hillenkamp F, Fresenius J. Anal. Chem, 1994, **348**, 783.
- [21] Ens W, Mao Y, Mayer F, Standing K, Rapid Commun. Mass Spectrom, 1991, **5**, 177.
- [22] Overberg A, Karas M, Bahr U, Kaufmann R, Hillenkamp F, Rapid Commun. Mass Spectrom, 1990, **4**, 293.
- [23] Demirev P, Westman A, Reimann C.T, Hakansson P, Barofsky D, Sundqvist B.U.R, Cheng Y.D, Seibt W, Siegbahn K, Rapid Commun. Mass Spectrom. 1992, **6**, 187.
- [24] Hillenkamp F, Biological Mass Spectrometry : *Present and Future*, Edited by Matsuo T, Caprioli R.M, Gross M.L, Seyama Y, John Wiley Sons Ltd. 1994, 101.
- [25] Westman A, Huth-Fehre T, Demirev P, Sundqvist B.U.R, J. Mass Spectrom, 1995, **30**, 206.
- [26] Vertes A, Levine R.D, Chem. Physics Letters, 1990, **171**, 284.
- [27] Johnson R.E, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 1994, **139**, 25.
- [28] Gimon M.E, Preston L.M, Solouki T, White M.A, Russell D.H, Org. Mass Spectrom, 1992, **27**, 827.
- [24] Wang B.H, Dreisewerd K, Bahr U, Karas M, Hillenkamp F, J. Am. Soc. Mass Spectrom, 1993, **4**, 393.
- [30] Liao P.C, Allison J, J. Mass Spectrom, 1995, **30**, 408.
- [31] Karas M, Bahr U, Ingendoh A, Nordhoff B, Stahl K, Strupat K, Hillenkamp F, Anal. Chim. Acta, 1990, **241**, 175.
- [32] Yamashita M, Fenn J.B, Phys chem, 1984, **88**, 4451.
- [33] Bose G.M, Recherche sur la cause et sur la véritable théorie de l'électricité, Wittenberg 1745.
- [34] Kebarle P, Tang L, Anal Chem, 1993, **65**, 972A.
- [35] Taylor G.I, Proc. R. Soc London A 1964, **A280**, 383.
- [36] Whitehouse C.M, Dreyer R.N, Yamashita M, Fenn J.B, Anal Chem, 1985, **57**, 675.
- [37] Feng R, Konoshi Y, Anal Chem, 1992, **64**, 2090.
- [38] Van Dorsselaer A, Bitsch F, Green B, Jarvis S, Lepage P, Bischoff R, Kolbe H.VJ, Roitsh. C, Biomed Environ Mass Spectrom, 1990, **19**, 692.

2. Les techniques de séparation des ions

Nous disposons au laboratoire de deux spectromètres de masse couplés à la désorption/ionisation laser :

- ✓ le LAMMA³⁷ qui utilise comme analyseur le temps de vol des ions,
- ✓ le FTMS³⁸ qui utilise comme analyseur la résonance cyclotronique des ions.

Notre étude s'est essentiellement effectuée non pas sur spectromètre de masse à temps de vol (TOFMS), comme la plupart des analyses MALDI, mais sur un spectromètre à résonance cyclotronique des ions et à transformée de Fourier de type FTMS 2000³⁹ pour plusieurs raisons [39] :

- ✓ l'appareillage FTMS présente une configuration en réflexion alors que le spectromètre de masse à temps de vol LAMMA 500 est en transmission. Dans ce dernier cas, le faisceau laser incident traverse l'intégralité de l'échantillon ; il faut alors fournir une énergie suffisamment importante pour percer le film polymérique. Par contre,

³⁷ LAMMA : LAsEr Microprobe Mass Analysis

³⁸ FTMS : Fourier Transform Mass Spectrometry

³⁹ FTMS 2000 (Extrel FTMS-Waters) modifiée par le laboratoire (Brevet n° ...)

dans le cas de la réflexion, ce facteur n'existant pas, on peut ajuster (en défocalisant le faisceau laser incident) l'énergie fournie à la matrice pour se situer dans des conditions optimales de désorption. Ceci permet d'augmenter le rendement d'ionisation des molécules et de favoriser l'expansion du plasma,

- ✓ la configuration optique nous permet de connaître, en fonction de la focalisation du laser, la valeur de l'énergie déposée sur l'échantillon,
- ✓ l'appareil permet de sélectionner dans la cellule d'analyse un ou plusieurs ions privilégiés que l'on peut étudier en détail (haute résolution, ...),
- ✓ la FTMS, de par ses caractéristiques, ne permet pas l'étude de molécules de hautes masses (masse moléculaire > 4000 uma).

La microsonde laser FTMS a déjà été utilisée au Laboratoire pour l'étude de l'ablation des polymères (PET) [40] et de la désorption des molécules organiques (exemple : amiodarone) [41].

La microsonde FTMS apparaît être une technique très adaptée à la caractérisation des polymères et des molécules à caractère biologique grâce à sa haute résolution⁴⁰, sa possibilité d'ioniser à différentes longueurs d'onde⁴¹, à diverses irradiances⁴² ainsi que le contrôle possible de la profondeur d'ablation.

⁴⁰ la résolution varie en fonction du produit étudié (stabilité dans le temps des ions qui en sont issus) et de sa masse (la résolution diminue quand la masse augmente).

⁴¹ l'optique dont nous disposons au laboratoire a été étudiée pour des longueurs d'onde variant entre 190 et 360 nm.

⁴² l'irradiance varie entre 10^5 à 10^{10} W/cm².

2.1 La spectrométrie de masse à Transformée de Fourier

C'est une technique d'analyse dont le principe repose sur la détermination des masses ioniques par mesure des fréquences cyclotroniques engendrées par un champ magnétique. Ce type de spectromètre a été développé ces dernières années par Marshall et Comisarow [42]. Il n'existe en France qu'une seule microsonde laser FTMS, puisque l'instrument initial, le FTMS 2000 qui permettait de travailler en impact électronique a été modifié en microsonde à impact laser par Muller et coll [43-45] dont nous allons brièvement exposer les caractéristiques techniques :

2.1.1 Principe [46-49]

Lorsqu'un ion est soumis à un champ magnétique uniforme, il adopte une trajectoire circulaire perpendiculaire à la direction de ce champ magnétique (figure 16).

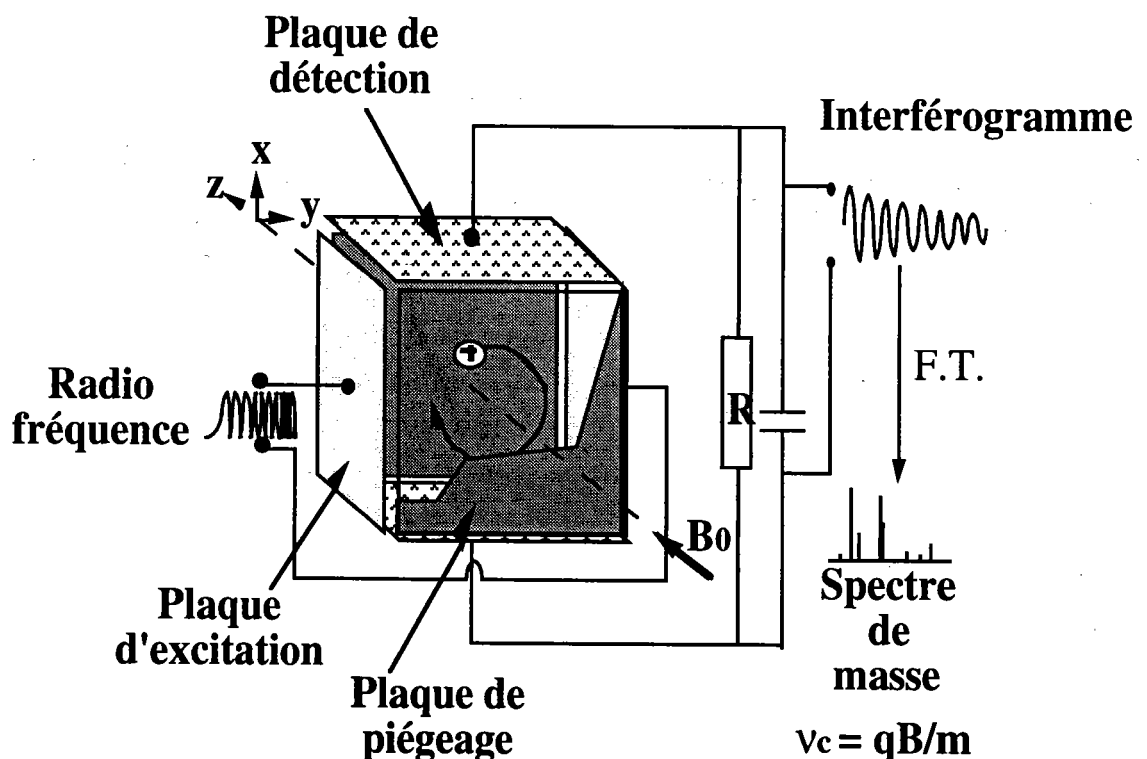


Figure 16. Mouvement d'un ion soumis à un champ magnétique uniforme

La trajectoire circulaire résulte de l'action d'une force L , dénommée force de Lorentz, due à l'action du champ magnétique sur les ions. Elle agit perpendiculairement à la direction du mouvement de l'ion (direction du vecteur v) et à la direction du champ magnétique B .

Cette force de Lorentz a pour expression :

$$L = q \cdot v \cdot B$$

avec: q = charge de l'ion (C)
 v = vitesse de l'ion ($m \cdot s^{-1}$)
 B = force du champ magnétique (T)

L'ion formé, lors de l'irradiation laser, se trouve à l'intérieur d'une cellule cubique, et sous l'effet du champ magnétique statique intense l'ion piégé adopte une trajectoire circulaire et donc une force centrifuge F qui a pour expression :

$$F = \frac{mv^2}{R}$$

avec : m = masse de l'ion (Kg)
 R = rayon de la trajectoire circulaire (m)

Le système, formé par l'ion en mouvement circulaire, est en équilibre parce que la force qu'exerce le champ magnétique sur cet ion est compensée par la force centrifuge [50]. Nous avons donc l'égalité :

$$F = L$$

d'où :

$$q \cdot v \cdot B = \frac{mv^2}{R}$$

ce qui nous donne la vitesse angulaire ω_c du mouvement circulaire de l'ion :

$$\omega_c = \frac{v}{R} = \frac{q \cdot B}{m}$$

La fréquence ν du mouvement de l'ion est appelée *fréquence cyclotronique naturelle*;

elle a pour expression :

$$\nu_c = \frac{\omega_c}{2\pi} \quad \Rightarrow \quad \nu_c = \frac{1}{2\pi} \times \frac{q \cdot B}{m} \quad (1)$$

L'équation (1) nous montre qu'un ensemble d'ions de masses différentes sera caractérisé par un ensemble de fréquences cyclotroniques

La mesure des fréquences cyclotroniques s'effectue en deux étapes :

- ✓ excitation du mouvement cyclotronique
- ✓ détection du mouvement cyclotronique excité

2.1.1.1 Excitation du mouvement cyclotronique

Tous les ions soumis à un champ magnétique uniforme se déplacent selon leurs fréquences cyclotroniques. Ce mouvement d'ensemble est un mouvement désordonné (chaque ion a sa propre trajectoire).

Pour détecter ces ions, il faut que leur mouvement orbital devienne cohérent de manière à ce que des ions de même masse aient la même trajectoire : ceci est réalisé en appliquant un balayage en fréquence très rapide.

Ce balayage en fréquence couvre toutes les fréquences cyclotroniques des ions : il va de quelques KHz à quelques MHz pour un champ de 3 Teslas (correspondant à une gamme de masse allant de 17 à 5000 uma).

Quand la fréquence appliquée est égale à la fréquence cyclotronique d'un ion de masse donnée, l'ion absorbe de l'énergie. Son énergie cinétique E_k augmente par un processus de transfert d'énergie. Elle a pour expression :

$$E_k = \frac{1}{2}mv^2 = m \cdot \omega_c^2 \cdot R^2$$

Cette augmentation d'énergie cinétique se traduit donc par une augmentation du rayon R de la trajectoire de l'ion .

Après un très court temps d'interaction avec la fréquence responsable de ce phénomène, tous les ions d'une même masse sont en phase et ont la même trajectoire : leur mouvement est donc devenu cohérent et un signal peut alors être détecté.

Ce phénomène de transfert d'énergie est appelé Résonance Cyclotronique Ionique (ICR⁴³). Il peut être utilisé pour accélérer les ions ou n'importe quelle particule chargée .

Quand la résonance cyclotronique a pour but d'accélérer des particules, l'équipement utilisé est un cyclotron. Quand elle a pour but de déterminer la masse des ions, l'équipement utilisé est un spectromètre de masse à résonance ionique cyclotronique (FT ICR MS) [51].

2.1.1.2 Détection du mouvement cyclotronique cohérent

Les ions, animés d'un mouvement orbital cohérent, sont confinés entre les deux plaques d'une capacité[52].

Les ions positifs par exemple, approchant une de ces deux plaques, attirent les électrons. Continuant à se déplacer sur leur trajectoire, ils se rapprochent de la seconde plaque, opposée à la première, et attirent également les électrons sur cette surface : il y a alors création d'un courant alternatif (figure 17) :

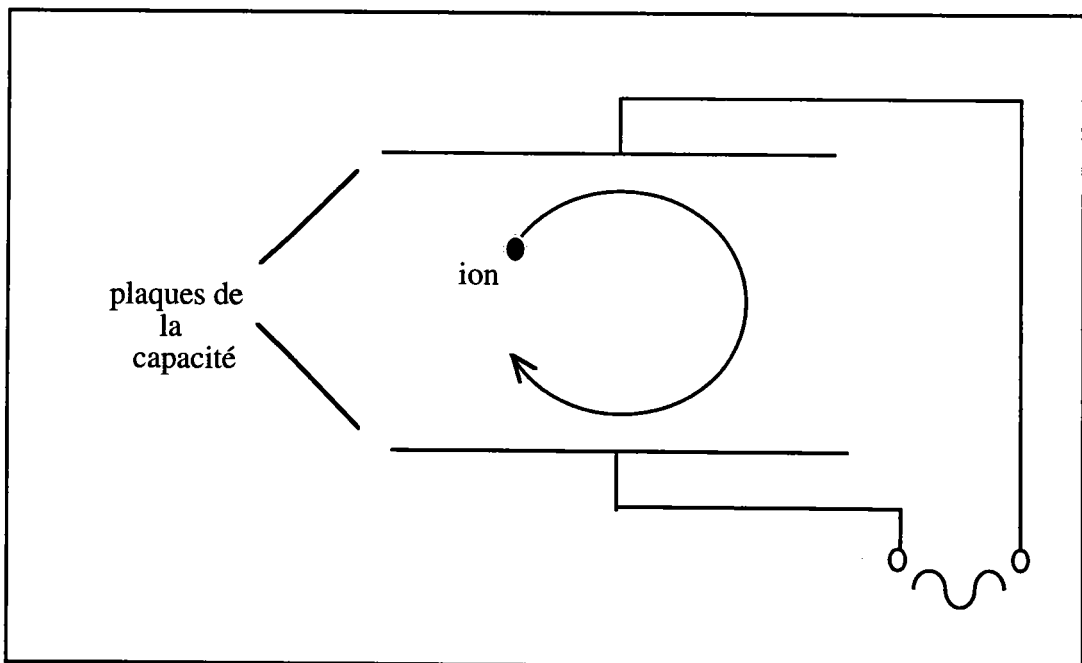


Figure 17. Principe de détection des ions. Les deux plaques sont connectées à un circuit électrique qui permet la détection d'un courant alternatif sous une forme temporelle.

Dans la pratique, le courant alternatif est converti en tension alternative $V(t)$ selon la relation :

$$V(t) = \frac{N \cdot q \cdot R}{d \cdot C \cdot \cos(\omega_c \cdot t)}$$

N = nombre d'ions de masse m détectés

q = charge des ions (C)

R = rayon de l'orbite circulaire des ions (m)

d = distance séparant les deux plaques de la capacité (m)

C = valeur de la capacité

ω_c = vitesse angulaire des ions ($\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$)

t = temps de mesure (s)

Tous les ions de masse m donnée induisent une tension alternative $V_m(t)$. Un signal composite est ainsi obtenu, et a pour expression :

$$V(t) = \sum_m V_M \cdot \cos(\omega_c \cdot t)$$

La transformée de Fourier permet de convertir ce signal dépendant du temps en un signal fonction de la fréquence. Chaque fréquence est ensuite associée à une masse par calibration. Le résultat obtenu est un spectre de masse qui porte en ordonnée la tension du signal et en abscisse la masse des ions détectés. Ce type d'analyse est appelé mode direct ou large bande. Il permet une résolution en masse de 100 à 5000 environ. Pour augmenter considérablement cette résolution, il faut utiliser le mode hétérodyne : l'analyse s'effectue alors sur une plage réduite de masses. Grâce à l'addition et à la soustraction d'un signal sinusoïdal de référence ayant une fréquence proche de celle de la plage de masse étudiée, et après un filtrage adéquat et une transformée de Fourier, on obtient des résolutions en masse allant de 10 000 à 1000 000..

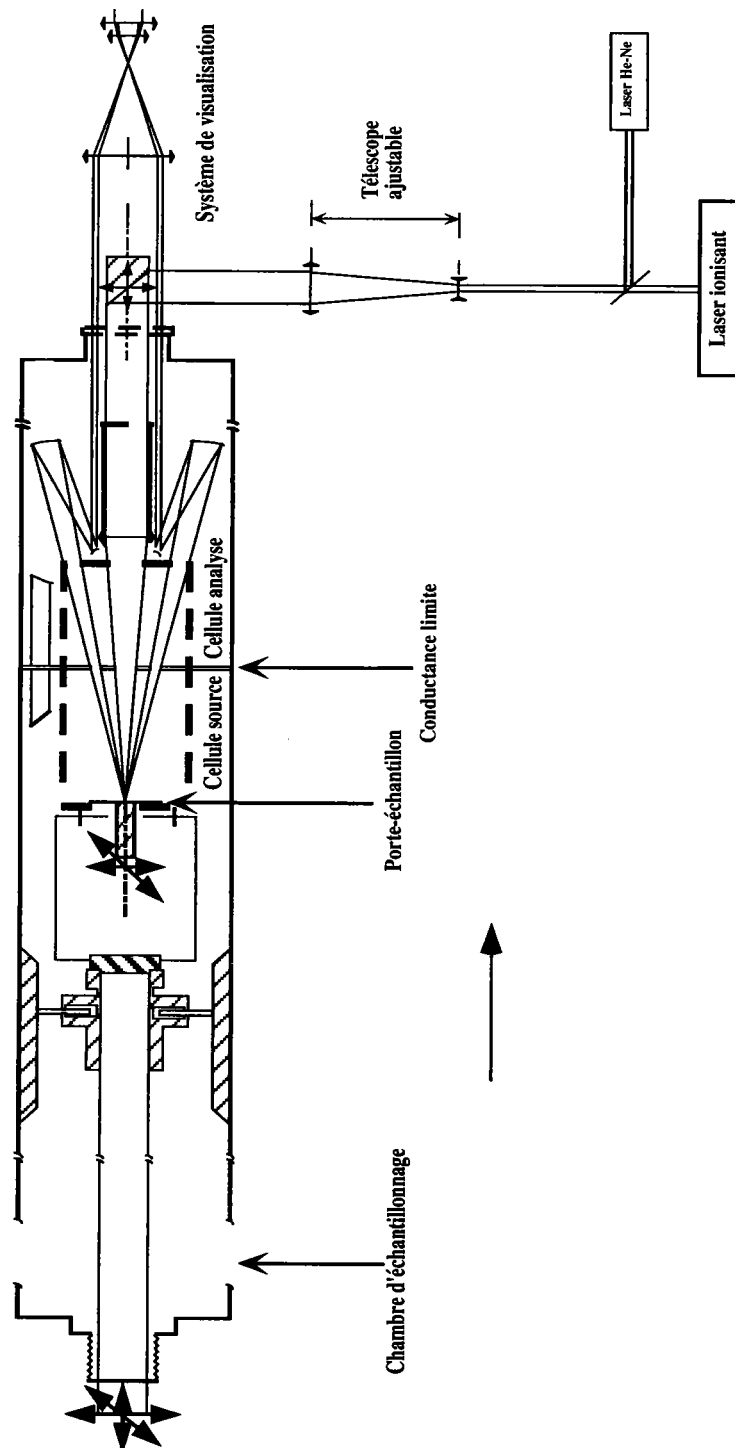


Figure 18. Schéma descriptif de la microsonde FTMS 2000 développée au LSMCL

2.1.2 Descriptif expérimental

La microsonde laser FTMS dont nous disposons au laboratoire (figure 18) est un prototype conçu et réalisé à l'Université de Metz en liaison avec la société NICOLET à partir d'un spectromètre FTMS 2000 à double cellule. Outre l'aimant cryogénique, l'électronique et l'ordinateur de traitement du signal d'origine, ce prototype comporte les éléments originaux suivants : une nouvelle platine optique, une optique de focalisation et de visualisation, une double cellule modifiée ainsi qu'un micromanipulateur insensible au champ magnétique. Nous allons détailler brièvement ces différents éléments.

2.1.2.1 Le champ magnétique

La double cellule "Source-Analyse" est placée dans une enceinte sous vide (10^{-8} - 10^{-9} torr). Le tout se situe dans le champ magnétique d'un aimant supraconducteur. Le bobinage de l'aimant est maintenu à 4 Kelvin par trois enceintes cryogéniques contenant la première de l'hélium liquide, les deux dernières de l'azote liquide. Ceci permet d'obtenir un champ magnétique uniforme qui, dans notre cas, est égal à 3,18 teslas.

2.1.2.2 La cellule

La cellule est constituée en réalité de deux parties : une cellule source et une cellule analyse. Elles sont séparées par une paroi de séparation appelée "conductance limite" 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.

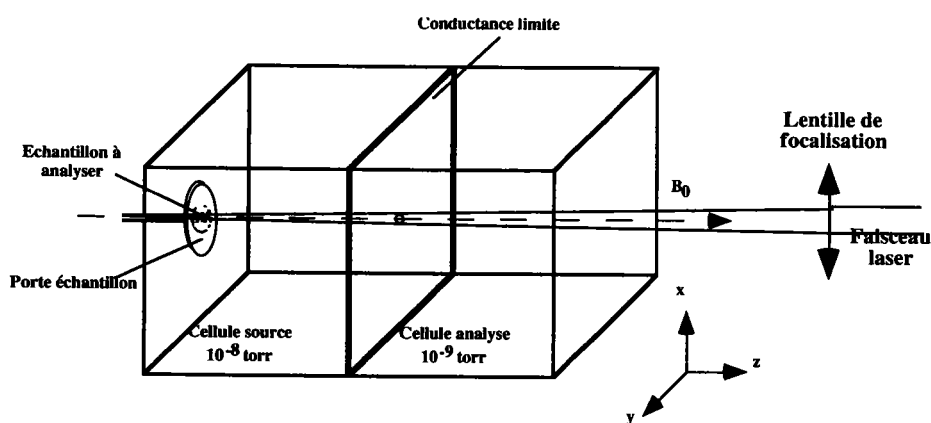


Figure 19. Schéma de principe de la cellule du FTMS

La cellule est en réalité un parallélépipède rectangle délimité par trois paires de plaques isolées électriquement les unes des autres et montées ensemble (figure 19).

Chaque paire a une fonction particulière :

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

2.1.2.3 Séquence expérimentale

Les événements suivants surviennent pendant la séquence expérimentale (figure 20)

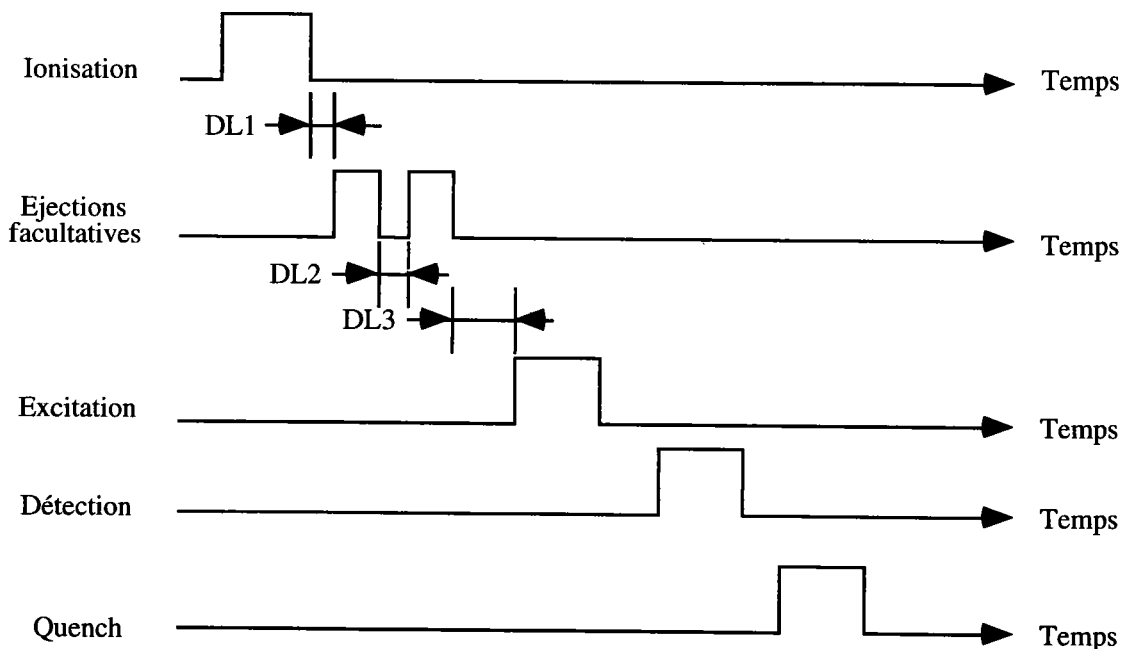


Figure 20. Séquence d'analyse

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 de l'échantillon dans la cellule source.

Pendant cet événement, 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 obtenir une répartition homogène des ions entre les deux cellules.

Une période d'attente variable (notée DL3) peut être instaurée entre l'ionisation et l'excitation des ions. Elle permet l'obtention de réactions ion-molécule. Parallèlement, des balayages de fréquences appropriées permettent d'éjecter des ions majoritaires gênants afin d'augmenter les signaux d'ions minoritaires (notés EJT1 et 2).

On peut améliorer la sélectivité des éjections ou des excitations à l'aide de la technique dite "SWIFT⁴⁴". La génération d'un signal ICR détectable nécessite que les ions soient excités de façon cohérente jusqu'à un rayon cyclotron suffisamment grand (environ 0,5 cm) dans un temps très court (environ 10-100 ns à 10^{-8} torr) comparé à la fréquence de collision ion/neutre. Initialement, les expériences FT-ICR étaient réalisées avec une impulsion rectangulaire de radio-fréquence. L'excitation par impulsion est non linéaire en amplitude, en particulier pour les hautes fréquences (c.à.d les basses masses). De plus, la couverture d'une large gamme de masse nécessite une impulsion très courte d'une amplitude très forte, et l'excitation n'est pas sélective. Il peut être utile de changer la forme de la fonction d'excitation, mais la plupart des utilisateurs ont, jusqu'à récemment, préféré l'excitation par balayage de fréquence (Sweep) pour son effet plus uniforme et sélectif à des amplitudes relativement basses.

En 1985, Marshall et al. [52] ont introduit une nouvelle forme d'onde d'excitation plus générale basée sur la transformée de Fourier inverse d'une forme d'onde prédéfinie (SWIFT).

L'excitation SWIFT permet une excitation optimalement uniforme, avec une sélectivité en masse optimale, sur une large gamme de masse dès que la forme d'onde est générée avec une précision de conversion analogique-digitale de 12 bits par mot.

L'excitation SWIFT peut être utilisée pour élargir la gamme dynamique du FTMS par éjection sélective d'ions abondants de m/z différents ou encore par éjection hautement sélective pour la MS-MS. L'amélioration majeure de l'excitation SWIFT est l'utilisation de la modulation de phase quadratique qui permet de réduire l'amplitude de la forme d'onde d'excitation temporelle.

44

SWIFT : Stored Waveform Inverse Fourier Transform

Comme illustré figure 21, les applications que permet le SWIFT sont :

- ✓ le suivi de multiples ions,
- ✓ les éjections multiples,
- ✓ l'éjection de certains ions et détection simultanée d'autres ions,
- ✓ la meilleure précision des mesures d'abondances relatives,
- ✓ la possibilité d'une analyse MS/MS avec haute résolution sur les deux niveaux.

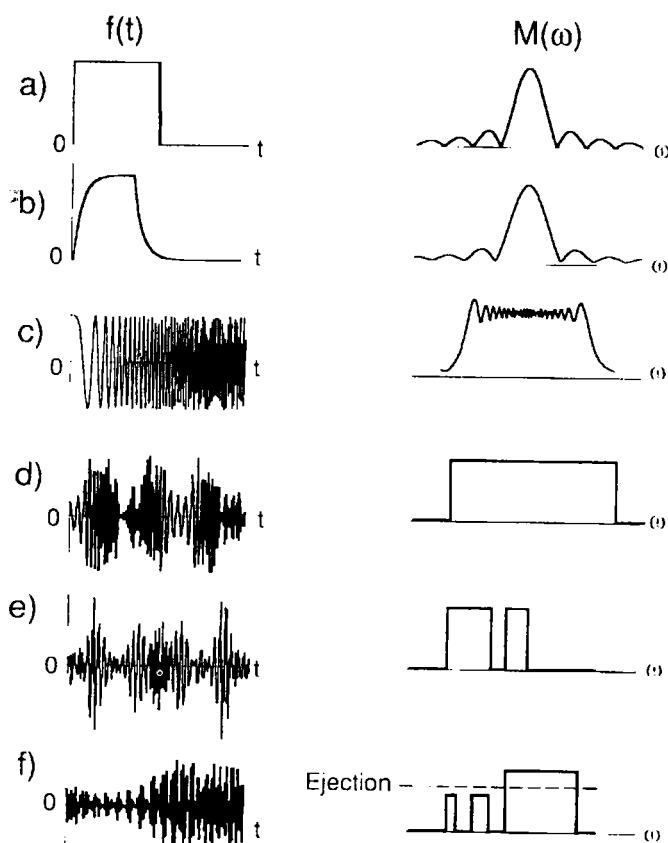


Figure 21. Applications de la technique SWIFT d'après [52]

Le tout avec une résolution maximale et une excitation la plus plate possible pour une période d'excitation donnée.

Les ions (restants) sont excités par un balayage de fréquence (ITX) puis détectés (TRX). Le signal sinusoïdal obtenu est amplifié, digitalisé et enfin, traité par transformée de Fourier pour obtenir le spectre de masse.

2.1.2.4 Le dispositif laser

Trois types de lasers sont couplés (au laboratoire) sur la microsonde FTMS 2000 :

- ✓ un laser excimère pour ioniser l'échantillon : 193 nm (mélange gazeux : ArF) et 249 nm (mélange gazeux : KrF),
- ✓ un laser Nd/Yag pour ioniser l'échantillon : 266 nm (Nd/Yag quadruplet) et 355 nm (Nd/Yag triplet),
- ✓ un laser He-Ne pour piloter les lasers de puissance sur la zone d'échantillon à analyser.

Le laser est focalisé perpendiculairement à la surface de l'échantillon (diamètre minimum au plan focal = 4 μm). Il fonctionne en mode impulsif (durée de l'impulsion laser = 25 ns pour le laser excimère et 5 ns pour le laser Nd/Yag). Il est possible de faire varier l'irradiance entre 10^5 W/cm^2 et 10^{10} W/cm^2 .

2.1.2.5 Visualisation et déplacement de l'échantillon

La visualisation de l'échantillon est réalisée par une optique Cassegrain inversée, derrière laquelle sont montés un télescope, une caméra CCD et un écran moniteur noir et blanc qui permet d'atteindre un grossissement de 300.

La focalisation du faisceau laser est réalisée par une lentille de focale égale à 120 mm. L'exploration complète de la surface de l'échantillon est assurée par un micromanipulateur à effet Peletier. Deux lames élaborées, dans un alliage à mémoire de forme, sont placées en opposition. Elles permettent le déplacement de l'axe du porte-échantillon dans une direction de l'espace. L'une d'elles est chauffée, alors que l'autre est refroidie. Lorsque l'on arrête toute sollicitation de ces lames, elles reviennent à leur position initiale.

2.1.3 Performances et limites de la microsonde laser FTMS .

2.1.3.1 Performances

- ✓ la très haute résolution spectrale en mode hétérodyne $R \sim 200.000$ permet la séparation d'ions isobariques,
- ✓ l'ionisation chimique en ions négatifs a été utilisée pour différencier les

isomères de certains composés organiques [53],

- ✓ la FTMS est une technique parfaitement adaptée pour étudier des réactions ion-molécule [54]. L'isolement d'un ion et l'étude des ions fragments produits (fils) par CID⁴⁵ sont utiles pour l'étude structurale des molécules [55],
- ✓ échantillons massifs solides.

3.1.3.2 Limitations

- ✓ l'analyse FTMS est relativement limitée en masse (dans notre configuration dotée uniquement d'un champ magnétique de 3T). Cet élément peut être un handicap lors de l'analyse de bio-molécules qui généralement ont des masses moléculaires très élevées. Cependant les nouvelles générations d'appareils permettent de mesurer des masses supérieures à 500000 Da. Une publication récente [56] présente le spectre d'un polymère synthétique de 5 millions de masse avec l'ionisation electrospray,
- ✓ l'analyse demande la maîtrise de nombreux paramètres ayant une influence sur la formation et la détection des ions,
- ✓ la conservation de l'aimant supraconducteur à 4 K nécessite l'utilisation de fluides cryogéniques (hélium et azote liquide) relativement onéreux,
- ✓ les produits présentant une tension de vapeur trop faible se vaporisent dans l'enceinte du spectromètre sous ultravide ($\sim 10^{-9}$ Torr).

45

CID : Collision Induce Dissociation (Dissociation Induite par Collision)

2.2 La spectrométrie de masse à temps de vol⁴⁶

Il existe différents appareils de spectrométrie de masse à temps de vol. Au cours de ce travail deux appareils ont été utilisés :

- ✓ la microsonde laser de type LAMMA 500⁴⁷ dont nous disposons au laboratoire,
- ✓ l'appareil Biflex développé par Bruker Spectrospin SA dont dispose le Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique de l'Université de Strasbourg.

Le principe d'ionisation de ces appareils repose (comme dans le cas de la microsonde laser FTMS) sur le passage à l'état ionisé-gazeux d'un micro volume ($\sim 1\mu\text{m}^3$) d'échantillons solides à l'aide d'un faisceau laser. Les ions ainsi formés sont collectés et accélérés dans un spectromètre de masse à temps de vol pour l'analyse des particules ionisées obtenues. Ces microsondes permettent l'étude des molécules dans les deux modes d'ionisation positif et négatif.

La plupart des techniques de spectrométrie de masse (sauf la FTMS) mettent en jeu des ions animés d'une énergie cinétique bien définie, communiquée dans une direction donnée par la différence de potentiel d'accélération. Les ions formés suite à l'impulsion laser sont accélérés à l'intérieur du spectromètre de masse. Des ions positifs ou négatifs sont alors détectés suivant la polarité des potentiels sur les électrodes .

Dans un spectromètre de masse à temps de vol, la dispersion des différentes masses résulte du fait que tous les ions ayant la même énergie cinétique ont des vitesses différentes suivant leur masse. Or, il est important que tous les ions de même masse arrivent en même temps sur le détecteur. De façon à obtenir le minimum de dispersion énergétique et le maximum de résolution, il faut que :

- ✓ le temps d'ionisation des ions (c'est à dire le temps de pulse laser) soit le plus court possible,
- ✓ la dispersion énergétique des ions soit minimale. On peut corriger ce facteur en utilisant un réflecteur.

Dans ces conditions, le spectromètre de masse à temps de vol de type électrostatique présente deux avantages particuliers sur les autres types d'analyseurs de masse :

⁴⁶ TOF Time of Flight

⁴⁷ LAMMA-500 Leybold-Heraeus cologne.RFA

- ✓ à partir d'une seule impulsion laser, la totalité d'un spectre de masse peut être enregistrée,
- ✓ grâce à ses électrodes tubulaires, le spectromètre de masse à temps de vol possède une transparence ionique élevée qui permet une grande sensibilité de détection de cet instrument.

2.2.1 Principe de séparation des ions dans un temps de vol

L'analyseur à temps de vol [57,58] (dans lequel règne une pression partielle de 10^{-6} Torr) est constitué d'un tube de longueur L , appelé tube de vol (figure 23).

Les ions sont accélérés sous une tension V . Ils entrent au même instant t_0 dans le tube de vol, dans lequel ne règne aucun champ électrique, avec des vitesses v (équation [8]) inversement proportionnelles à leur rapport m/z .

$$v = \sqrt{\frac{2Vze}{m}} \quad [8]$$

e : charge élémentaire = $1,6 \cdot 10^{-19}$ C

Le temps t mis par les ions pour traverser le tube de vol dépend de leur rapport m/z ; t est défini par l'équation [9].

$$t = \frac{L}{v} = \frac{L}{ze} \sqrt{\frac{2mV}{ze}} \quad [9]$$

avec $t = t_f - t_0$,

t_0 : instant de formation des ions, t_f : instant de détection des ions.

La séparation des ions dans ce type d'analyseur repose sur le fait que le temps de parcours moyen des ions les plus lourds (m/z élevés) est plus important que celui des ions les plus légers (m/z faibles).

La résolution R de ce type d'analyseur augmente avec le rapport m/z ; cependant elle reste assez faible sur l'ensemble de la gamme de masse. Une nouvelle génération de tube de vol avec "réflectron" ou "miroir électrostatique" permet d'atteindre des résolutions supérieures. Ce miroir a pour but de refocaliser les ions selon leur énergie cinétique. Les différences de vitesses v observées, pour des ions de même rapport m/z , sont dues à une dispersion en énergie cinétique lors de l'ionisation.

L'analyseur à temps de vol permet en théorie la mesure de m/z très élevés ($\sim 10^6$ Thomson).

2.2.2 Descriptif expérimental

2.2.2.1 Le LAMMA 500

La géométrie de cet appareil présente la spécificité d'être en transmission (figure 22). Ceci signifie que l'expansion du plasma se fait à 180° par rapport au faisceau laser incident

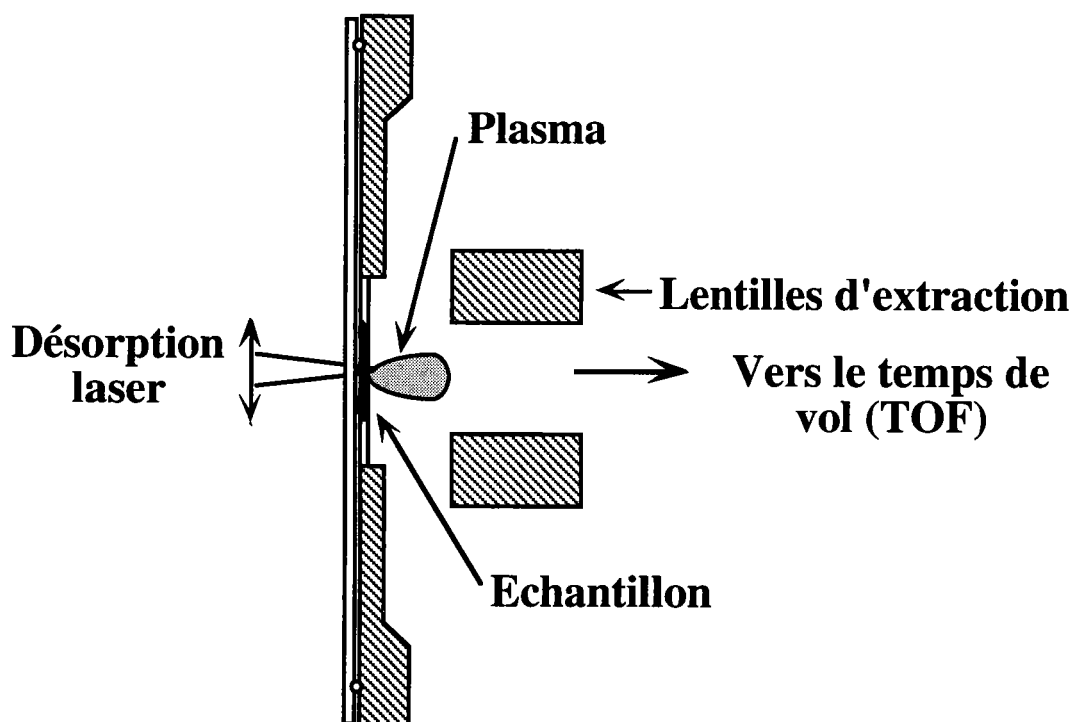


Figure 22. Géométrie en transmission de la microsonde laser LAMMA 500

Après l'impact du faisceau laser, les ions sont extraits et introduits dans le tube analyseur à l'aide d'une différence de potentiel d'accélération de 3000V (figure 23). La distance entre l'échantillon et l'objectif de l'optique ionique d'accélération est de 5,7 mm, ce qui donne un champ électrostatique légèrement supérieur à $0,5V/\mu m$. Les ions sont ensuite focalisés sur le détecteur au moyen d'un système de lentilles électrostatiques.

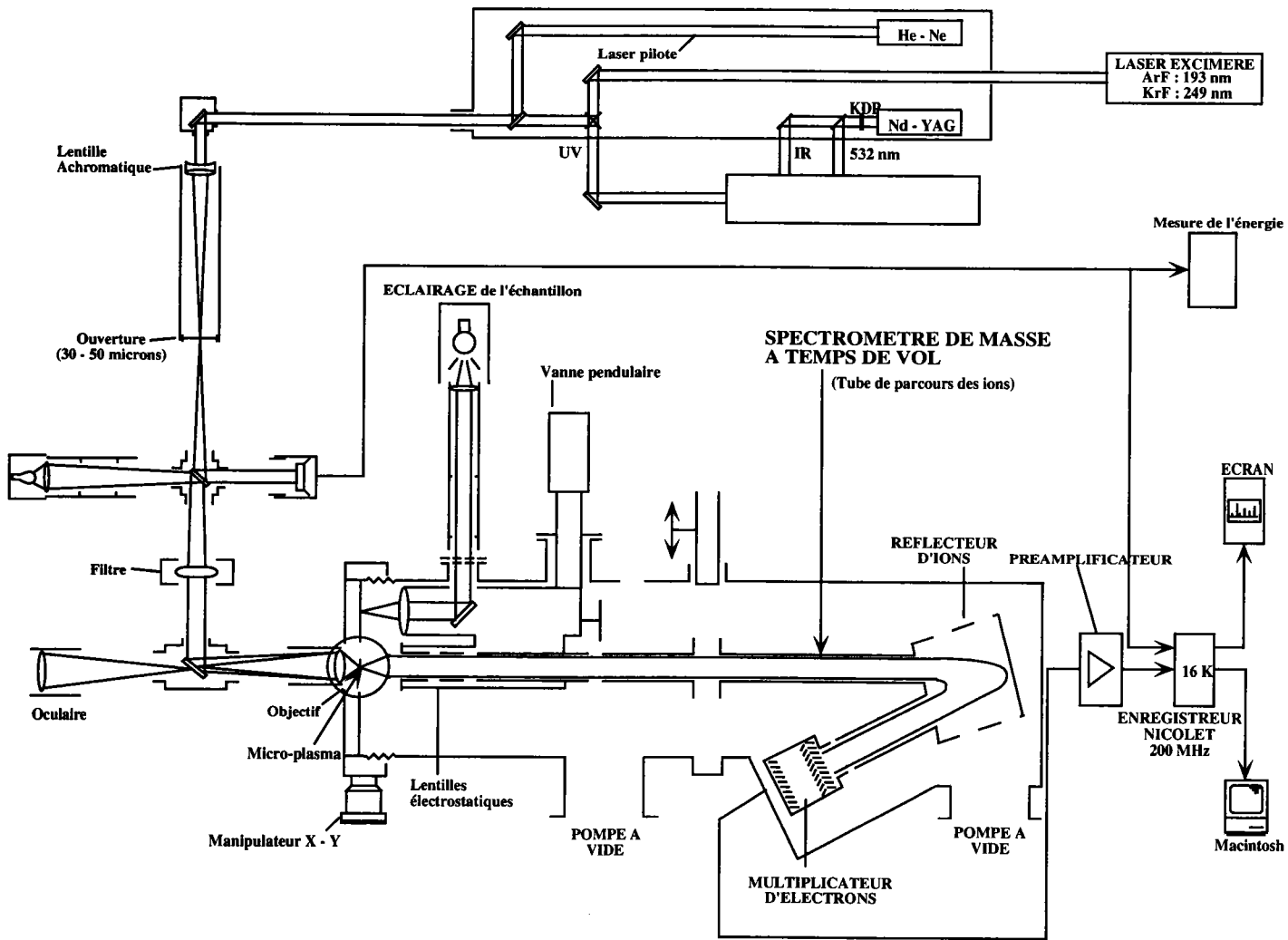


Figure 23. Schéma de la microsonde laser LAMMA

2.2.2.2 Le Biflex

L'appareil développé par Bruker Spectrospin SA, comme l'ensemble des appareils de MALDI-TOF commercialisés à l'heure actuelle, présente une géométrie en réflexion. C'est à dire que les ions sont extraits du côté de l'impact le laser.

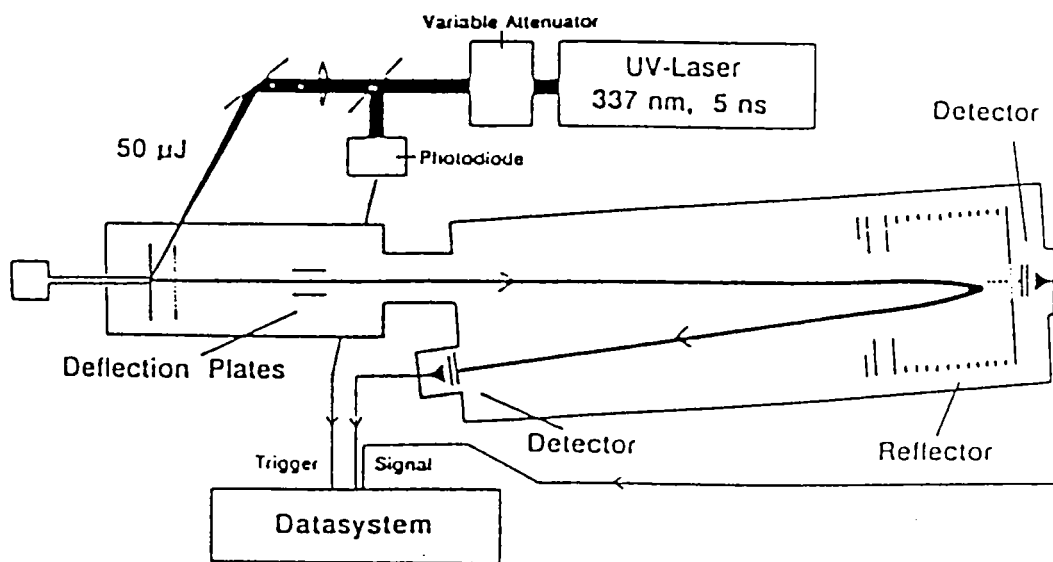


Figure 24. Schéma d'un analyseur temps de vol avec réflectron, développé par Bruker Spectrospin SA.

2.2.3 Performances et limitations

2.2.3.1 Le LAMMA

Performances de la microsonde LAMMA-500

- ✓ le premier avantage de l'analyse par spectrométrie de masse à ionisation laser est sa capacité à analyser, très rapidement et avec une sensibilité élevée à la fois, les espèces minérales et organiques qui sont présentes sur une zone micrométrique,
- ✓ le temps d'analyse est extrêmement court. La préparation de l'échantillon, l'installation sur le porte-échantillon et l'établissement du vide prennent entre 10 et 15 minutes. L'analyse proprement dite suivie de l'enregistrement du spectre de masse dure quelques minutes.

Cette vision peut être parfois erronée, en particulier pour des particules de l'environnement chimiquement hétérogène. Il convient alors de faire des analyses plus détaillées, à différentes irradiances. De plus, il est préférable d'acquérir plusieurs spectres pour chaque série de mesures et d'en faire la moyenne.

- ✓ tous les éléments de la classification périodique et leurs isotopes stables peuvent être détectés, pour certains d'entre eux, à des limites de détection relative de l'ordre ou même inférieur au ppm. Cela permet notamment une meilleure sensibilité pour la détection de nombreux contaminants présents à l'état de trace dans les particules ,
- ✓ 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, on a pu détecter des masses à 2000 Da [59]. En pratique la plage de masse est limitée à la fois par la résolution et la sensibilité du détecteur. L'utilisation d'un réflecteur a amélioré les résultats par rapport aux TOF linéaires, mais les ions de masses moléculaires élevées arrivent sur le détecteur avec une faible énergie. Hillenkamp et coll [60] ont pu obtenir les ions monomères, dimères et le trimères de molécules organiques de très hauts poids moléculaires en appliquant au détecteur une tension de 20 kV.

Limitations de la microsonde LAMMA-500 :

- ✓ l'analyse LAMMA est essentiellement destructrice, et par conséquent, il est quasiment impossible d'acquérir un spectre en ions positifs et négatifs pour une même particule, sauf si l'on travaille à très faible énergie du laser sur des particules organiques, [61]
- ✓ la nécessité d'opérer sous un vide élevé pourra causer des problèmes en ce qui concerne l'analyse des composés volatils.

2.2.3.2 Le Biflex

Elles dépendent de la technique d'ionisation (désorption laser, MALDI, ...), de la géométrie (longueur du tube, réflectron, ...) et des caractéristiques du tube de vol (pression dans le tube de vol, tension d'accélération V , ...).

Dans le cas du Biflex, la pression dans le tube de vol est de l'ordre de 10^{-6} torr et la tension d'accélération des ions est de 20 kV. Ces caractéristiques permettent d'obtenir les performances suivantes :

- ✓ résolution : $R = 500$, sans réflectron
 $R = 2000$, avec un réflectron
- ✓ gamme de m/z : 0 - 400 000

Ces appareils connaissent un développement important depuis quelques années. Leurs performances vont encore se développer dans un avenir proche. En effet, la limitation essentielle de ces spectromètres de masse était la résolution. Or des travaux récents de Brown et coll. [62] ont montré l'intérêt d'un nouveau système d'extraction des ions : l'extraction pulsée des ions. Ceci permet de limiter leur dispersion temporelle lors de la désorption et donc de gagner en résolution.

2.5 Bibliographie

- [39] Muller J.F, Pelletier M, Krier G, Weil D, Campana J, *Microbeam Analysis*. Ed. P.E. Russel. San Fransisco Press, Inc., 1989, 311.
- [40] Krier G, Pelletier M, Muller J.F, Lazare S, *Microbeam Analysis*. Ed. P.E. Russel. San Fransisco Press, Inc., 1989, 347.
- [41] Sanchez N, Contribution à l'étude de la désorption laser in situ . Cas de médicaments : l'Amiodarone, Thèse de l'Université de Metz, 1990
- [42] Comisarow M.B, Marshall A.G, *Chem. Phys. Lett*, 1974, **25**, 282.
- [43] Muller J.F, Tolitte F, Krier G, Pelletier M, Brevet Francais n°8809438
- [44] Pelletier M, Krier G, Muller J.F, Weil D, Johnston M, *Rapid. Comm. Mass Spectrom.*, 1988, **2**, 146
- [45] Hercules D.M, *J. Microchemical*, 1988, **38**, 3.
- [46] Asamoto S, *Spectroscopy*, 1988, **3**, 38.
- [47] Comisarow M.B, *J. Chem Phys*, 1978, **69**, 4097.
- [48] Marshall A.G, *Accounts of chemical Research*, 1985, **18**, 316.
- [49] Russell D, *Mass Spectrometry Reviews*, 1986, **5**, 167
- [50] Laude D.A, Brown R.S, Johlman C.L, Weil D.A, Wilkins.C.L, *Org Mass Spectrometry*, 1986, **5**, 107.
- [51] Marshall A.G, Grosshans B.P, *Anal. Chem.*, 1991, **63**, 215A.
- [52] Marshall A.G, Verdun F, *Fourier Transform Spectroscopy in NMR, Optical and Mass spectrometry.*, Elsevier Science publisher. B.V. 1990 Amsterdam.
- [53] Buchanan M.V, *ACS. Symposium Serie. American Chemical Society*, Washington, D.C. 1987.
- [54] Freiser Ben S, *Chemtracts-Analytical and Physical Chemistry.*, vol 1989, **1**, 65.
- [55] Cody R.B, Freiser Ben.S, *Int. J. of Mass. Spectrometry and Ion Physics*, 1982, **41**, 199.
- [56] ES 5 million
- [57] Torgenson D.F, Skowronski R.P, Mac Farlan R.D, *Biochem Biophys Res*, 1974, **60**, 616
- [58] Emary W.B, Lys I, Cotter R.J, Simpson R, Hoffman A, *Anal chem*, 1990, **62**, 1319
- [59] Sallans L, Lane K R, Squires R R, Freiser Ben S, *J. Am. Chem. Soc*, 1985, **107**, 4379.
- [60] Jackson T.C, Carlin T.J, Freiser Ben. S, *J. Am. Chem. Soc.*, (1986), **108**, 1120.
- [61] Bricker D.L, Russell D.H, *J. Am. Chem. Soc*, 1987, **109**, 3910.
- [62] Robert S, B.J.J. Lennon, *Anal. Chem*, 1987, **67**, 1998

3. Comparaison de la FTMS et du TOF appliqués à l'étude de peptides par MALDI

L'objectif de la présente étude est de comparer :

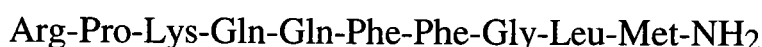
- ✓ les techniques MALDI/FTMS et MALDI/TOF. On déterminera les paramètres FTMS permettant l'obtention (à matrice et molécule cible égales) de résultats comparables à ceux de MALDI/TOF,
- ✓ les réponses de divers peptides vis à vis d'une même matrice et ce quel que soit le système de séparation des ions.

3.1 Protocole opératoire

3.1.1 Les molécules étudiées

Quatre peptides ont été analysés lors de cette étude. Leur séquence respective est donnée ci-après :

- ✓ Substance P : M = 1347,6 Da. Ce peptide est stabilisé du côté C terminal sous forme d'amide (d'où la notation Met-NH₂).



- ✓ Substance P fragment 2-11 : M = 1191,5 Da. Ce peptide est stabilisé du côté C terminal sous forme d'amide (d'où la notation Met-NH₂).



- ✓ Bradykynine : M = 1060,2 Da



- ✓ Angiotensine III : M = 931,1 Da



3.1.2 Préparation des échantillons

Plusieurs matrices ont été testées (acide α cyano-4-hydroxycinnamique, acide sinapinique, ...). Cependant, nous ne présenterons dans ce mémoire que les résultats obtenus avec l'acide α cyano-4-hydroxycinnamique. En effet, cette matrice est particulièrement bien adaptée à l'étude de ce type de molécules. De plus, elle permet d'obtenir des résultats beaucoup plus reproductibles que ceux obtenus avec les autres matrices.

La technique de préparation des échantillons choisie est celle dite de "l'évaporation rapide" proposée par P. Roepsdorf et coll. [17]. La matrice est solubilisée dans de l'acétone. 1 μ l de la solution surnageante est déposé sur le porte-échantillon. Le solvant s'évapore extrêmement rapidement permettant l'obtention d'une couche de micro-billes d'un diamètre de 5 μ m environ. 1 μ l d'une solution aqueuse du peptide (10⁻⁴ M) à analyser est alors déposé sur la sous-couche de matrice. Or, l'acide α cyano-4-hydroxycinnamique est très peu soluble dans l'eau. De ce fait, on ne constate qu'une redissolution faible de la matrice dans l'eau. On évapore l'eau sous vide. Il y a alors co-cristallisation en surface entre les molécules cibles et les molécules de matrice.

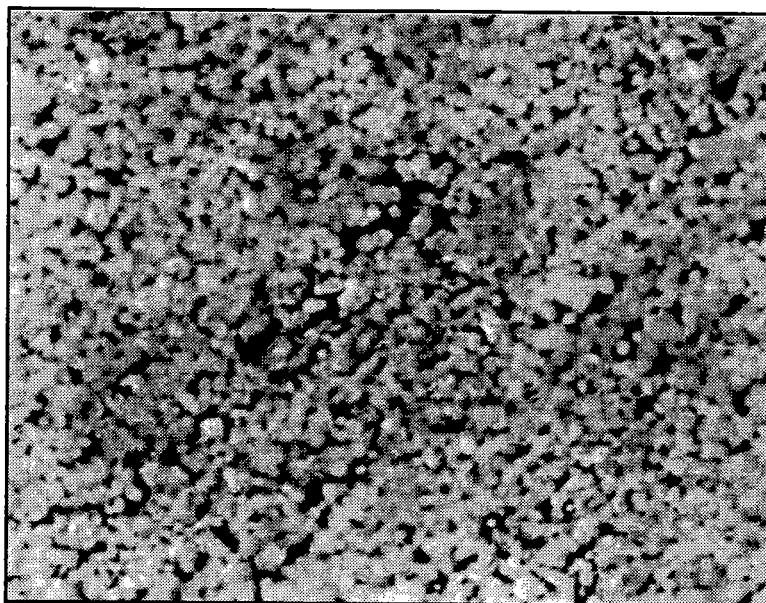


Figure 25. Photo d'une cible recouverte d'un dépôt d'acide α cyano-4-hydroxycinnamique. (Grossissement x89).

Cette technique de préparation des échantillons MALDI permet l'obtention de cibles homogènes et donc de résultats très reproductibles en tous points de celles-ci.

La même technique de préparation des échantillons a été utilisée pour les deux appareils (MALDI-FTMS et MALDI-TOF).

3.2. Optimisation de la séquence d'analyse FTMS

L'objectif de cette partie est d'obtenir des résultats comparables entre la microsonde FTMS et le TOF. Le nombre de paramètres à optimiser est beaucoup plus important lors des analyses FTMS (figure 26) que lors des analyses TOF.

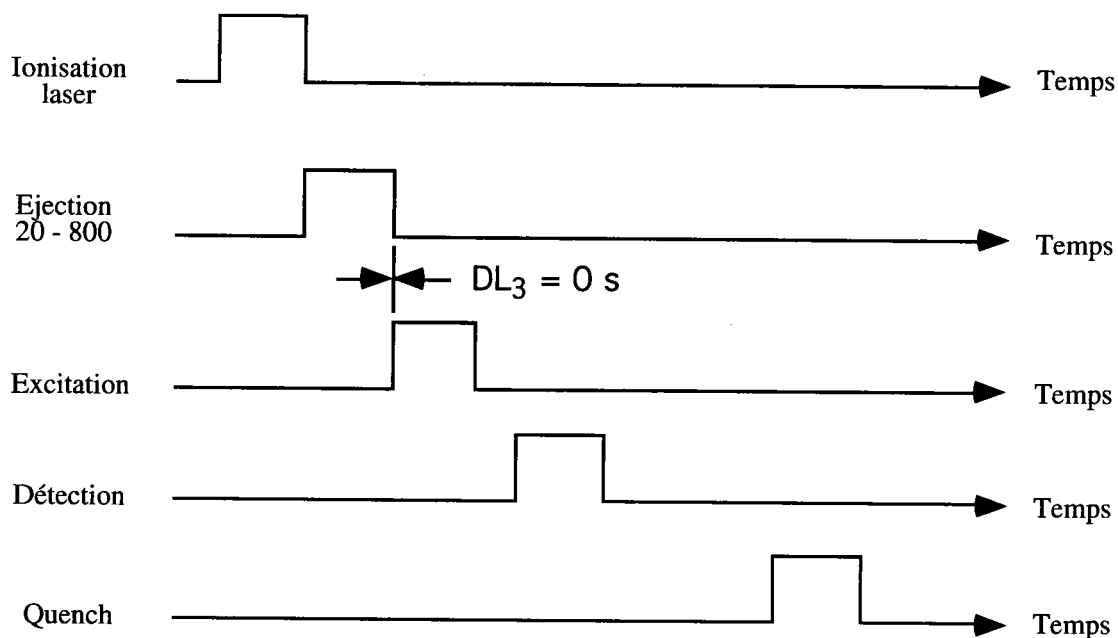


Figure 26. Séquence FTMS permettant l'obtention de résultats comparables à ceux obtenus en TOF.

Nous avons donc recherché quels étaient les paramètres FTMS importants pour notre étude. Une séquence optimale, doit répondre essentiellement à deux critères :

3.2.2 Limitation du nombre d'ions dans la cellule

Une accumulation trop importante d'ions dans la cellule du FTMS peut-être un frein à l'obtention de spectres présentant une bonne résolution et un bon rapport signal/bruit (S/N). [63]

En effet, la présence d'un nombre important d'ions de même masse dans la cellule peut induire des effets de charge ou des répulsions entre les ions. Ces phénomènes sont synonymes de dégradation du signal. Ce paramètre est d'autant plus sensible dans la configuration de la microsonde du laboratoire de Metz que les lignes de champ électrique dans la cellule source ne sont pas parfaitement parallèles lorsque le potentiel de piégeage des ions est appliqué (ceci est dû au fait de la présence du porte-échantillon légèrement à l'intérieur de la cellule côté source).

Différents paramètres d'atténuation permettent de limiter le nombre d'ions dans la cellule à la fois lors de l'excitation de ceux-ci et de leur détection. Nous pouvons également éjecter un ou plusieurs types d'ions. C'est ce que nous avons fait ici en émettant une gamme de radiofréquences appropriées correspondant à l'intervalle de masses (17-800 Da). Ceci nous a permis d'éjecter les ions de basse masse et notamment ceux correspondant à la matrice et aux cations alcalins (Na^+ , K^+ , ...).

3.2.2 Limitation du temps globale de l'analyse

L'une des différences fondamentales qui existe entre les séquences de la microsonde FTMS et d'un appareil à temps de vol est la durée de l'analyse. En effet, si l'enregistrement complet d'un spectre de masse en TOF dure quelques centaines de micro-secondes, il est de plusieurs centaines de milli-secondes sont nécessaires en FTMS.

Or, les molécules étudiées peuvent être instables si l'augmentation de leur énergie interne lors de l'ionisation est trop importante. Il y a alors des fragmentations. En tout état de cause, plus le temps d'analyse est important, plus les risques de fragmentation par collisions sont élevés.

La réduction de la durée globale de la séquence a été obtenue grâce à la limitation de deux paramètres :

- ✓ les écarts de temps (ou délais) qui existent entre les différents événements d'une séquence (ionisation, éjection, excitation, ...),
- ✓ les gammes de masses excitées et détectées.

Tout d'abord, les différents délais (dont le principal est le temps variable (DL3) qui se situe entre la fin de l'ionisation et le début de l'excitation des ions) sont fixés à 0 s.

Enfin, toujours pour obtenir un temps total d'investigation le plus court possible, la gamme de masses excitée et détectée a été limitée entre 800 et 1500 Da.

3.3 Comparaison des résultats FTMS et TOF

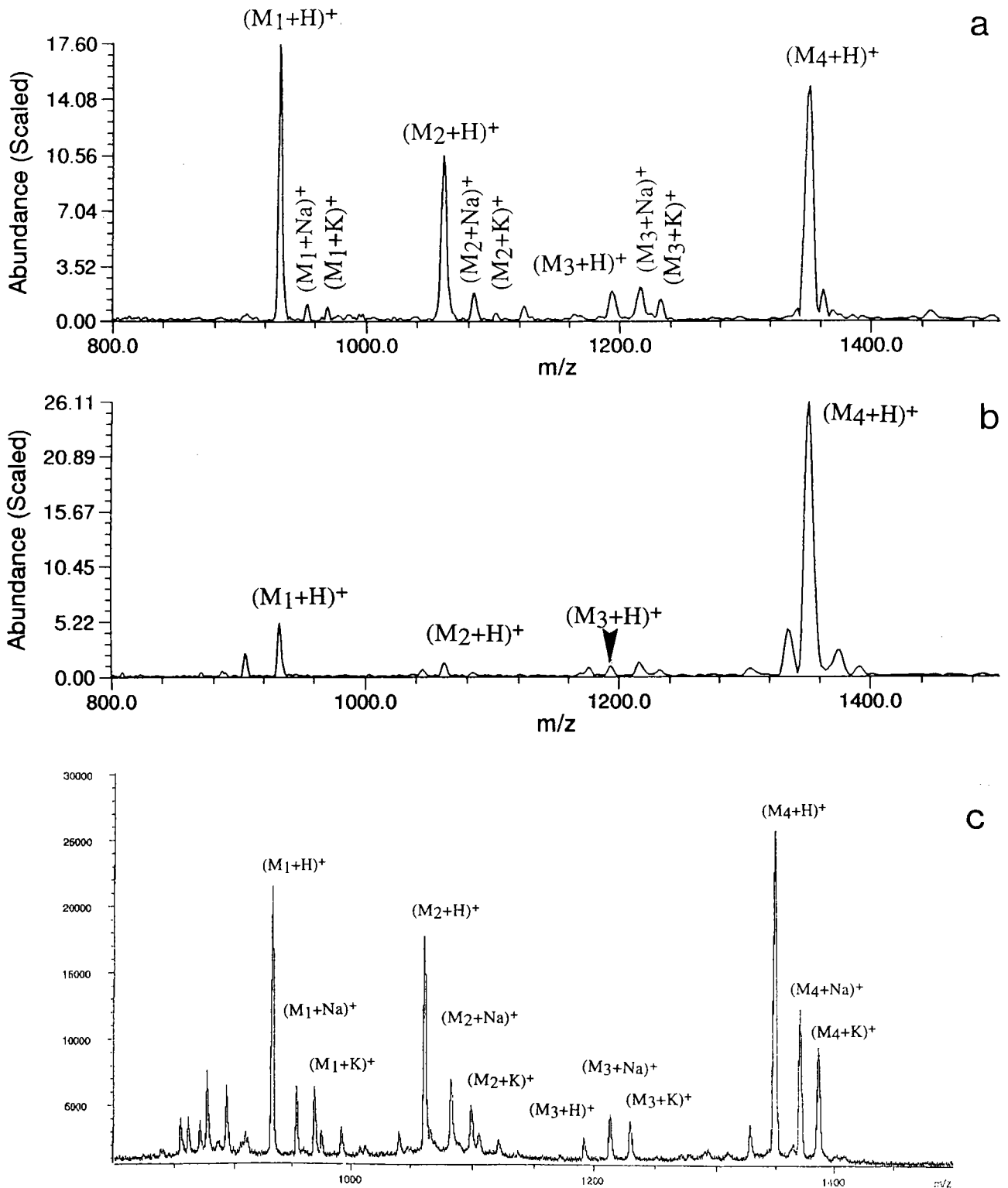


Figure 27. Spectres FTMS à $DL3 = 0$ s (27.a), $DL3 = 10 \mu s$ (27.b) et TOF (27.c) d'un mélange de quatre peptides.

Lors des analyses par MALDI-TOF (figure 27.c), les ions formés sont immédiatement extraits vers le tube de vol. De ce fait, les réactions de type ion-molécule sont très limitées. Pour atténuer ces réactions en FTMS, il faut exciter les ions (de manière à séparer les différents types d'ions) dès la formation du nuage gazeux induit par laser (figure 27.a). En effet, la densité de matière à ce niveau est très importante favorisant les interactions entre les particules.

Si on laisse un temps, même très court (figure 27.b : 10 μ s), entre l'ionisation et l'excitation des ions, l'allure du spectre est complètement modifiée. Par contre, au delà d'une certaine valeur de DL3, l'allure du spectre n'évolue plus beaucoup : on ne détecte plus majoritairement que la Substance P. Les trois autres peptides sont difficilement détectables (dans le bruit de fond).

Il apparaît donc qu'en réduisant les délais, il y a un bon accord entre les intensités relatives des pics correspondant aux 4 peptides protonés obtenus en FTMS et en TOF.

Nous allons tenter, dans la suite de cette partie, d'apporter quelques explications à ce phénomène.

3.3 Pourquoi de telles différences entre les 4 peptides?

La préparation des échantillons a été effectuée de manière à ce que chacun des peptides ait la même concentration (Substance P, Substance P fragment 2-11, Bradykynine et Angiotensine III). Or, l'étude des spectres FTMS et TOF montre une disparité importante au niveau de la réponse de chacun de ces 4 peptides.

Nous allons tenter de donner quelques éléments d'explication qui peuvent aider à la compréhension de ces résultats.

3.3.1 Influence des AA basiques

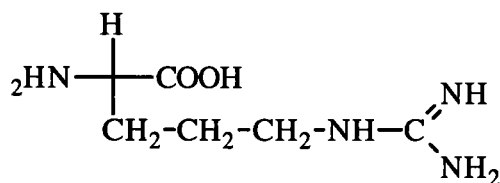
Plusieurs auteurs ont déjà mis en évidence l'influence d'AA basiques sur l'étude de petits peptides par MALDI. Notamment, Vertes et coll. [64] ont montré, par des études de cinétique, que l'ordre de basicité entre l'Arginine (Arg), la Lysine (Lys) et l'Histidine (His) variait suivant l'état physique des molécules (solide ou gazeux). On constate lors du passage à l'état gazeux, une inversion des basicités de la Lys et de l'Arg. Une étude expérimentale a été réalisée par les mêmes auteurs sur la formation des ions pseudo-moléculaires $(M+H)^+$ de dipeptides :

Dipeptide	$I_{(M+H)^+}$
Lys-Lys	3,6
His-Lys	7,3
His-His	21
Arg-Lys	26

Tableau 3. Intensités relatives des pics correspondant aux ions $(M+H)^+$ de 4 dipeptides d'après [64]

La classification élaborée suite aux études cinétiques :

Arg > His > Lys est confirmée par les résultats expérimentaux.



Formule de l'Arginine

D'autre part, des études menées par Fenselau et coll. [65] ont permis de déterminer l'affinité protonique des différents acides aminés. Leurs résultats sont comparés à ceux de plusieurs autres auteurs. Les valeurs correspondant à l'arginine, la lysine et l'histidine sont regroupées dans le tableau ci-après :

Peptide	A _p (kcal/mol)
Lys	228,7
His	230,5
Arg	~ 245,2

Tableau 4. Affinité protonique en phase gazeuse de trois peptides basiques en kcal/mol d'après [65]

Dans le même article [65], les auteurs ont également montré que la fragmentation résultant d'études MS/MS de dimères du type (Lys-H-His) donne préférentiellement un pic correspondant à (His+H)⁺. Ces résultats sont confirmés par d'autres études par MS/MS d'ions du type (His-Lys+H)⁺ réalisées par Burlet et coll. [66].

L'ensemble des données de la bibliographie sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Basicité Phase liquide (1)	Arg > Lys > His		
Basicité Phase gazeuse (2)	Arg > His > Lys		
A _p (kcal/mol) (3)	Arg	His	Lys
	246	230	228

Tableau 5. (1) ordre relatif de basicité en phase liquide (d'après [64]) de l'Arginine (Arg) de la Lysine (Lys) et de l'Histidine (His).
(2) ordre relatif de basicité en phase gazeuse des mêmes AA (d'après [64])
(3) Affinité protonique (A_p) en kcal/mol de ces mêmes AA. (d'après [65]).

En ce qui nous concerne, nous avons comparé la réponse entre la Substance P et le fragment 2-11 de cette même Substance P. Ceci nous a

conduit à mettre en évidence le rôle important joué par la présence du côté N terminal d'un acide aminé (AA) basique. Comme nous l'avons vu précédemment, l'arginine est l'AA qui présente le pKa de la chaîne latérale le plus fort ($pK_a = 13,2$) et l'affinité protonique en phase gazeuse la plus élevée (245,2 kcal/mol).

La seule différence entre ces deux peptides est l'absence de l'arginine du côté N terminal pour le fragment 2-11. De ce fait, la Substance P fragment 2-11 possède du côté N terminal un AA à chaîne latérale non polaire : la proline (Pro). L'analyse des spectres obtenus en TOF (comparables à ceux de FTMS) présentés figure 28 montre une détection 10 fois plus efficace dans le cas de la substance P (24000 au lieu de 900 pour la Substance P fragment 2-11).

Par contre, il apparaît que la présence d'AA basiques au coeur de la chaîne peptidique (ici la Lysine) ne permet pas une protonation aussi aisée qu'en bout de chaîne. L'encombrement stérique lié à la structure tridimensionnelle du peptide peut être une explication à ce phénomène.

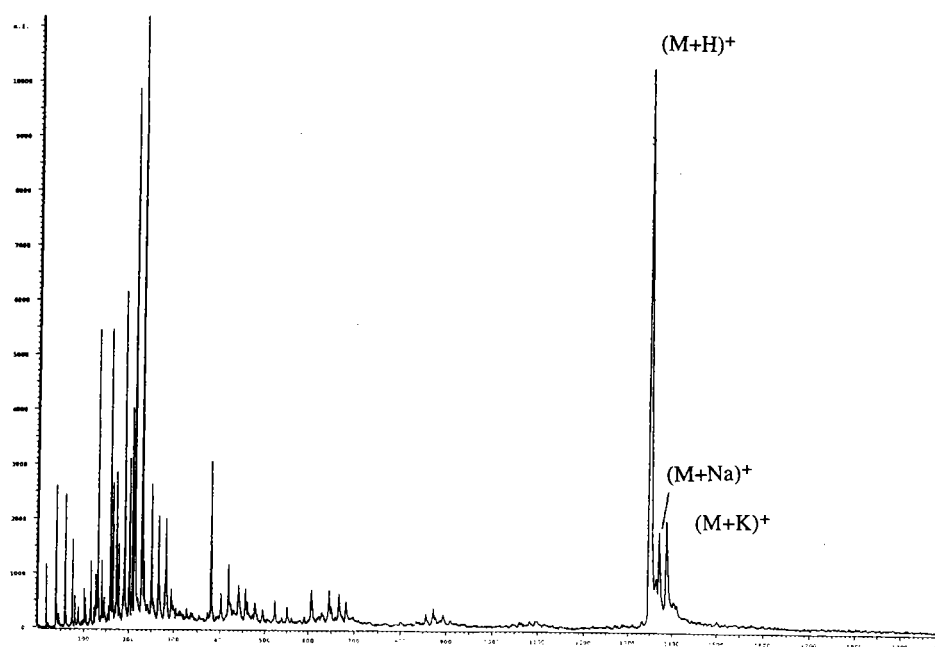


Figure 28: Spectres MALDI-TOF de la substance P. Matrice : Acide α cyano-4-hydroxycinnamique

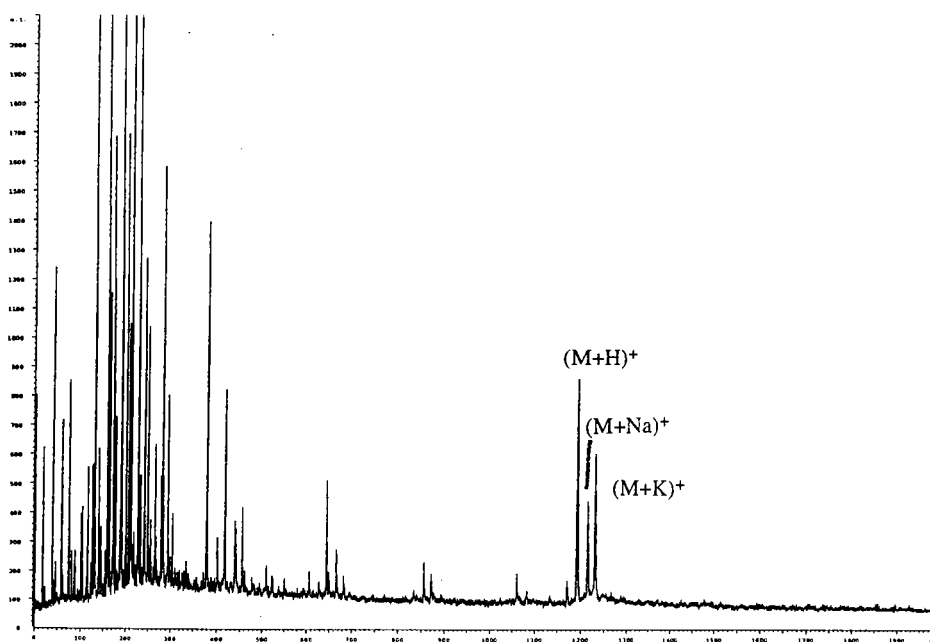


Figure 29. Spectre de MALDI-TOF de la Substance P fragment 2-11. Matrice : Acide α cyano-4-hydroxycinnamique

L'étude de l'Angiotensine III (qui présente également une arginine du côté N terminal), dans les mêmes conditions que précédemment, donne une réponse (figure 30) légèrement inférieure mais d'une intensité comparable à celle obtenue avec la substance P (14000 au lieu de 24000 pour la Substance P).

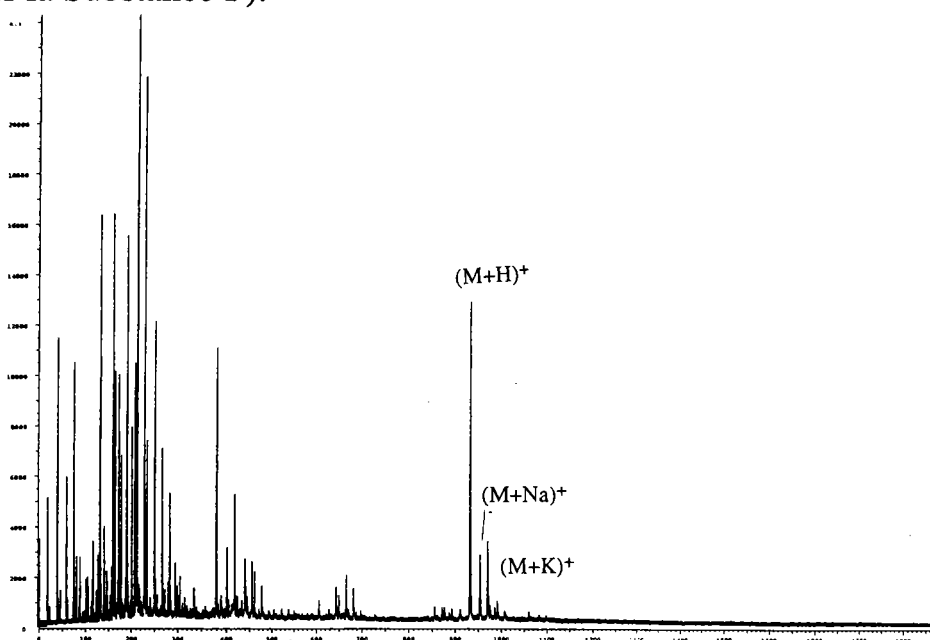


Figure 30. Spectres MALDI-TOF de l'Angiotensine III. Matrice : Acide α cyano-4-hydroxycinnamique

L'étude de la Bradykynine (figure 31), qui présente une arginine à la fois du côté N et du côté C terminal, montre que la présence d'une seconde arginine du côté C terminal n'améliore pas d'une façon significative le résultat (14000 au lieu de 24000 pour la Substance P et 14000 également pour l'Angiotensine III).

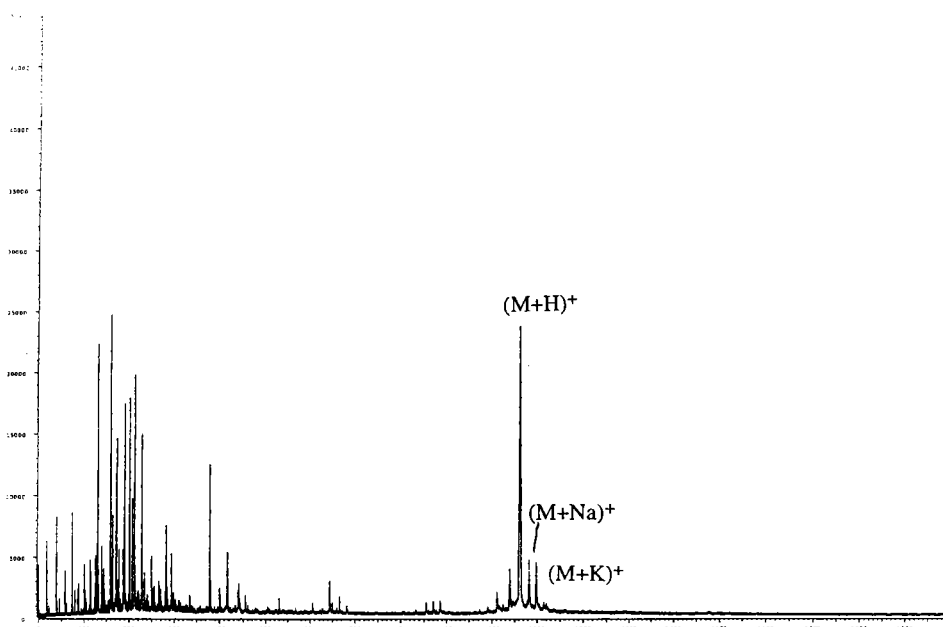


Figure 31. SpectresMALDI-TOF de la Bradykynine. Matrice : Acide α cyano-4-hydroxycinnamique

Ceci pourrait s'expliquer par des interactions entre le site le plus basique de la chaîne latérale (ici l'Arg) et le groupement COOH terminal qui induisent une baisse de l'affinité protonique de l'arginine (figure 32). De ce fait, la Bradykynine ne se protone pas mieux que la substance P ou l'Angiotensine.

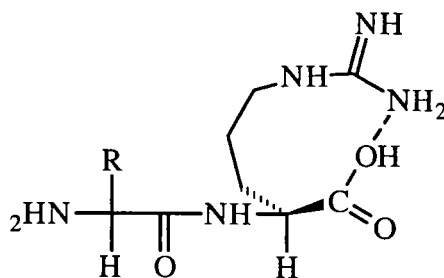


Figure 32. Schéma de l'interaction entre le site le plus basique de la chaîne latérale et le groupement COOH terminal.

3.3.2 Influence du choix de la matrice

Parmi les autres paramètres, la matrice occupe une place de choix. Il existe de multiples interactions entre la matrice et les molécules cibles qui dépendent de la nature des deux composés. D'autre part, la qualité et l'homogénéité du dépôt obtenu sont également extrêmement importantes. Tous ces éléments vont influencer la réponse obtenue.

Nous avons donc comparé deux types de matrices lors de ces expériences : l'acide α cyano-4-hydroxycinnamique (figure 28) et l'acide sinapinique (figure 33) pour un même peptide : la Substance P.

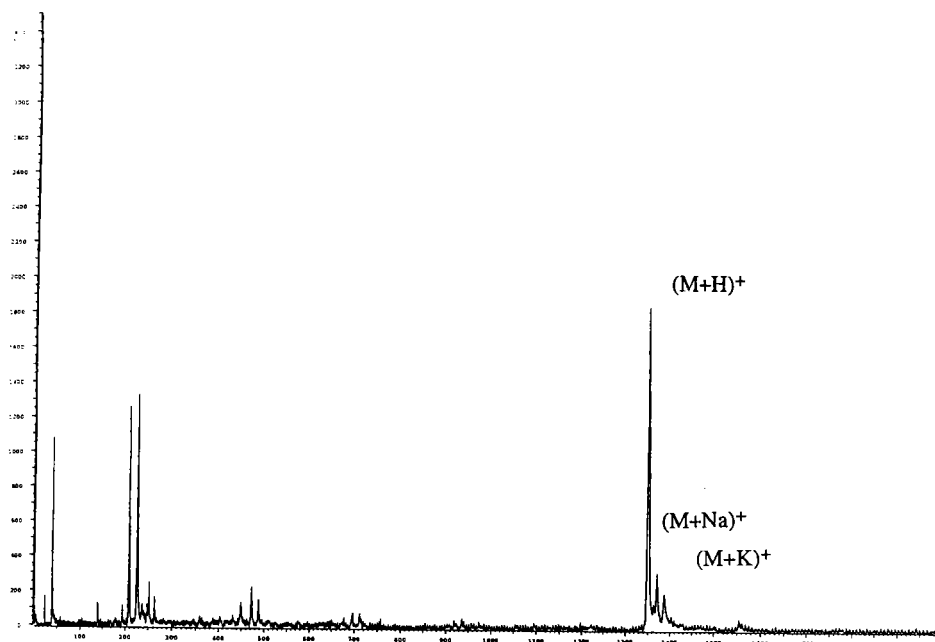


Figure 33. Spectre MALDI-TOF de la Substance P. Matrice : acide sinapinique.

Ce dernier spectre met en évidence le caractère beaucoup moins "bryant"⁶⁰ de cette matrice par rapport notamment à l'acide α cyano-4-hydroxycinnamique. Ceci présente un intérêt majeur, surtout lors de l'étude de composés de faible masse moléculaire.

Certains auteurs [66] ont mis en évidence une influence de la

⁶⁰ une matrice bryante est une matrice qui s'ionise facilement et qui, par conséquent, donne de nombreux pics (fragments, dimère, trimère, etc...) de basse masse.

matrice sur le type d'ionisation des peptides. En effet, l'acide sinapinique favoriserait la formation de pics pseudo-moléculaires de type $(M+H)^+$. L'acide α cyano-4-hydroxycinnamique favoriserait, quant à elle, la formation des ions $(M+H)^+$, $(M+Na)^+$ et $(M+K)^+$ alors que l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) favoriserait $(M+Na)^+$ et $(M+K)^+$.

Les spectres que nous avons obtenu ne sont pas en accord avec ceux présentés par Alison et coll.[66]. Leurs résultats sont certainement dûs à l'utilisation de matrices pas suffisamment purifiées (bien qu'ils aient apparemment recristallisé deux fois chacune de leurs matrices, selon leur publication).

3.4 Conclusion

On a pu, lors de cette partie, optimiser les paramètres FTMS afin d'obtenir des résultats comparables à ceux du TOF. A cette occasion, l'influence particulière du délai entre l'ionisation et l'excitation des ions (DL3) a été mise en évidence.

L'analyse par MALDI de peptides ou de protéines est facilitée par la présence d'un AA basique du côté N terminal. Par contre, le gain de détection occasionné par la présence de ce même type d'AA au coeur du peptide est beaucoup plus aléatoire. En effet, la conformation de la molécule peut "masquer" le site basique et le rendre inaccessible aux protons.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence un risque majeur pour les analyses MALDI : **les suppressions**. L'étude du mélange composé de la même quantité de chacun des 4 peptides montre des différences notables de détection. Notamment, la substance P fragment 2-11 est à la limite du bruit de fond. Ce problème devient crucial lors de l'étude d'échantillons inconnus. En effet, si l'on ne peut pas détecter certains produits d'un mélange complexe, toute étude ayant un caractère quantitatif est vouée à l'échec. D'autre part, il apparaît difficile, dans ces conditions, de pouvoir réaliser facilement des analyses quantitatives.

L'ensemble des résultats présentés dans cette partie, à la fois au niveau bibliographique et expérimental permettent de donner un début de réponse quant à la localisation de l'ionisation lors du processus MALDI. Jusque là, deux hypothèses persistaient. Elles sont résumées dans la figure ci-dessous :

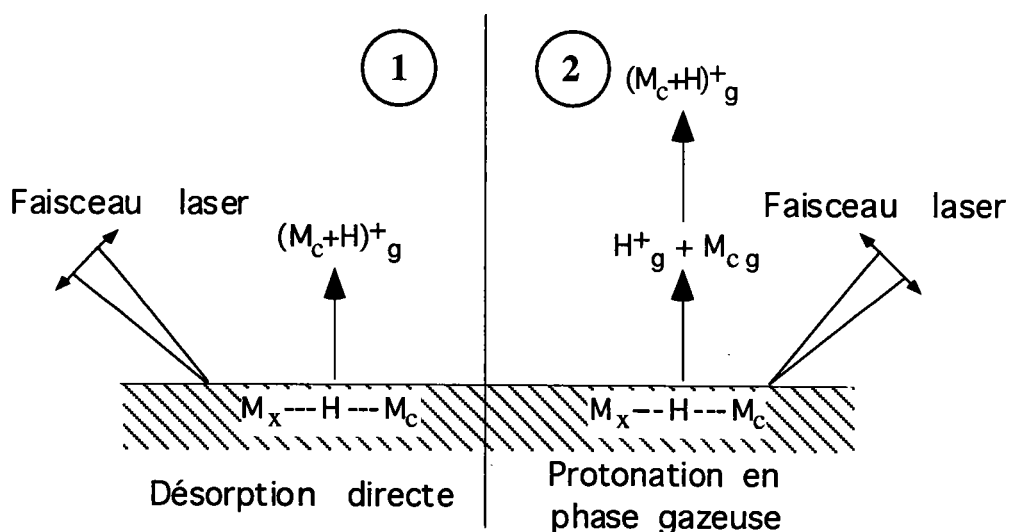


Figure 34. Deux des mécanismes les plus admis concernant l'ionisation MALDI

L'hypothèse 1 suppose une ionisation par échange de proton en phase solide entre la matrice et la molécule cible. La présence de nombreuses liaisons hydrogènes entre ces deux types de composés peut être en faveur de cette hypothèse.

L'hypothèse 2 consiste en une désorption de la molécule cible sous forme neutre, laquelle s'ioniserait par capture d'un proton en phase gazeuse. Les différents résultats présentés dans cette partie vont plutôt dans le sens de cette seconde hypothèse. En effet, la prédominance des ions pseudo-moléculaires $(M+H)^+$ de l'Histidine par rapport à ceux de la Lysine permet d'affirmer que l'affinité protonique de l'His est supérieure à celle de la Lysine. Or ceci n'est vrai qu'en phase gazeuse puisqu'en phase liquide, c'est le contraire.

Enfin, si l'importance de l'affinité protonique est apparue au cours de cette partie, il existe d'autres paramètres non moins essentiels. Deux d'entre eux sont : l'interaction entre la molécule cible et la matrice ainsi que l'influence de la longueur d'onde du laser incident. Nous allons essayer dans ce mémoire d'étudier, les influences de ces deux paramètres.

3.5 Bibliographie

- [63] Bruce J.E, Cheng X, Bakhtiar R, Wu Q, Hofstadler S.A, Anderson G.A, Smith R.D, J. Am Chem Soc, 1994, **116**, 7839.
- [64] Olumee Z, Sadeghi M, Tang X, Vertes A, Rapid Commun Mass Spectrom, 1995, **9**, 744.
- [65] Wu Z, Fenselau C, Rapid Commun Mass Spectrom, 1992, **6**, 403.
- [66] Burllet O, Gaskell S.J, J. Am Soc Mass Spectrom, 1993, **4**, 461.
- [67] Liao P.C, Allison J. J. Mass Spectrom, 1995, **30**, 408.

4. Etude du rôle de polymères comme matrice de co-désorption

Le laboratoire a depuis plusieurs années mené des programmes de recherche axés sur la caractérisation des polymères. Un certain nombre de caractéristiques (notamment liées aux propriétés d'ablation) des polymères nous ont conduit à étudier la possibilité d'utiliser un polymère comme matrice de co-désorption.

Le choix des polymères à utiliser nécessite une bonne connaissance de leurs caractéristiques spectroscopiques. En effet, il est nécessaire de réaliser une bonne adéquation entre ces propriétés et le choix de la longueur d'onde du laser ionisant. Pour cela, notre stratégie va s'appuyer sur deux techniques différentes :

- ✓ la spectroscopie UV pour caractériser les coefficients d'absorption molaire des différentes matrices en fonction de la longueur d'onde,
- ✓ la FTMS pour caractériser les espèces ioniques formées lors de l'impact laser.

4.1 Spectroscopie UV

Les acquis du laboratoire sur l'étude de l'ablation des polymères par FTMS nous permet de l'appliquer à la co-désorption laser de composés organiques dans des matrices polymériques. Pour cela, il est important de définir ici les trois étapes de l'ablation des polymères :

- ✓ tout d'abord, il y a absorption de l'énergie transportée par le rayonnement laser incident,
- ✓ ensuite, on constate une rupture des liaisons au sein du polymère,
- ✓ enfin, il y a ablation lorsque le nombre de liaisons rompues atteint une valeur critique. Ceci nous amène à parler du concept de seuil d'ablation⁷⁷, c'est à dire perte de matière mesurable par microbalance.

Parmi tous les modèles de l'ablation des polymères proposés, celui de l'interface mouvante semble être le plus intéressant [6]. Il a d'ailleurs déjà été mentionné dans la première partie de ce mémoire.

Il tient compte du caractère dynamique de la photo ablation et de l'écrantage possible de la radiation incidente par les fragments issus de l'ablation. Ce modèle donne une courbe d'ablation qui permet de déterminer :

- ✓ une constante de vitesse d'ablation du polymère,
- ✓ un coefficient d'absorption par les fragments (en majorité neutres) formés.

Ces éléments permettent de comparer les polymères à différentes longueurs d'onde. On a pu alors constater que les courtes longueurs d'onde favorisaient l'efficacité de l'ablation.

De plus, il apparaît que l'absence de structure aromatique et la présence massive d'oxygène dans le polymère conduisent à des vitesses d'ablation élevées [68].

Il paraît donc important d'effectuer nos travaux sur l'ablation des polymères à 249 nm et à 193 nm pour montrer l'influence de la longueur d'onde sur la désorption des molécules cibles insérées dans la matrice polymérique.

⁷⁷ énergie minimale à fournir au polymère pour qu'il y ait ablation.

L'ensemble de ces constatations nous ont donc conduits à tester comme matrice de co-désorption laser des polymères. Plusieurs ont été testés cependant nous ne présenterons que les deux meilleurs dans ce mémoire : la nitrocellulose (NC), matrice déjà utilisée en spectrométrie de masse (PDMS⁷⁸ et LDMS⁷⁹) et le polyéthylène succinate (PES) qui présente des propriétés similaires d'ablation à 193 nm.

4.1.1 *Optimisation des matrices polymériques de désorption*

Comme nous l'avons vu précédemment dans le principe de la technique MALDI, la matrice doit pouvoir absorber préférentiellement l'énergie par rapport à la molécule cible. C'est pourquoi, une étude préalable des matrices utilisées a été effectuée par spectroscopie UV. Cette technique nous permet de caractériser leur absorption UV aux différentes longueur d'ondes d'étude.

On a donc étudié et comparé deux matrices polymériques avec des composés organiques présentant des propriétés intéressantes aux diverses longueurs d'ondes disponibles au laboratoire. Les molécules suivantes ont été testées :

- ✓ la Nitrocellulose qui permet d'obtenir des films homogènes et possède une vitesse d'ablation élevée à 193 nm,
- ✓ le Polyéthylène Succinate qui a la particularité d'avoir l'une des vitesses d'ablation la plus élevée à 193 nm,
- ✓ la Benzophénone pour son absorption élevée en UV à 249 nm,
- ✓ l'Acide Nicotinique pour son caractère acide, sa bonne absorption en UV et sa géométrie particulière. Les deux autres isomères de l'Acide Nicotinique, l'Acide Picolinique et l'Acide Isonicotinique, ne donnent pas de résultats concluants lors de leur utilisation en tant que matrice de désorption, malgré des propriétés spectroscopiques similaires [69]. Ceci doit être dû à des interactions différentes entre la molécule cible et celle de l'Acide Nicotinique en raison de positions particulières de l'atome d'azote et du groupement carboxylique.

Plusieurs solvants ont été testés (méthanol, éthanol, butanone, acétone, ...) ; cependant, les travaux d'optimisation ont été effectués dans le méthanol pour plusieurs raisons :

⁷⁸ PDMS : Plasma Desorption Mass Spectrometry

⁷⁹ LDMS Laser Desorption Mass Spectrometry

- ✓ c'est un bon solvant de la nitrocellulose,
- ✓ il est transparent aux UV aux longueurs d'onde utilisées,

Les concentrations des solutions employées sont, en général, de l'ordre de 10^{-4} M.

Les travaux d'optimisation ont été effectués, en particulier, sur les matrices les plus utilisées en LDMS, en l'occurrence, la Nitrocellulose et le mélange Nitrocellulose/Acide Nicotinique.

Une double étude a été effectuée par spectroscopie UV : tout d'abord sur les différents produits en solution, puis sur des films issus de ces solutions après évaporation du solvant.

Cette étude en film se justifie par le type d'analyses MALDI puisque les matrices sont en phase solide et non liquide. Cependant, l'étude UV en transmission des films n'est possible que dans le cas des matrices polymériques ou de matrices binaires composées d'au moins un polymère et présentant un aspect macroscopique homogène ; en effet, si le dépôt obtenu est hétérogène, les résultats de la spectroscopie d'absorption UV sont faussés par la diffraction due aux micro-hétérogénéités.

4.1.2.1 La Nitrocellulose

L'étude de la nitrocellulose en solution dans le méthanol montre un maximum d'absorption à $\lambda_{\max} = 220$ nm.

Il faut noter que la partie de la courbe située vers les basses longueur d'onde (< 200 nm) n'est pas toujours de bonne qualité : ceci est dû à la non transparence du méthanol pour les longueurs d'onde inférieures à 200 nm. On peut d'ailleurs constater la présence à 198 nm d'un épaulement correspondant à la bande d'absorption du méthanol sur le spectre de la nitrocellulose montré ci-dessous (figure 35) :

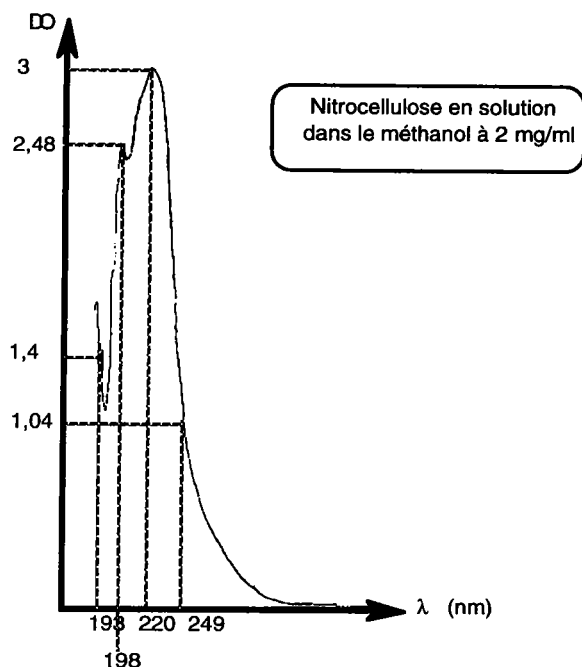


Figure 35. Spectre UV de la nitrocellulose en solution dans le méthanol à 2mg/ml

La même expérience a été effectuée sur un film de nitrocellulose obtenu à partir de la solution utilisée précédemment et après évaporation du solvant. Celui-ci a été réalisé directement sur l'une des faces transparentes de la cuve. Le spectre correspondant est montré ci-dessous (figure 36) :

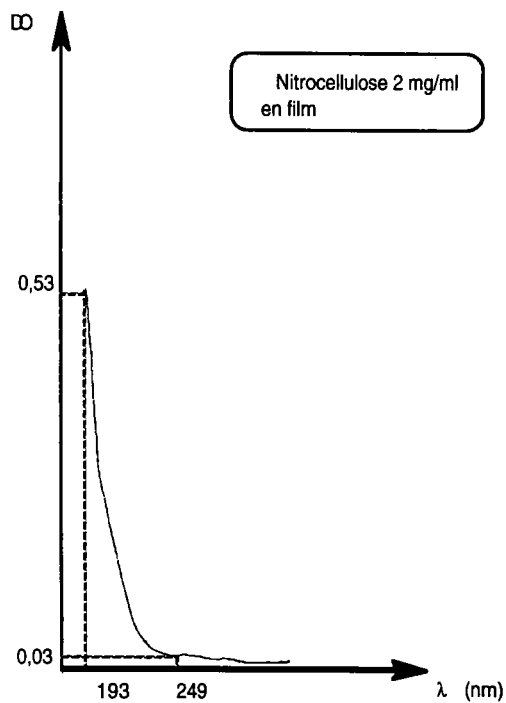


Figure 36. Spectre UV de la nitrocellulose en film

Mis à part les différences d'absorbances qui ne sont pas interprétables puisque les conditions opératoires ne sont pas les mêmes (film ou solution), ce qui nous intéresse ici est de constater un déplacement du maximum d'absorption vers les basses longueurs d'onde et spécialement à 193 nm, longueur d'onde du mélange ArF du laser excimère utilisé pour ioniser les solides en FTMS.

Cette différence peut s'interpréter par une modification de l'organisation des molécules dans l'espace et / ou de l'absence dans le cas du film des molécules de solvant qui complexent les molécules de matrices et peuvent perturber leur absorption vis à vis des rayonnements UV.

4.1.1.2 l'Acide Nicotinique

Ici, l'étude ne s'est effectuée que sur les solutions puisque la réalisation de films homogènes d'Acide Nicotinique est très difficile (matrice non polymérique).

Sur le spectre montré ci-dessous (figure 37), on constate un $\lambda_{\max} = 216$ nm pour un $\epsilon_{216} = 10200$ l.mol⁻¹.cm⁻¹. Par contre, aux longueurs d'onde qui nous intéressent, on observe respectivement à 193 et 249 nm des ϵ de 4400 et 2480 l.mol⁻¹.cm⁻¹.

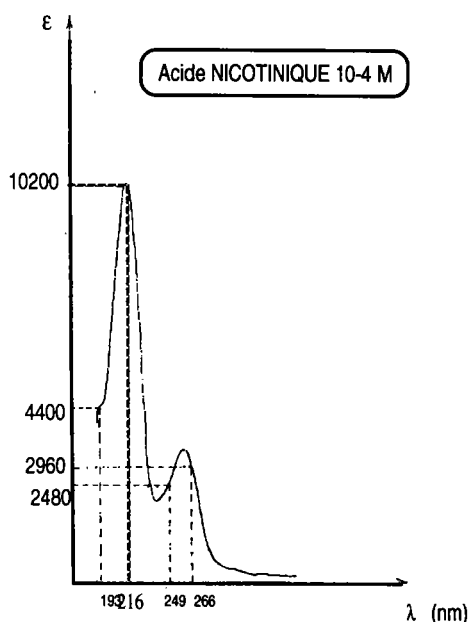


Figure 37. Spectre UV de l'acide nicotinique en solution dans le méthanol à 10⁻⁴M

4.1.1.3 les mélanges

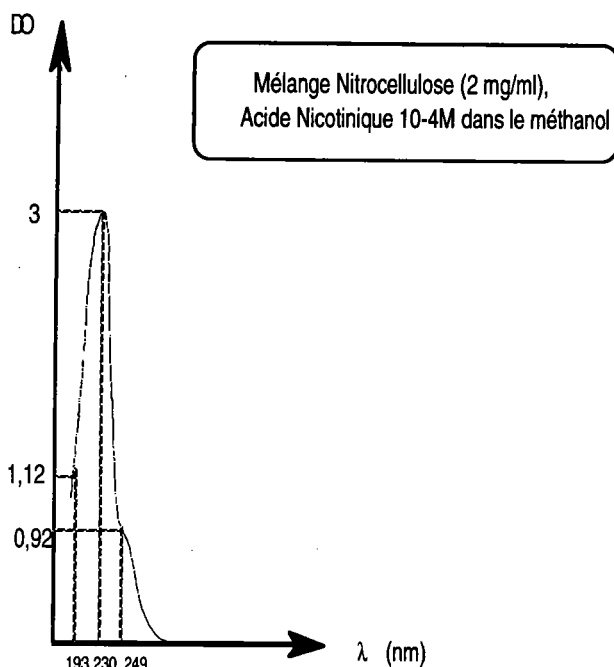


Figure 38. Spectre UV du mélange nitrocellulose /acide nicotinique en solution dans le méthanol

Le spectre d'un mélange (V/V) nitrocellulose (2 mg/ml) + acide nicotinique (10⁻⁴ M) est représenté figure 38. On constate à nouveau un décalage du maximum d'absorption vers les basses longueurs d'onde lors du passage de l'étude en solution à une étude en film. On passe ici d'un $\lambda_{\max} = 230$ nm à un $\lambda_{\max} = 190$ nm. Cependant, l'épaule débutant à 249 nm (représentatif de l'acide nicotinique) dans le spectre en solution, se trouve décalé vers le rouge et très amoindri dans le spectre en film. Ceci s'expliquerait par des interactions électroniques plus fortes entre les molécules en phase solide [70].

En fait, il est relativement difficile de comparer les coefficients d'absorption molaires de l'acide nicotinique et de la nitrocellulose du fait que l'on ne connaît pas la masse molaire de cette dernière (secret de fabrication). Cependant, cette étude nous montre que l'ajout d'acide nicotinique dans le film de nitrocellulose ne modifie pas considérablement le spectre du film de nitrocellulose pure. On peut donc en conclure que le coefficient d'absorption molaire de la nitrocellulose est bien plus grand que celui de l'acide nicotinique aux longueurs d'onde qui nous intéressent.

L'addition d'acide nicotinique à un film de nitrocellulose provoque une relative augmentation de la DO jusqu'à un certain seuil. Au dessus de cette valeur, on assiste à une diminution de la DO due à la présence dans les films de micro-cristaux (observation au microscope optique grossissement X100) conduisant à une inhomogénéité du film et provoquant ainsi des diffusions du rayonnement.

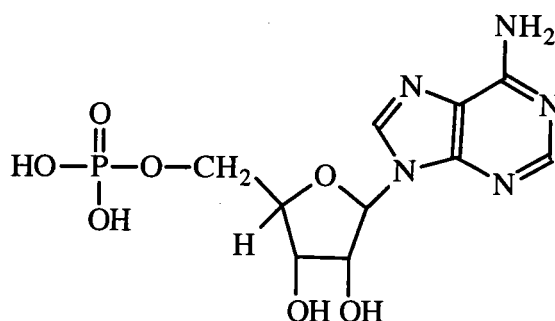
Il faudra donc lors de notre étude ultérieure en FTMS, en plus de l'utilisation d'une matrice de désorption, tenir compte de l'homogénéité du film qui est synonyme de reproductibilité des résultats. En effet, ce dernier point est, avec celui de la limite de détection, les deux objectifs que nous nous étions fixés.

En conclusion, l'optimisation de la composition et des paramètres spectroscopiques d'une matrice implique une étude obligatoire de celle-ci, d'une part en spectroscopie UV de manière à connaître les maxima d'absorption en film (condition d'étude en MALDI) et d'autre part, en microscopie optique pour s'assurer de l'homogénéité de la matrice.

La spectroscopie UV nous a permis de constater des décalages des maxima d'absorption lors de l'étude des matrices en film par rapport aux solutions. Les longueurs d'onde des bandes d'absorption des matrices en film correspondent à celles des lasers utilisés au laboratoire (193 et 249 nm).

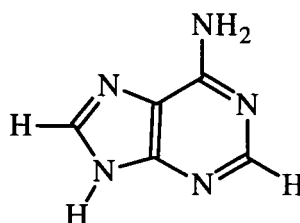
4.2 Etude par spectrométrie de masse

Un nucléotide (noté **M**) est constitué d'une base azotée, d'un ose et d'un ou plusieurs groupes phosphate. Dans notre cas, l'étude se portera essentiellement sur l'**adénosine monophosphate** (ne comportant qu'un groupe phosphate) :

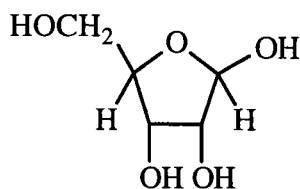


Le détail de la nomenclature est donné à partir de l'exemple de l'adénosine monophosphate (AMP) :

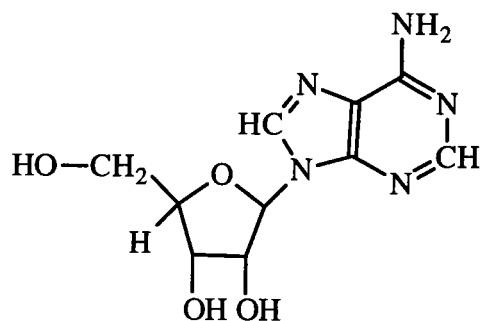
✓ une base azotée (notée (**B+H**)) : l'**adénine**



✓ un sucre : le **β -D-ribose**



On appelle nucléoside la molécule constituée d'une base liée à un pentose. Dans notre cas, c'est l'**adénosine** (notée **N**) :



✓ un groupement phosphate.

4.2.1 Désorption Laser de l'AMP à 249 nm

4.2.1.1 AMP pur

L'étude préliminaire de la désorption laser du nucléotide AMP déposé pur sur le porte-échantillon a donné les résultats suivants :

✓ en ions positifs ,

On n'obtient jamais le pic pseudo-moléculaire $(M+H)^+$ ($m/z = 348$) quelle que soit l'irradiance.

Le pic de la base $(B+2H)^+$ est le plus intense et l'on obtient après optimisation (irradiance de $5 \cdot 10^6 \text{ W/cm}^2$), le pic du nucléoside protoné et déshydraté $(N+H-H_2O)^+$ ($m/z = 250$) correspondant au nucléotide moins le groupement phosphate. En effet, la liaison ester est extrêmement fragile. Elle est systématiquement rompue à 249 nm. Ceci est due à l'absorption relativement importante du noyau de la base purique à cette longueur d'onde.

✓ en ions négatifs ,

On observe le pic de la base B^- ($m/z = 134$) et le pic pseudomoléculaire $(M-H)^-$ ($m/z = 346$).

Ces premières constatations ainsi que l'étude de la structure de la molécule d'AMP (avec notamment la liaison phospho-diester) nous ont conduit à l'idée de tester le concept de désorption laser assistée par matrice sur ces molécules.

4.2.1.2 AMP + Acide Nicotinique (AN)

✓ en ions positifs,

on obtient le pic moléculaire $(M+H)^+$, le nucléoside solvate par l'acide nicotinique $((NH-2 H_2O +AN)^+ : m/z = 354)$ et la base BH_2^+ pour une irradiance optimale de $10^6 W/cm^2$ (figure 39),

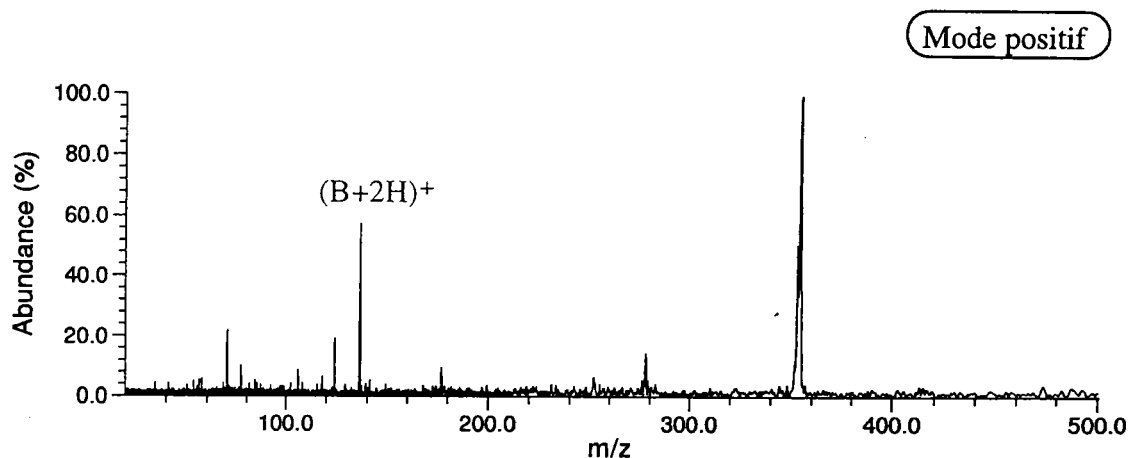


Figure 39. Spectre FTMS mode positif de l'AMP dans l'acide nicotinique à 249 nm

✓ en ions négatifs,

avec une irradiance optimale de $5.10^5 W/cm^2$ (plus faible qu'en ions positifs) , on obtient le pic pseudo-moléculaire majoritaire $(M-H)^-$ (figure 40),

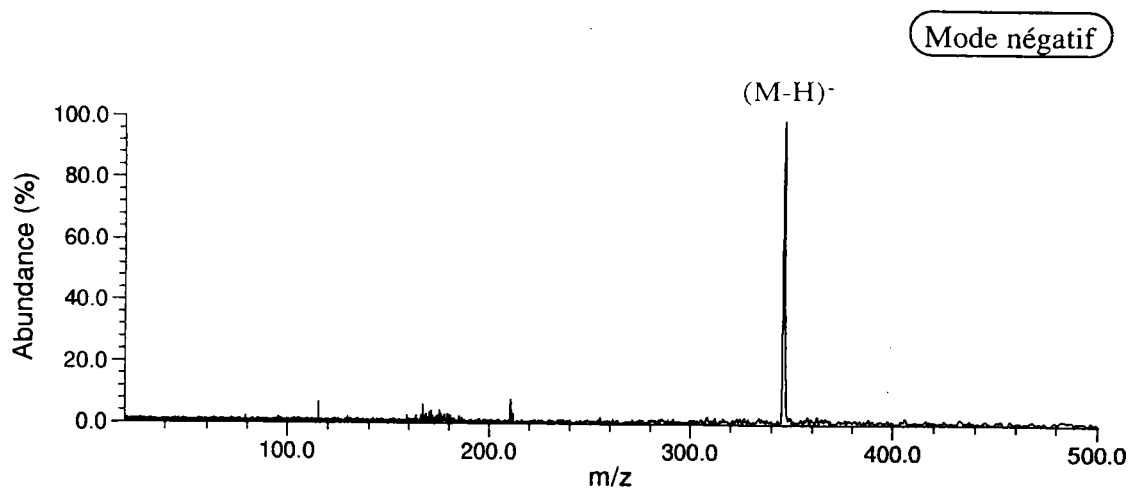


Figure 40. Spectre FTMS mode négatif de l'AMP dans l'acide nicotinique à 249 nm

4.2.1.3 AMP + Nitrocellulose (NC)

✓ en ions positifs,

avec une irradiance optimale de 10^7 W/cm^2 , on obtient la base protonée majoritaire, le nucléoside sous formes déshydratée $(\text{N}+\text{H}-\text{H}_2\text{O})^+$ ($m/z = 250$) et intacte $(\text{N}+\text{H})^+$ ($m/z = 268$) et la molécule protonée : $(\text{M}+\text{H})^+$ ($m/z 348$) (figure 41),

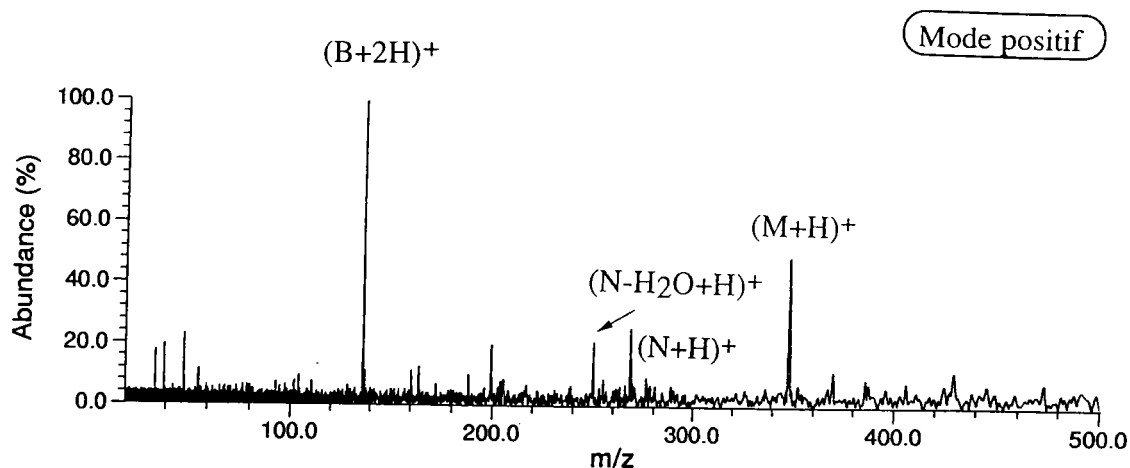


Figure 41. Spectre FTMS mode positif de l'AMP dans la nitrocellulose à 249 nm

✓ en ions négatifs,

le pic majoritaire est le pic du nucléotide $(\text{M}-\text{H})^-$ ($m/z = 346$) avec une irradiance optimale de 10^7 W/cm^2 (figure 42).

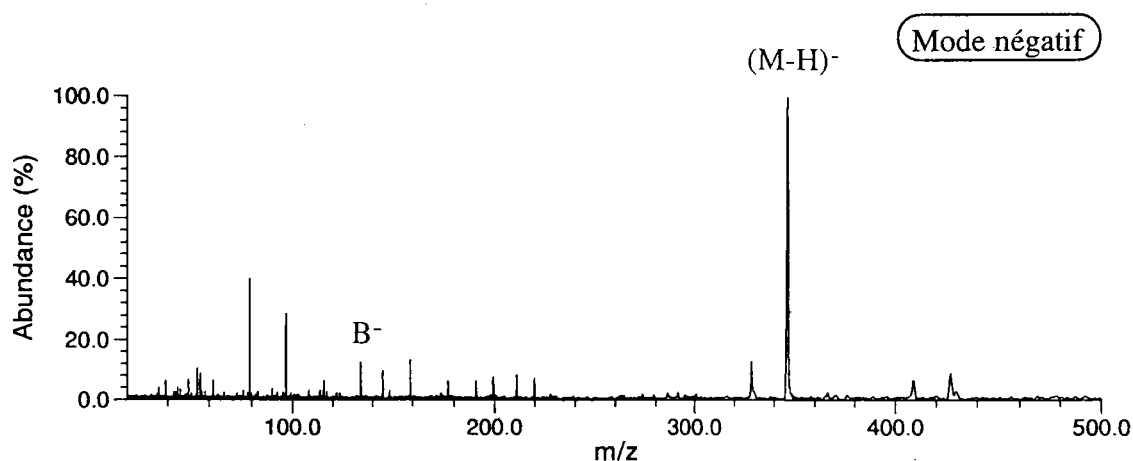


Figure 42. Spectre FTMS mode négatif de l'AMP dans la nitrocellulose à 249 nm

4.2.1.4 AMP + Benzophénone (BZ)

✓ en ions positifs,

on n'obtient pas le pic pseudo-moléculaire $(M+H)^+$. L'ionisation de la base $(B+2H)^+$ est maximale pour une irradiance de 5 à $7,5 \cdot 10^6 \text{ W/cm}^2$ (figure 43),

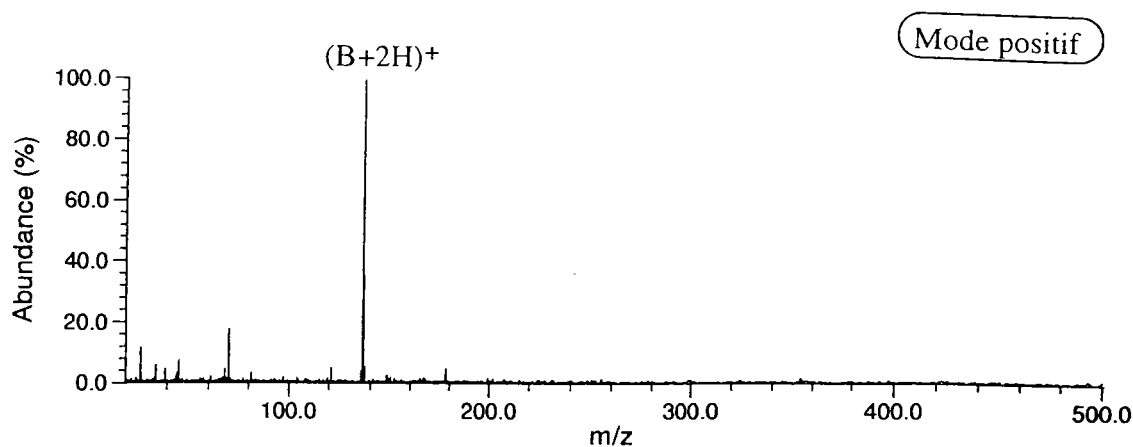


Figure 43. Spectre FTMS mode positif de l'AMP dans la benzophénone à 249 nm

✓ en ions négatifs,

on obtient le pic pseudo-moléculaire $(M-H)^-$ ($m/z = 346$) pour une irradiance optimale de $3,5 \cdot 10^6 \text{ W/cm}^2$ (figure 44).

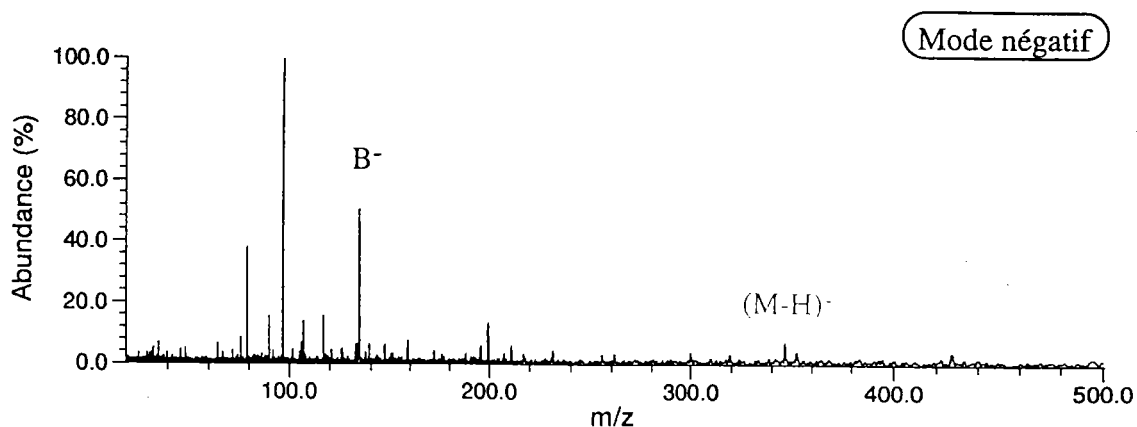


Figure 44. Spectre FTMS mode négatif de l'AMP dans la benzophénone à 249 nm

En conclusion : après l'analyse de la désorption du nucléotide dans ces trois matrices, il en ressort les constatations suivantes :

- ✓ la désorption du nucléotide en utilisant une molécule absorbante à 249 nm (benzophénone) ne donne pas l'ion pseudo-moléculaire en ions positifs mais la base protonée en grande quantité. Par contre, en ions négatifs, on obtient l'ion pseudo-moléculaire $(M-H)^-$ avec une intensité absolue beaucoup plus faible comparée à celles obtenues avec les autres matrices. Dans ce cas, il y a très peu de liaisons hydrogènes entre la molécule cible et les molécules de matrice. De ce fait, le transfert d'énergie entre ces deux types de molécules (matrice et cible) ne s'effectue pas bien,
- ✓ le pic pseudo-moléculaire $(M+H)^+$ est obtenu dans les conditions optimales d'irradiance avec une intensité absolue similaire en ions positifs que ce soit dans l'acide nicotinique ou la nitrocellulose,
- ✓ l'acide nicotinique solvate le nucléoside pour donner l'ion le plus abondant ($m/z = 354$) en ions positifs alors que l'on obtient les trois fragments (base, nucléoside déshydraté et nucléotide) dans la nitrocellulose, la base ou le nucléoside étant systématiquement majoritaires,
- ✓ en ions négatifs, l'ion majoritaire est l'ion moléculaire pour les deux matrices (NC et AN) et ce, avec des intensités absolues similaires.

Dans le cadre de l'optimisation de la désorption, on peut tirer les conclusions suivantes :

- ✓ la benzophénone n'est pas une bonne matrice à 249 nm (laser excimère) car elle n'évite pas la fragmentation du nucléotide en raison soit d'un mauvais transfert d'énergie, soit plus vraisemblablement d'un transfert trop important (phénomène de stacking ou d'empilement des cycles insaturés les uns sur les autres par interactions orbitales de la base nucléotidique et de la benzophénone) provoquant aussi la fragmentation du nucléotide,
- ✓ la nitrocellulose et l'acide nicotinique, malgré des coefficients d'absorption molaire plus faibles que l'AMP à 249 nm donnent de meilleurs résultats de désorption (obtention du pic pseudo-moléculaire dans les deux modes d'ionisation avec chaque fois des intensités absolues conséquentes),
- ✓ l'acide nicotinique semble jouer un rôle de solvatation et de donneur de

protons alors que la nitrocellulose paraît avoir un rôle d'homogénéisation de la molécule cible dans la matrice permettant un transfert d'énergie plus doux.

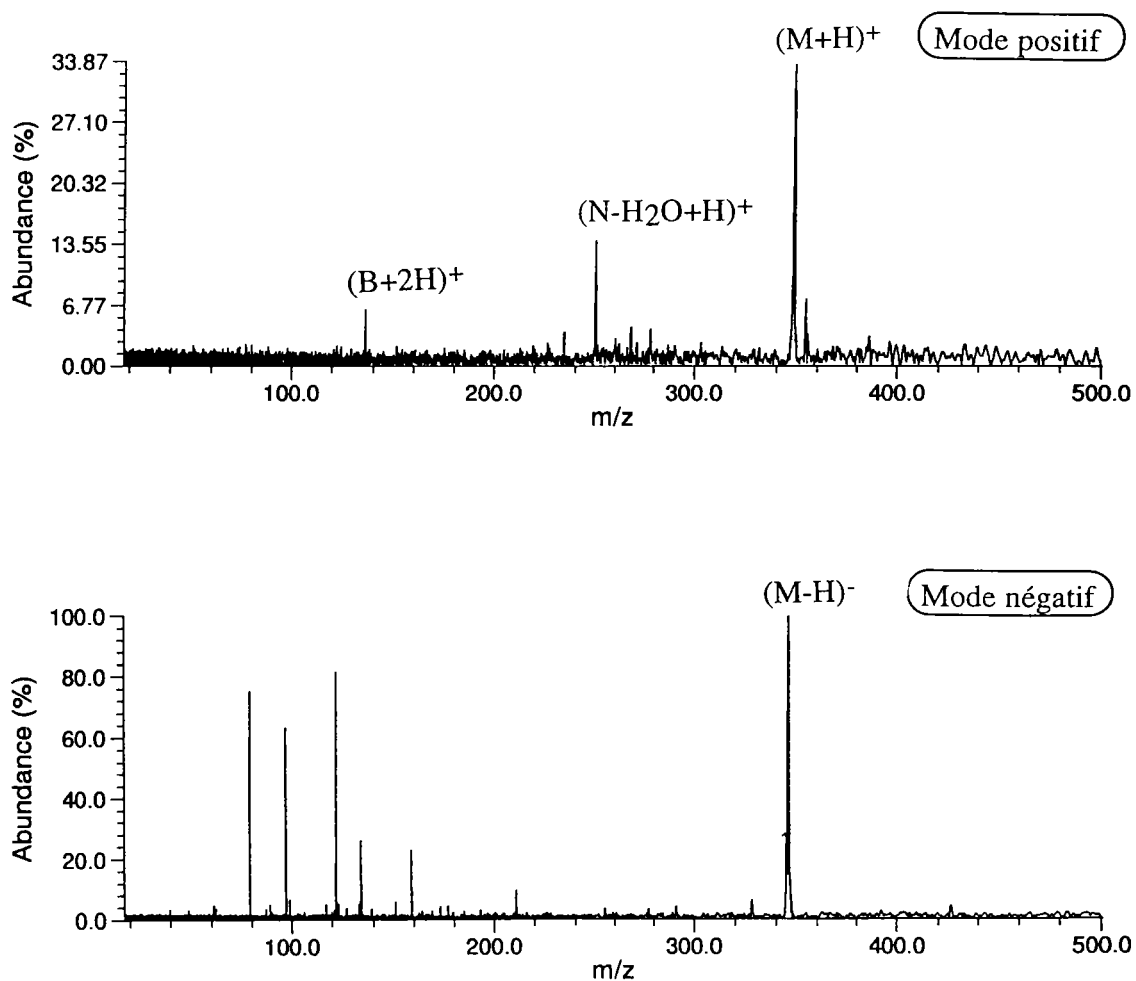


Figure 45. Spectre FTMS mode positif et négatif de l'AMP dans le mélange NC/AN à 249 nm

Nous avons vérifié les deux effets sur la désorption du nucléotide enrobé dans un mélange des deux matrices (NC/AN) :

- ✓ dans les deux modes d'ionisation, on obtient le pic moléculaire avec, en moyenne, une intensité plus forte (5 fois en ions positifs et 1,2 fois en ions négatifs) que celle obtenue lorsque le nucléotide est inclus dans l'une ou l'autre matrice (figure 45),
- ✓ la réponse et la reproductibilité sont accrues : on obtient le pic moléculaire après 1 pulse ou 50 pulses lasers successifs et à des endroits différents,
- ✓ une irradiance de 2.10^6W/cm^2 est requise pour obtenir une réponse spectrale reproductible.

Il apparaît donc que le mélange des deux matrices soit adapté pour l'optimisation de la désorption laser du nucléotide à 249 nm.

Cependant, si l'on peut prévoir le rôle de l'acide nicotinique par transfert de protons après solvatation de l'ion moléculaire de la molécule cible, on n'explique pas tout à fait le rôle de la nitrocellulose à cette longueur d'onde, ni l'effet de synergie du mélange des deux matrices NC/AN.

Aussi, il était intéressant d'effectuer des tests de désorption laser des nucléotides à 193 nm en utilisant des polymères, comme la nitrocellulose. Ceci devrait nous permettre d'optimiser les paramètres de la désorption.

4.2.2 Désorption Laser de l'AMP à 193 nm

Nous avons étudié deux types de polymères : la nitrocellulose (NC) et le polyéthylène succinate (PES) ainsi que l'acide nicotinique (AN) seul ou mélangé à ces deux polymères.

L'étude de l'AMP déposé pur sur le porte échantillon, donne des résultats semblables à ceux obtenus à 249 nm. On peut seulement noter qu'en ions négatifs, l'intensité du pic $(\text{M-H})^-$ est supérieure à celle obtenue à 249 nm. Enfin, dans les deux modes d'ionisation (positif et négatif), on constate une fragmentation moindre qu'à 249 nm.

4.2.2.1 AMP + NC

La désorption du nucléotide AMP inclus dans la nitrocellulose a été étudiée en faisant varier la concentration en nitrocellulose.

Trois expériences ont été réalisées avec 3 concentrations différentes en nitrocellulose (3 mg/ml - 6 mg/ml - 8 mg/ml dans l'éthanol, le méthanol et la butanone respectivement) pour la même concentration ($5 \cdot 10^{-4}M$) en AMP finale (c'est à dire après mélange des deux solutions).

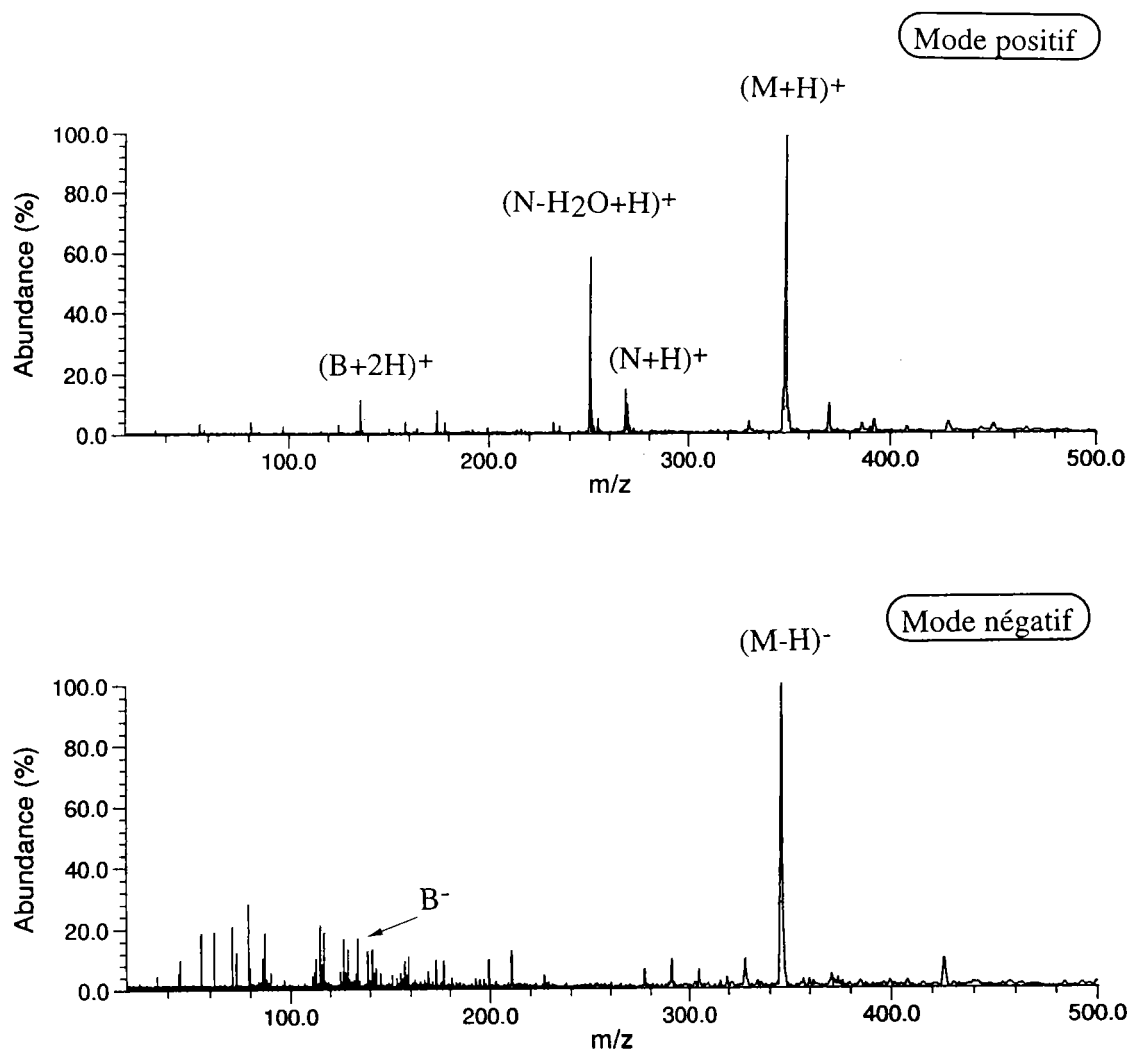


Figure 46. Spectres FTMS en mode positif et négatif de l'AMP dans la NC à 193 nm. Solvant utilisé : la butanone.

L'examen des spectres montre que :

- ✓ l'expérience à 6 mg/ml dans le méthanol donne le moins bon résultat. L'intensité absolue des pics pseudo-moléculaires dans les deux modes d'ionisation est 2 fois moins importante que celles obtenues avec les 2 concentrations en NC dans l'éthanol et la butanone,

- ✓ les intensités absolues moyennes des pics pseudo-moléculaires sont 2 fois supérieures à celles obtenues pour la concentration à 6 mg/ml dans le méthanol,
- ✓ l'expérience avec 8 mg/ml de NC dans la butanone (figure 46) donne les résultats les plus reproductibles et après optimisation (irradiance, éjection) fournit la meilleure réponse de l'ion pseudo-moléculaire $(M+H)^+$ avec une intensité 2 fois plus forte que celle obtenue dans l'expérience à 3 mg/ml dans l'éthanol,
- ✓ l'irradiance optimale d'obtention des pics moléculaires est de $2,5 \cdot 10^6 \text{W/cm}^2$ en ions positifs et en ions négatifs quelle que soit la concentration,
- ✓ la réponse est reproductible sur 50 impacts successifs.

4.2.2.2 AMP + AN

L'AMP à une concentration finale de $1,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ inclus dans l'acide nicotinique, donne une meilleure réponse en ions positifs qu'en ions négatifs :

- ✓ en ions positifs,

l'ion pseudo-moléculaire est obtenu avec une intensité absolue maximale similaire à celle obtenue pour l'AMP à $5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ dans NC/méthanol (donc 3 fois plus intense relativement) avec une irradiance optimale de 10^{-6}W/cm^2 (figure 47). De plus, la réponse est reproductible sur 5 impacts.

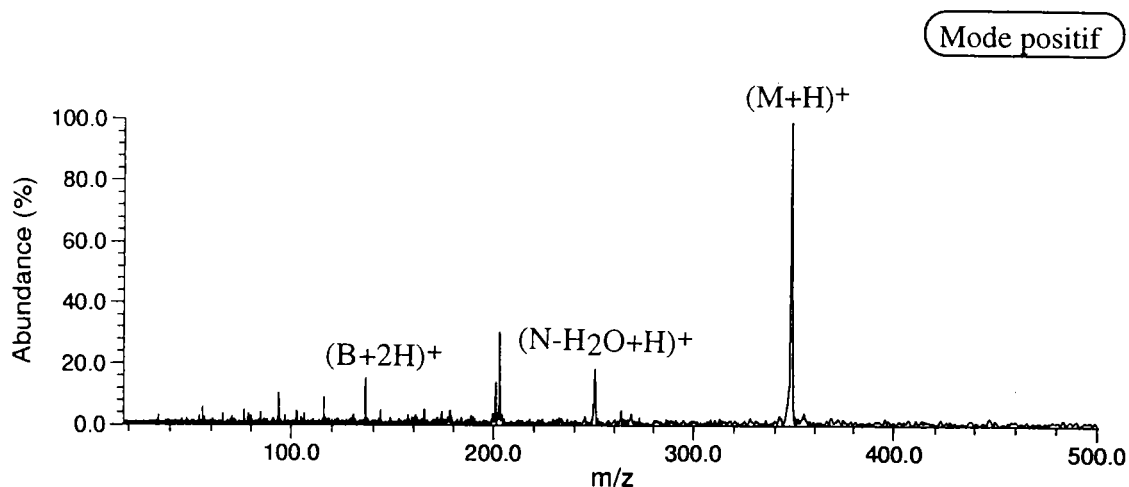


Figure 47. Spectres FTMS en mode positif de l'AMP dans l'AN à 193 nm.

✓ en ions négatifs,

la réponse de l'ion moléculaire est 5 fois moins intense qu'en ions positifs (figure 48).

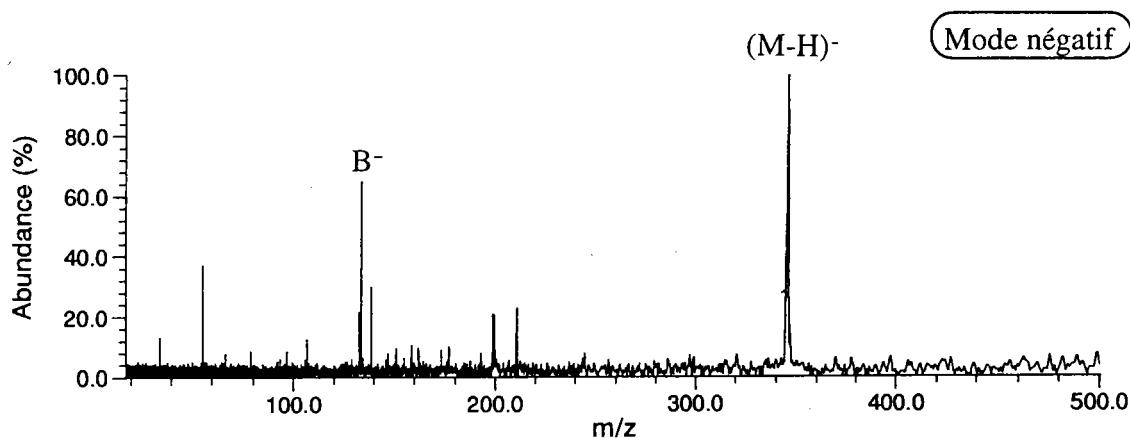


Figure 48. Spectres FTMS en mode négatif de l'AMP dans l'AN à 193 nm.

4.2.2.3 AMP + PES

Deux expériences ont été réalisées avec 2 concentrations de PES dans la butanone (0,5 mg/ml - 2 mg/ml (saturé)) avec une concentration finale en AMP de $5 \cdot 10^{-4}$ M. D'autres concentrations (> 2 mg/ml) ne sont pas envisageables dans ce cas. En effet, le PES n'est plus soluble (notamment dans la butanone). Le PES est quant à lui très peu soluble dans le méthanol ou l'éthanol par exemple.

Les 2 manipulations donnent des résultats similaires :

✓ en ions positifs,

on obtient une intensité absolue optimale du pic pseudo-moléculaire similaire à celle obtenue avec NC dans le méthanol et donc, 2 fois inférieure aux résultats obtenus avec NC dans l'éthanol et la butanone avec une irradiance optimale de désorption de 10^{-6} W/cm² (figure 49),

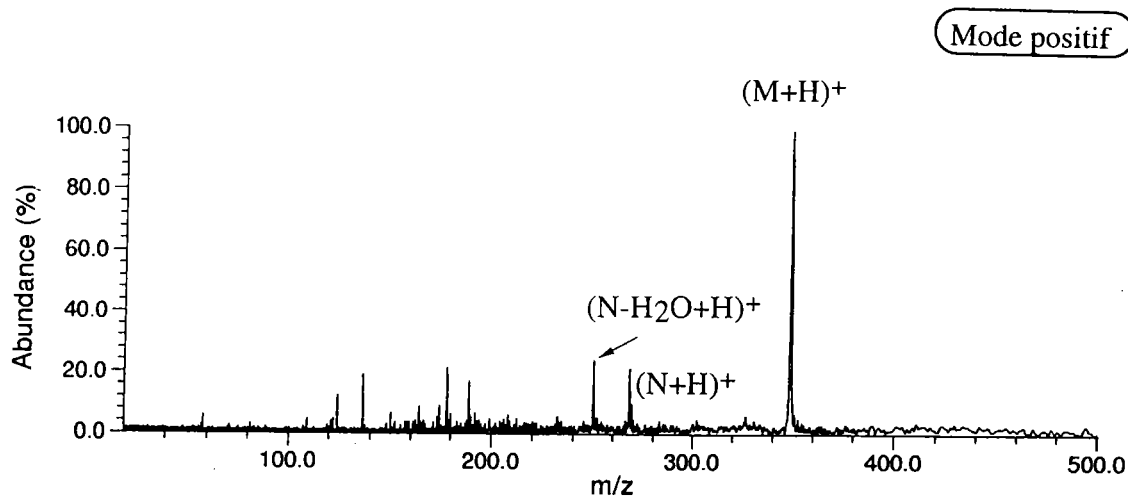


Figure 49. Spectres FTMS en mode positif de l'AMP dans le PES à 193 nm.

✓ en ions négatifs,

la réponse du pic de $(M-H)^-$ est plus intense qu'en ions positifs avec une irradiance optimale de 10^{-6} W/cm² et une intensité absolue du pic pseudo-moléculaire 5 fois plus intense que celle obtenue avec NC dans l'éthanol (figure 50),

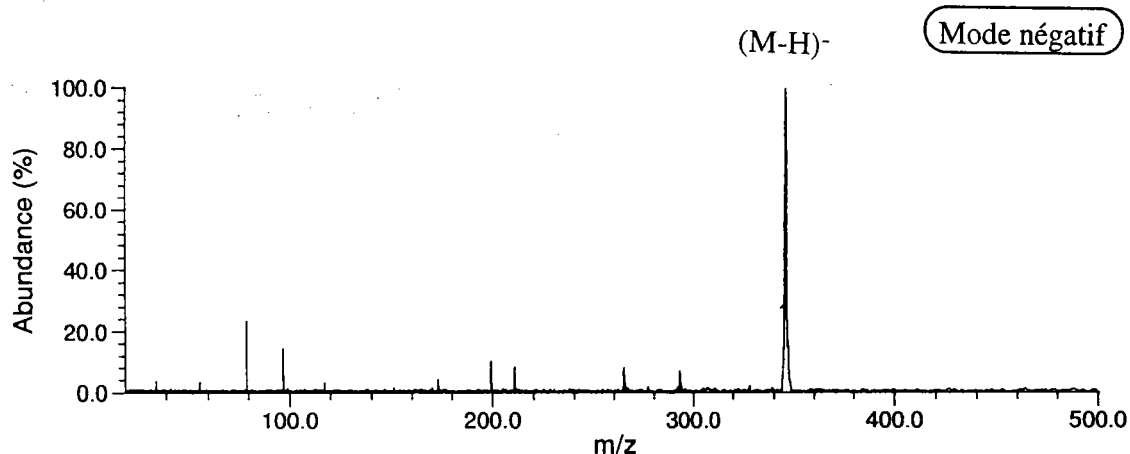


Figure 50. Spectres FTMS en mode négatif de l'AMP dans le PES à 193 nm.

✓ la réponse est reproductible sur 30 impacts consécutifs en ions négatifs.

4.2.3 Optimisation de la désorption du nucléotide

Des résultats précédents à 249 nm et 193 nm, on peut tirer les conclusions suivantes dans le but d'optimiser la désorption de l'AMP :

- ✓ le rendement d'ionisation de l'ion pseudo-moléculaire et de la base est supérieur à 193 nm par rapport à 249 nm quelles que soient les matrices,
- ✓ la désorption est optimale avec des matrices polymériques (en ions positifs pour le mélange NC / AN et en ions négatifs pour le PES),
- ✓ la fragmentation est limitée et la réponse plus reproductible à 193 nm et ceci quel que soit le polymère (NC ou PES).

De ce fait, il était intéressant d'observer le comportement du nucléotide AMP dans un mélange d'une matrice polymérique (NC ou PES) et d'une matrice donneuse de protons (AN), notamment pour vérifier l'apport de cette dernière sur la protonation de la molécule.

4.2.3.1 AMP + NC + AN

Un mélange des 2 matrices avec l'AMP à une concentration finale en AMP de $1,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ a été étudié et a donné les résultats suivants :

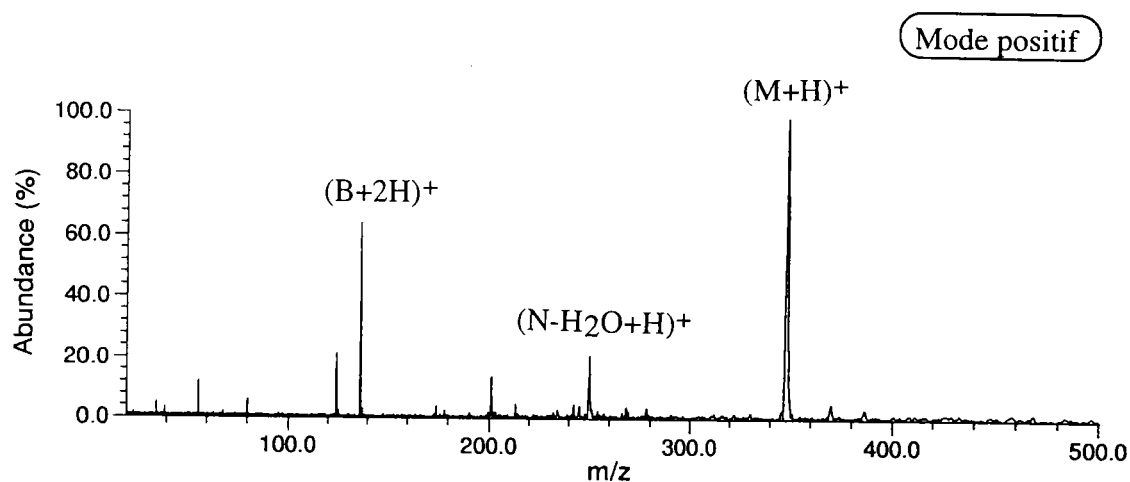


Figure 51. Spectres FTMS en mode positif de l'AMP dans le mélange NC/AN à 193 nm.

✓ en ions positifs,

on obtient en moyenne (à concentration égale en AMP) une intensité de l'ion pseudo-moléculaire 8 à 10 fois plus élevée que celle obtenue avec la NC et 4 fois plus élevée que celle obtenue avec AN seul avec une irradiance optimale de $3 \cdot 10^6$ W/cm² (figure 51),

✓ en ions négatifs,

on obtient un pic pseudo-moléculaire avec une intensité absolue 2 fois plus intense que celle obtenue avec NC et 2 fois moins élevée que celle obtenue avec le PES séparément (figure 52),

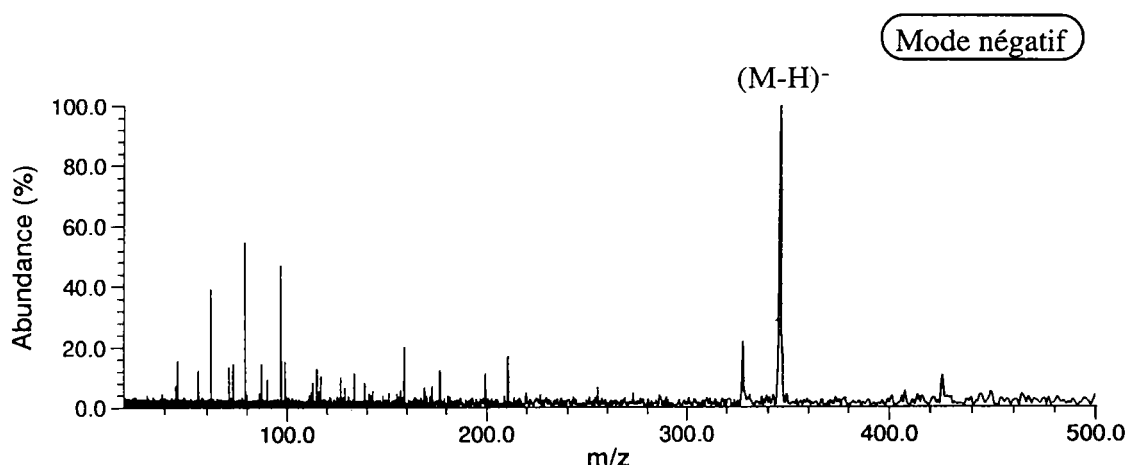


Figure 52. Spectres FTMS en mode négatif de l'AMP dans le mélange NC/AN à 193 nm.

✓ la réponse est bonne jusqu'à 50 impacts successifs.

4.2.3.2 AMP + PES + AN

Un mélange des 2 matrices avec l'AMP avec une concentration finale en AMP de $1,5 \cdot 10^{-4}$ M a été réalisé et étudié. En comparaison avec le mélange AMP/NC/AN, on obtient les résultats suivants :

✓ en ions positifs,

l'intensité absolue maximale obtenue pour le pic pseudo-moléculaire avec une irradiance de 10^6 W/cm² est inférieure de 20% à celle obtenue avec le mélange AMP/NC/AN et 8 à 10 fois supérieure à celle obtenue pour le mélange AMP/PES (figure 53),

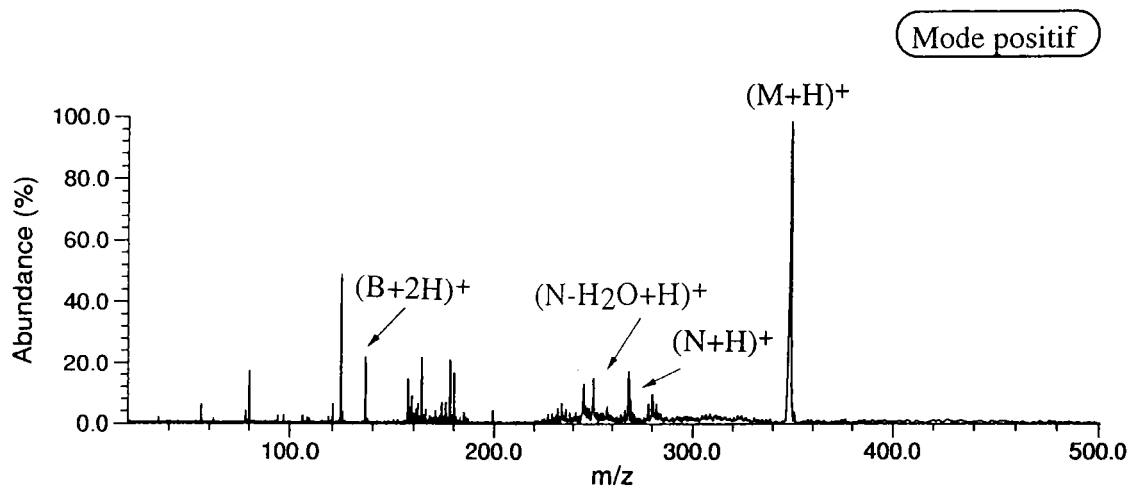


Figure 53. Spectres FTMS en mode positif de l'AMP dans le mélange PES/AN à 193 nm.

✓ en ions négatifs,

l'intensité du pic de $(M-H)^-$ est 6 fois supérieure à celle obtenue pour le mélange AMP/NC/AN et 2 à 3 fois plus intense que celle obtenue avec AMP/PES avec une irradiance optimale de 10^6 W/cm² (figure 54).

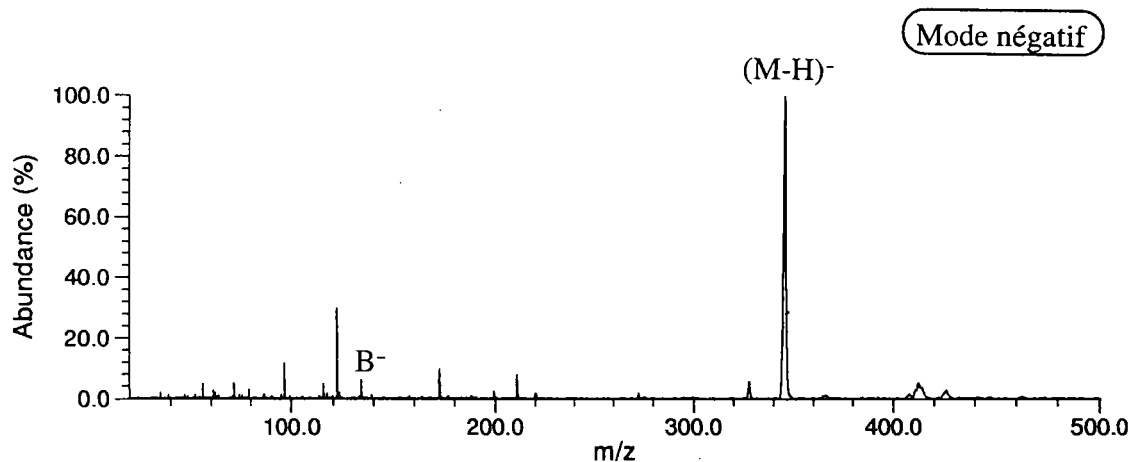


Figure 54. Spectres FTMS en mode négatif de l'AMP dans le mélange PES/AN à 193 nm

Ces résultats nous permettent de tirer les conclusions suivantes quant à l'optimisation de la désorption laser assistée par matrice du nucléotide AMP :

- ✓ la désorption laser de l'AMP est meilleure à 193 nm qu'à 249 nm et ce, quelle que soit la matrice polymérique utilisée,
- ✓ la désorption est meilleure avec une matrice polymérique ayant de bonnes propriétés d'ablation à 193 nm (exemple : mélange NC/AN),
- ✓ l'acide nicotinique augmente la réponse de l'ion pseudo-moléculaire, notamment en ions positifs pour le mélange AMP/NC/AN et en ions négatifs pour le mélange AMP/PES/AN par rapport aux mélanges sans AN correspondants,
- ✓ le mélange AMP/NC/AN fournit globalement les meilleures réponses dans les deux modes d'ionisation et une meilleure reproductibilité,
- ✓ la fragmentation est minimale et plus facilement maîtrisable à 193 nm qu'à 249 nm (variation de l'irradiance).

On peut donc conclure en essayant de donner, à ce niveau d'avancement des travaux, des conditions optimales de désorption, à la fois au niveau des conditions opératoires et de la matrice utilisée :

- ✓ Il apparaît qu'il est préférable de travailler en mode réflexion (meilleur contrôle de l'énergie déposée sur l'échantillon) et à 193 nm,
- ✓ en ce qui concerne la matrice, le mélange Nitrocellulose + Acide nicotinique semble être la meilleure matrice pour désorber l'AMP.

Nous allons donc essayer d'évaluer les potentialités de ce mélange à 193 nm sur diverses molécules.

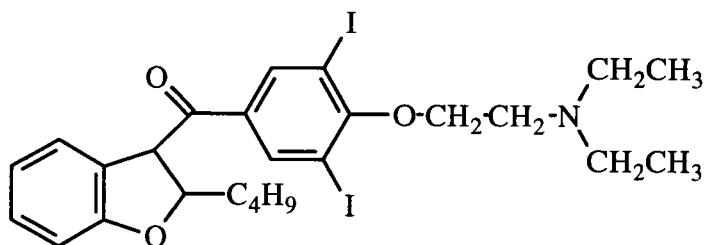
4.3 Utilisation du mélange NC/AN pour caractériser diverses molécules

Nous avons voulu étudier les capacités de détection de différents types de molécules à l'aide de la matrice mise au point sur l'AMP.

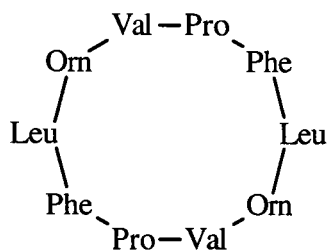
Pour se faire, de nombreuses molécules ont été analysées dans les conditions décrites au début de cette partie. Nous allons présenter à ce niveau trois exemples pour montrer les potentialités et les limites de cette matrice.

4.3.1 Les molécules étudiées

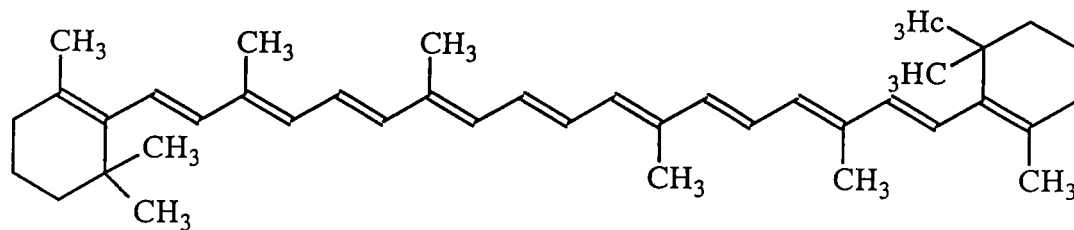
L'amiodarone est un médicament utilisé dans le traitement de certaines maladies cardiaques et qui présente à la fois un caractère lipophile et hydrophile. Sa masse moléculaire est de : 645,3 Da



La gramicidine S est un peptide "classique" en spectrométrie de masse. Il est utilisé dans de nombreux cas comme calibrant interne ou externe. Sa masse moléculaire est de : 1141,7 Da



Le β -carotène fait partie de la famille des provitamines A1. Il est utilisé dans les systèmes biologiques comme antioxydant. Il présente (par rapport aux deux autres molécules) la spécificité d'être apolaire. Sa masse moléculaire est de 536,9 Da.



4.3.2 Résultats expérimentaux

La préparation des échantillons pour chacune des trois molécules étudiées a été identique. On solubilise les composants de la matrice (NC à 10 mg/ml et AN à $10^{-4}M$) et de la molécule cible ($10^{-4} M$) dans le méthanol. On réalise un mélange équimoléculaire des trois solutions précédentes. Après homogénéisation de la solution résultante, on en prélève 100 μ l que l'on dépose sur un porte échantillon de 1 cm de diamètre. Enfin on évapore le solvant pour obtenir un film homogène.

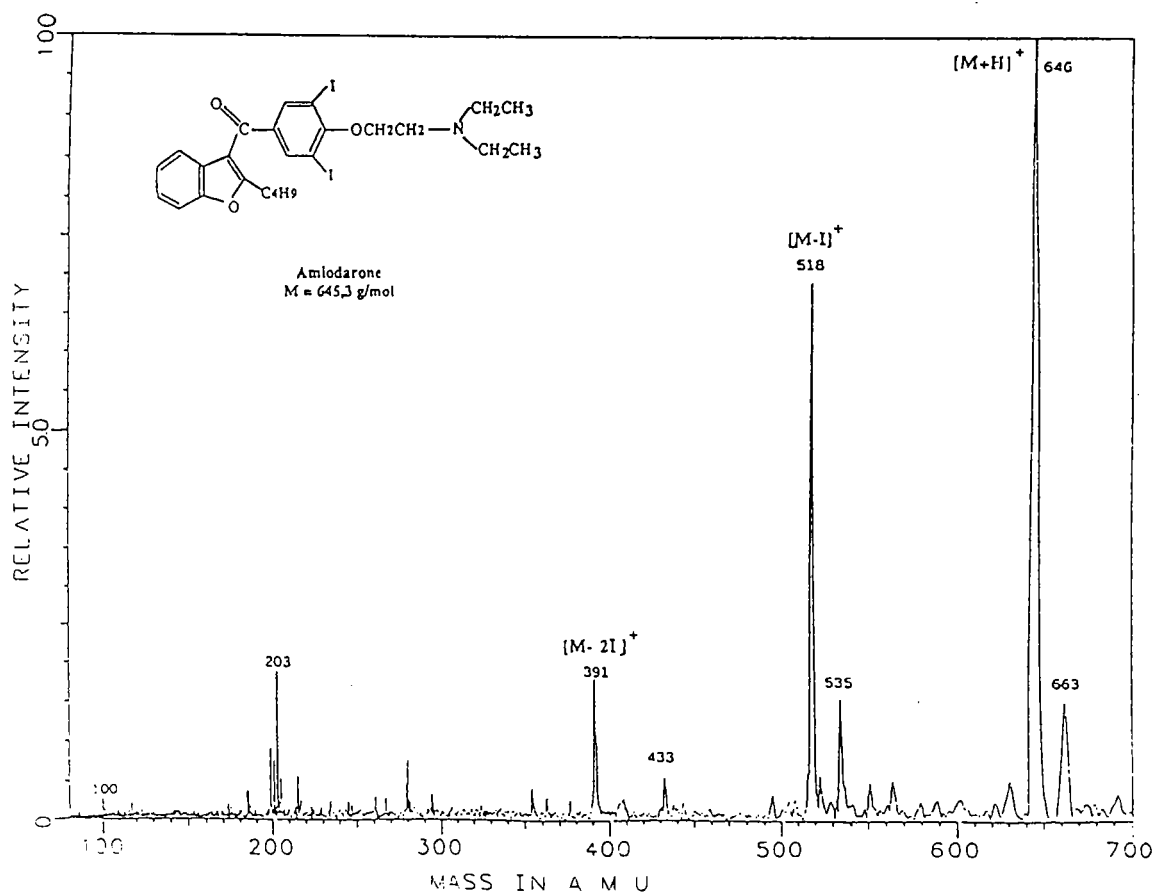


Figure 55. Spectre FTMS de l'amiodarone dans le mélange NC/AN à 193 nm

On constate une détection de l'amiodarone caractérisée par :

- ✓ un bon rapport signal/bruit,
- ✓ peu de pics de matrice,
- ✓ une faible fragmentation qui ne concerne que l'iode qui est très labile (la force de la liaison $\text{CH}_3\text{-I}$ est de 57 kcal mol⁻¹ alors qu'elle est de 110 kcal mol⁻¹ pour la liaison $\text{CH}_3\text{-F}$).

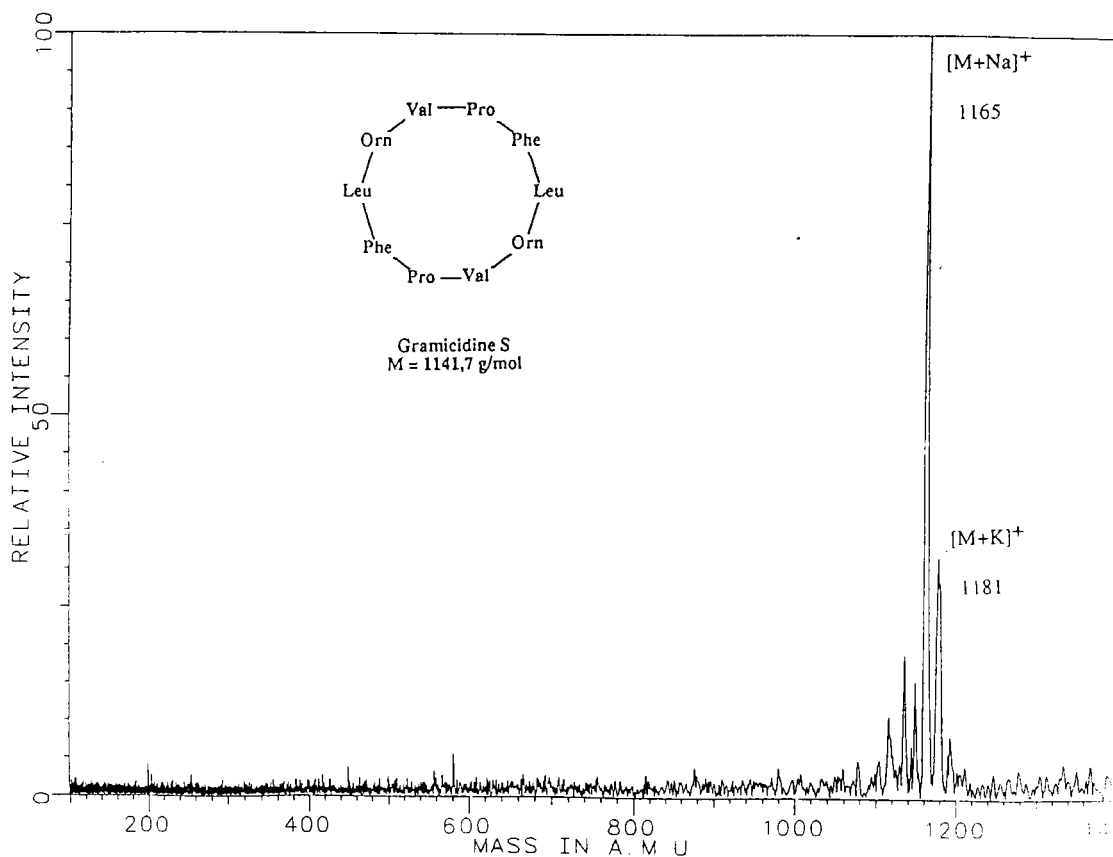


Figure 56. Spectre FTMS de la Gramicidine S dans le mélange NC/AN à 193 nm

La détection de la gramicidine se fait dans de très bonnes conditions. Elle est caractérisée par :

- ✓ un bon rapport signal/bruit,
- ✓ pas de pics de matrice,
- ✓ Pas de fragmentation.

Par contre, les essais d'analyse du β -carotène n'ont donné aucun résultat. Il apparaît que, dans ces conditions, l'étude de molécules apolaires n'est pas favorable. Ceci est d'ailleurs à mettre en corrélation avec d'autres résultats de désorption (ou ablation) laser. En effet, ce type de molécules donne des résultats médiocres à la fois en désorption laser et en MALDI. L'une des explications possible est l'absence de liaisons hydrogènes entre la matrice et les molécules cibles rendant le transfert d'énergie aléatoire.

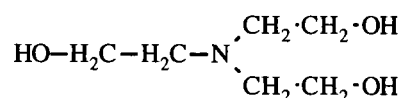
4.4 Application du MALDI à l'étude de molécules volatiles

Cette étude consistait à mettre au point une méthode de détection de deux molécules organiques présentes à l'état de traces (300 ppm) dans un mélange inorganique complexe : les ciments. Ce travail a été réalisé en étroite collaboration avec la société des "Ciments Français" qui a par ailleurs contribué à son financement.

Le premier problème que nous avons rencontré lors de cette étude est la volatilité des molécules à étudier. Lors du passage des échantillons dans la chambre d'échantillonnage, avant l'introduction de ceux-ci dans l'enceinte même du spectromètre de masse, il y a volatilisation des molécules (essentiellement lors de l'étude des produits purs). De ce fait, il est impossible d'obtenir l'empreinte spectrale de ces molécules. Ils nous est apparu judicieux de "piéger" ces molécules dans une matrice de manière à limiter leur volatilisation.

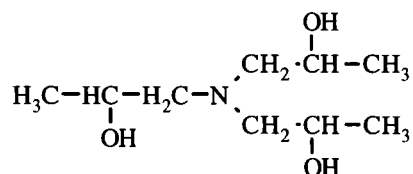
4.1.1 Molécules étudiées

- ✓ La triéthanolamine (TEA) M = 149 g/mole



Elle se présente sous forme d'un produit visqueux. Son point de fusion est de 22°C. Elle est essentiellement soluble dans l'eau et les alcools. Elle est très hygroscopique.

- ✓ La triisopropanolamine (TIPA) M = 191 g/mole



Elle se présente sous forme de poudre qui a rapidement tendance à s'hydrater pour devenir visqueuse. Son point de fusion est de 58 °C.

4.1.2 *Choix de la méthode*

L'analyse FTMS par désorption laser a été conçue pour l'étude d'échantillons solides. Or les molécules organiques pures ne répondent pas à ce critère. En effet, la TEA notamment possède un point de fusion très bas (environ 22°C), elle se présente sous forme d'un produit liquide visqueux à la température ambiante.

D'autre part, l'analyse haute résolution par FTMS nécessite une pression résiduelle dans le spectromètre très basse ($< 10^{-9}$ Torr). Or ces deux molécules présentent des pressions de vapeur faibles interdisant leur étude par dépôt direct sur support métallique (condition classique de la désorption laser). Afin de remédier à ce problème, nous avons utilisé la méthode de Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI).

4.1.3 *Mode opératoire*

Nous avons solubilisé la TEA et la TIPA dans du méthanol à une concentration de 10^{-5} M. Nous prélevons ensuite 1 ml de cette solution que l'on mélange avec 1 ml de solution de matrice (nitrocellulose à 10 mg/ml). La solution a donc une concentration finale en molécules cibles de $5 \cdot 10^{-6}$ M.

4.1.4 *Résultats et discussions*

L'analyse de ces spectres permet de conclure à une détection efficace des molécules dans la nitrocellulose à une concentration très faible ($5 \cdot 10^{-6}$ mol/l). Dans le cas de la TIPA (figure 6), en mode positif, nous pouvons observer les pics correspondants à $(M+H)^+$, $(M+Na)^+$ et $(M+K)^+$. Ces pics pseudo-moléculaires sont très fréquents en désorption laser. En mode négatif, nous confirmons la présence de TIPA par l'apparition du pic $(M-H)^-$. Le pic à $m/z = 147$ en mode négatif est attribuable à la nitrocellulose. Il en est de même pour la molécule de TEA (figure 57).

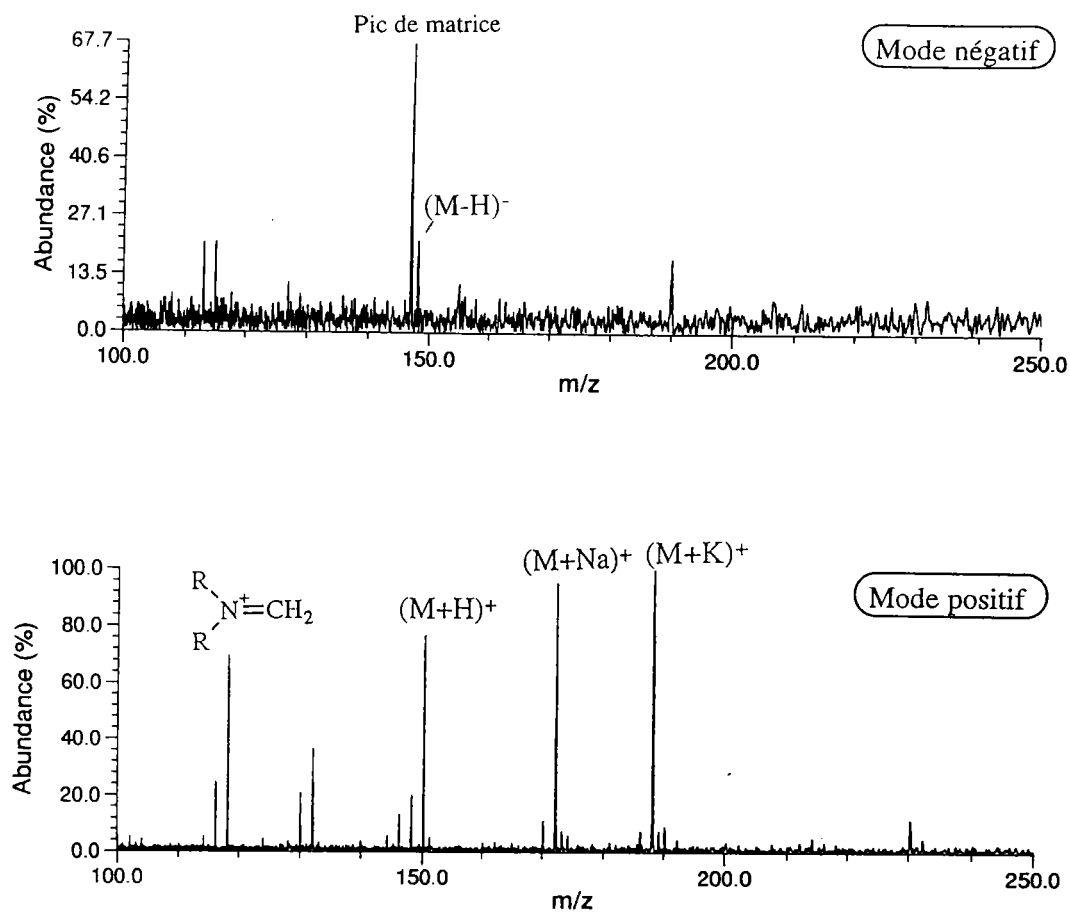
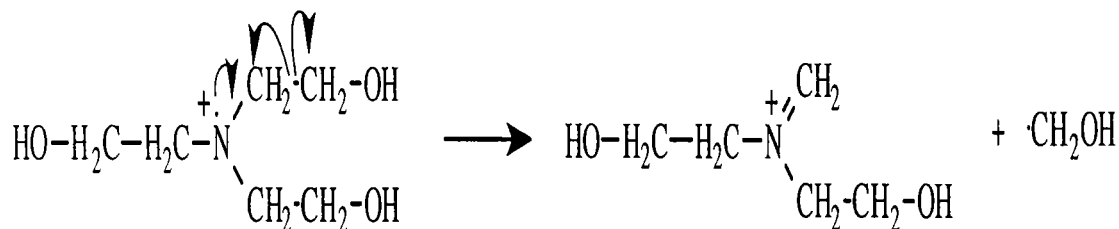


Figure 57. Spectres de la TEA dans la nitrocellulose en mode positif (57.a) et en mode négatif (57.b).

De plus, nous observons une fragmentation caractéristique à $m/z=118$ correspondant à la perte d'un groupement CH_2OH pour la TEA :



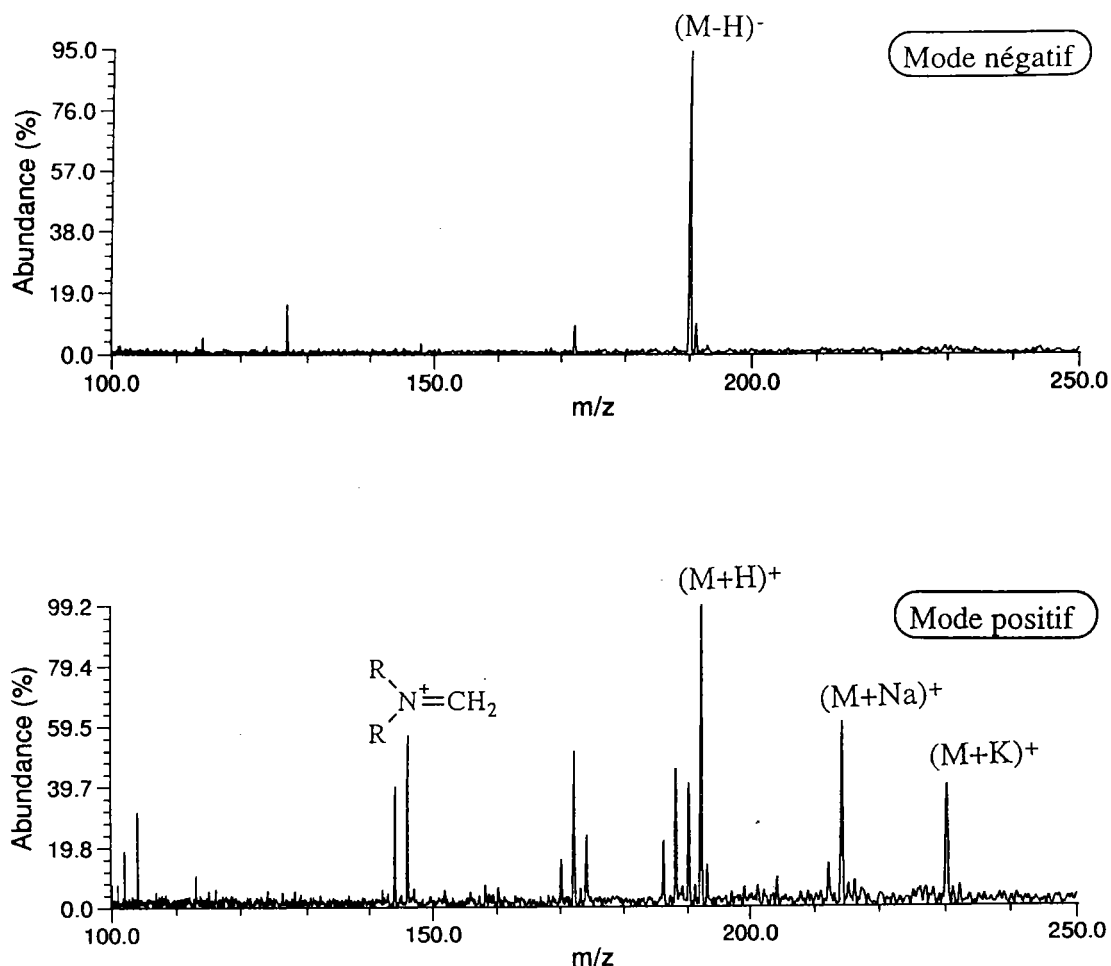
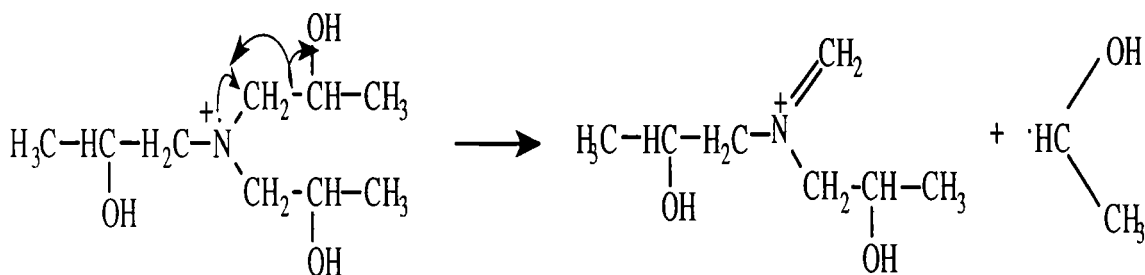


Figure 58. Spectres de la TIPA dans la nitrocellulose en mode positif (58.a) et en mode négatif (58.b).

Ainsi que la perte du groupe CHOH-CH_3 pour la TIPA qui donne un fragment à la masse $m/z = 146$.



Enfin, la détection de ces deux molécules est bien meilleure en mode positif.

4.1.5 Conclusion

L'utilisation d'une matrice (notamment polymérique) apparaît être une bonne stratégie pour l'analyse de molécules présentant des tensions de vapeur faibles. En effet des essais d'analyse de ces produits dans des conditions de désorption laser "traditionnelle" n'avaient donné aucun résultat.

Les nombreuses liaisons hydrogènes existant entre les molécules de matrice et la molécule cible (TEA ou TIPA) vont permettre de "fixer" cette dernière sur le porte échantillon et de ce fait limiter sa volatilité.

4.5 Bibliographie

- [6] Lazare S, Granier V, Laser Chem, 1989, 10, 25
- [68] Granier V., Photoablation et modifications de surface de polymères à l'aide du rayonnement UV-lointain, Thèse de l'Université de Bordeaux I, 1989
- [69] Beavis R.C, Chait B.T, 37th ASMS Conference on mass spectrometry and Allied Topics, Miami Beach, FL, USA, 1989
- [70] Sugitani Y., Takei T., Yamada T., Anal. Sciences, 1988, 4, 215

5. Etude comparée de l'ablation/ionisation laser et de la Pyrolyse/GC/MS des matrices MALDI.

Parmi les acides les plus fréquemment employés comme matrices, on peut citer l'acide α cyano-4-hydroxycinnamique et l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque. Nous avons voulu, dans cette partie, évaluer quelles étaient les principales molécules neutres et ionisées formées lors de l'ablation laser de ce type d'acides.

On émet l'hypothèse que les molécules générées lors de l'impulsion laser (et libérées dans le vide) ont une grande vitesse d'éjection et facilitent par conséquent la désorption des molécules cibles.

Le tableau ci-après recense, parmi les acides les plus étudiés en MALDI, ceux que nous avons sélectionné pour cette étude.

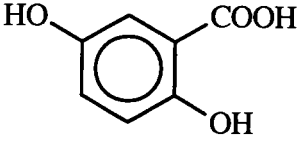
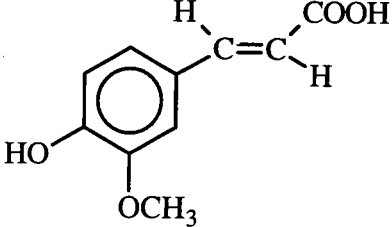
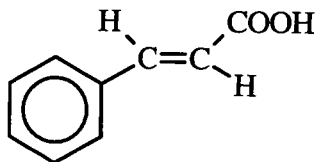
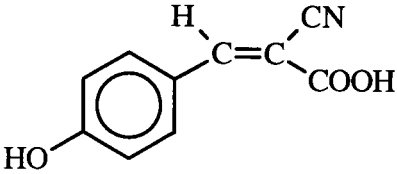
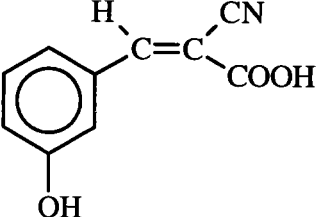
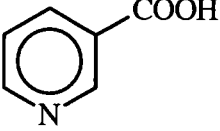
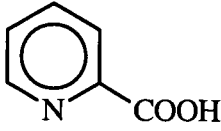
 <p>Acide 2,5-Dihydroxybenzoïque $\lambda = 355 \text{ nm}$</p>	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ <p>Acide Succinique $\lambda = 355 \text{ nm}$</p>
 <p>Acide Ferulique $\lambda = 355 \text{ nm}$</p>	 <p>Acide Cinnamique $\lambda = 355 \text{ nm}$</p>
 <p>Acide α cyano-4-hydroxycinnamique $\lambda = 355 \text{ nm}$</p>	 <p>Acide α cyano-3-hydroxycinnamique $\lambda = 355 \text{ nm}$</p>
 <p>Acide Nicotinique $\lambda = 266 \text{ nm}$</p>	 <p>Acide Picolinique $\lambda = 266 \text{ nm}$</p>

Tableau 6. Matrices utilisées au cours de cette étude. λ représente la longueur d'onde à laquelle nous avons étudié ces acides.

Nous avons, dans un premier temps, analysé par désorption/ionisation laser couplée à la spectrométrie de masse à transformée de Fourier (FTMS) les différents acides cités ci-dessus pour caractériser les espèces ioniques formées.

Cette première série d'expériences ne nous donne que des informations sur les ions présents dans le nuage gazeux ("plume"). C'est la raison pour laquelle, dans un second temps, nous avons complété cette étude par la pyrolyse thermique couplée à la GC/MS qui nous a permis de caractériser les molécules neutres formées.

5.1 Etude par FTMS des ions formés lors de la vaporisation de la matrice

L'étude FTMS a été effectuée à deux longueurs d'onde suivant le type d'acide étudié. Nous avons travaillé soit à 266 nm, soit à 355 nm correspondant aux longueurs d'onde émises par un laser Nd-Yag quadruplé ou triplé en fréquence. La longueur d'onde sélectionnée pour une matrice donnée correspond au maximum d'absorption de celle-ci.

Les résultats présentés ci-après ont été obtenus à une irradiance moyenne de 5.10^6 W/cm² correspondant aux conditions optimales en MALDI.

Matrices	Longueur d'onde	Ions formés
Acide 2,5-dihydroxy-benzoïque	355 nm	(M+H) ⁺ , (M-OH) ⁺ (M-H) ⁻ , (M-CO ₂ -H) ⁻
Acide Succinique	355 nm	(M-OH) ⁺ , (M-CO ₂ +H) ⁺ (M-H) ⁻ , (M-HCOOH-H) ⁻
Acide Ferulique	355 nm	(M-OH) ⁺ (M-H) ⁻ , (2M-H) ⁻
Acide Cinnamique	355 nm	(M+Na) ⁺ , ((M-OH) ⁺ (M-H) ⁻ , (2M-CO ₂ -H) ⁻
Acide α cyano-4-hydroxycinnamique	355 nm	(M-CO ₂ +H) ⁺ (M-H) ⁻
Acide α cyano-3-hydroxycinnamique	355 nm	(2M-CO ₂ +H) ⁺ (M-CO ₂ -H) ⁻
Acide Nicotinique	266 nm	(M-H) ⁻
Acide Picolinique	266 nm	(M-H) ⁻

Tableau 7. Espèces majoritairement formées lors de l'ablation laser des acides organiques utilisés comme matrices MALDI. Les ions inscrits en gras représentent les pics majoritaires.

L'analyse des résultats obtenus nous permet de classer ces différents acides en trois groupes distincts selon le type d'ions formés :

- ✓ des dimères,
- ✓ des dimères décarboxylés,
- ✓ des monomères décarboxylés.

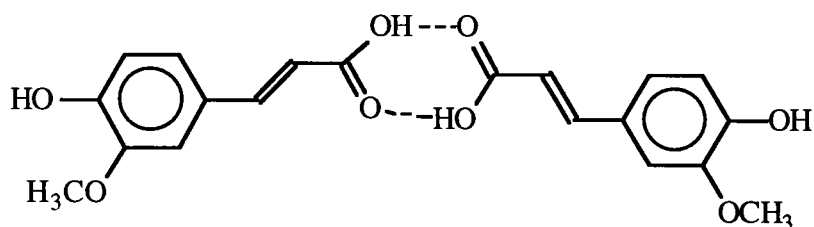
Nous allons, dans la suite de cette partie, étudier en détail un représentant de chacune de ces trois familles.

5.2.1 Formation de dimères : l'acide ferulique

L'étude FTMS de l'acide ferulique permet de mettre en évidence trois types d'ions formés majoritairement lors de l'impact laser. En mode positif, on peut constater la présence d'ions de type $(M-OH)^+$. Le spectre de masse en mode négatif est, quant à lui, caractérisé par la formation d'ions $(M-H)^-$ et $(2M-H)^-$.

Ceci nous amène aux constatations suivantes :

- ✓ la décarboxylation est un phénomène secondaire pour ce type de molécules. Ceci peut s'expliquer par l'absence, à proximité de la fonction acide, de groupement favorisant cette réaction,
- ✓ la dimérisation est un phénomène classique pour ce type de molécules. En effet, une double stabilisation des fonctions acides est possible par formation de liaisons hydrogènes :



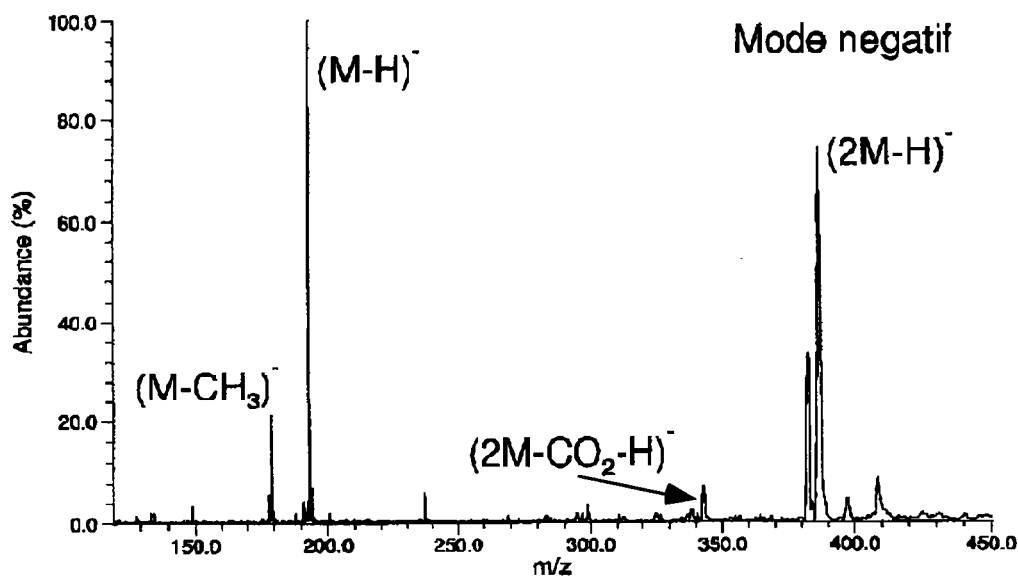
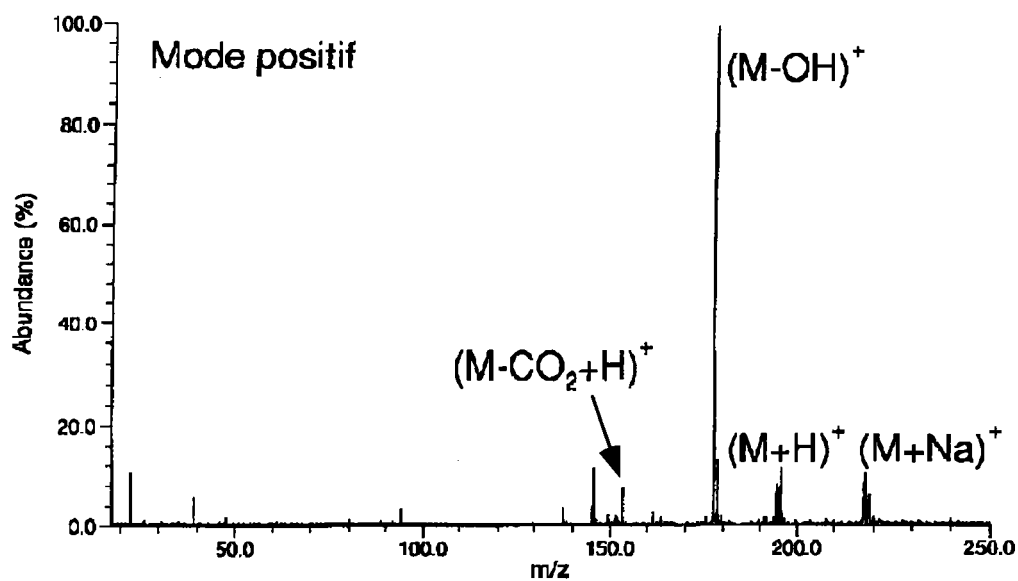
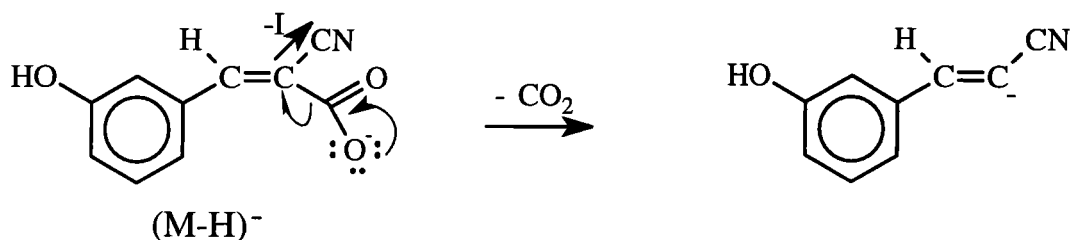


Figure 59 Spectres FTMS de l'acide ferulique

5.2.2 Formation de dimères décarboxylés : l'acide α cyano-3-hydroxycinnamique

L'acide α cyano-3-hydroxycinnamique se caractérise, en mode positif, par un ion $(2M-CO_2+H)^+$ et en mode négatif par l'ion $(M-CO_2-H)^-$.

La décarboxylation est le phénomène majoritaire (en modes positif et négatif). La présence d'un groupement nitrile (CN attracteur par effet inductif noté -I) sur le carbone en α du COOH facilite cette réaction.



La formation des dimères (en mode positif) ne peut pas être expliquée par une stabilisation des fonctions acides par des liaisons hydrogènes (comme dans le cas de l'acide ferulique). En effet, pour qu'une décarboxylation du dimère soit possible, il faut qu'au moins l'un des deux groupements acides ne soit pas engagé dans la dimérisation.

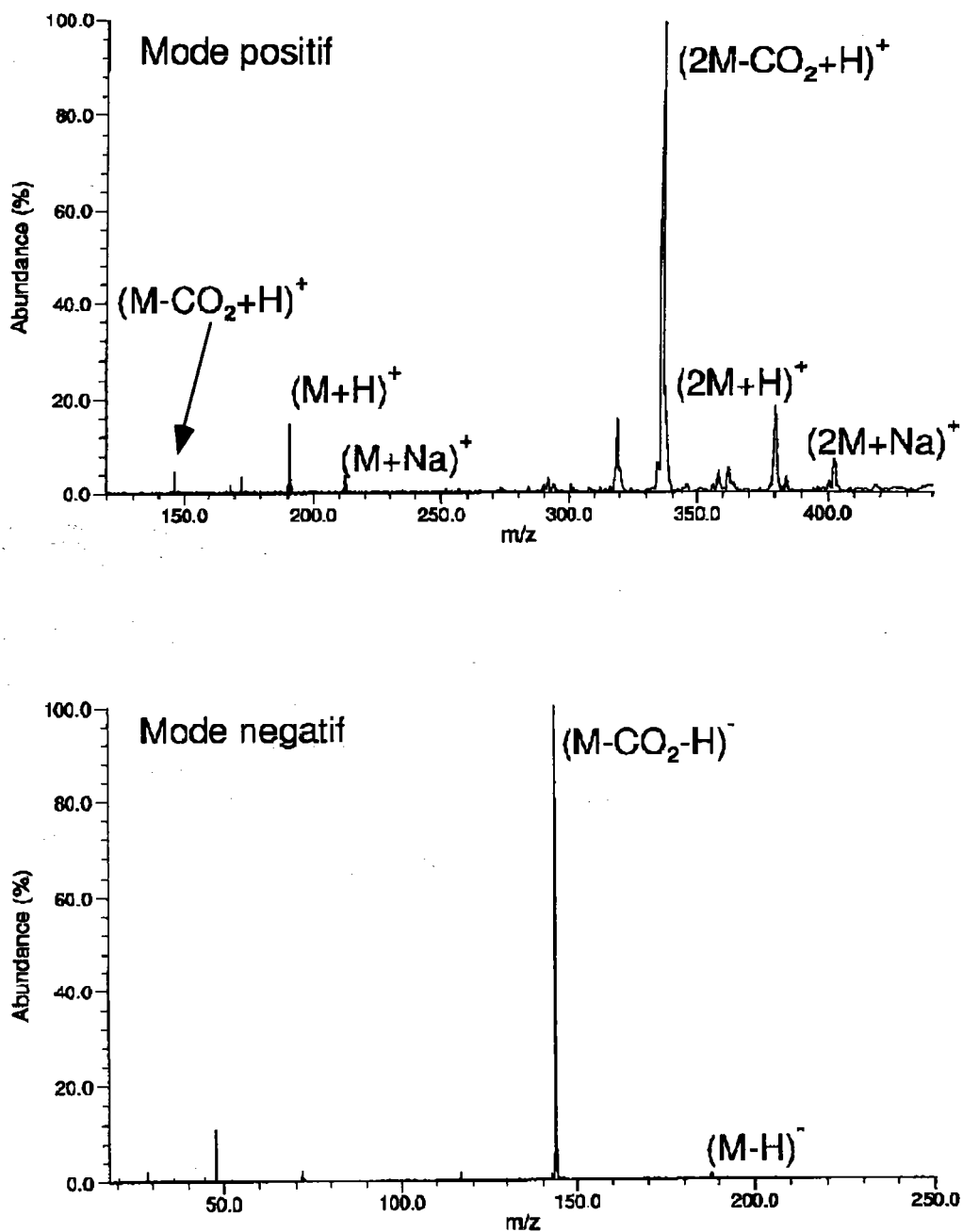
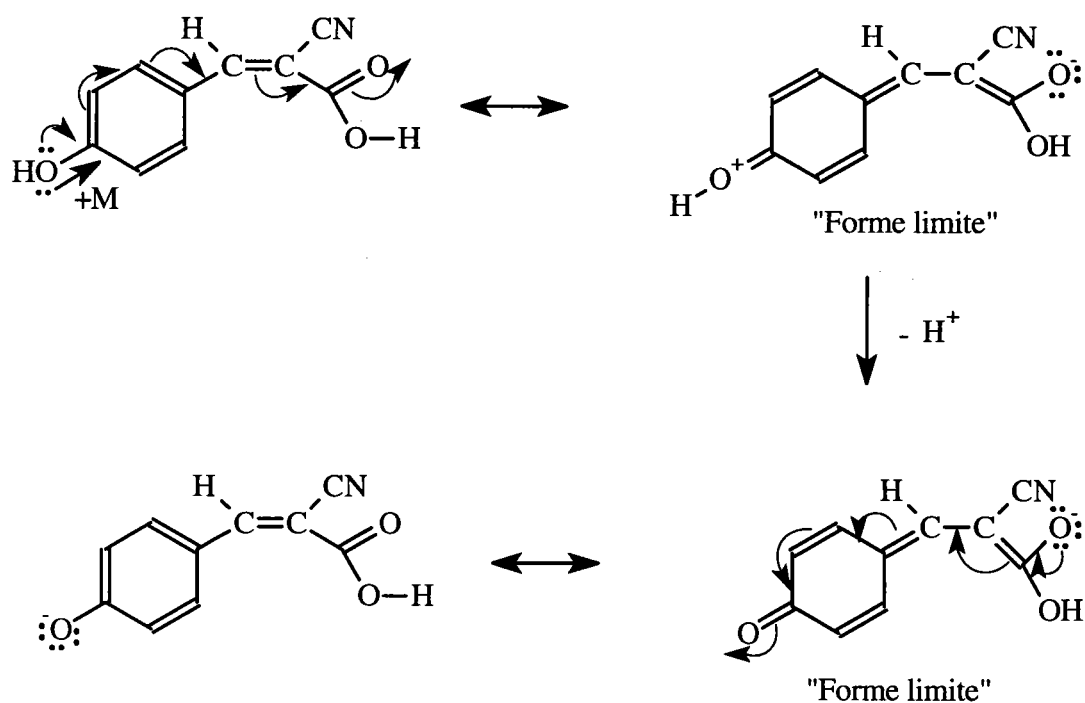


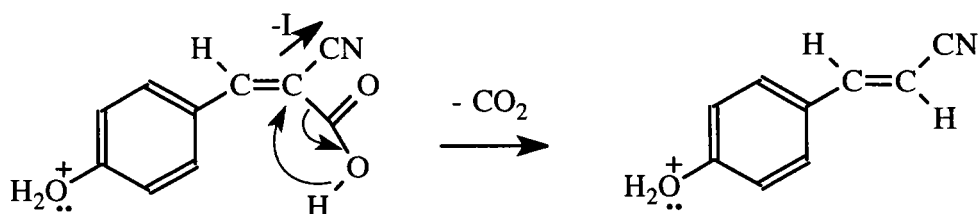
Figure 60. Spectres FTMS de l'acide α cyano-3-hydroxycinnamique

5.2.3 Formation de monomères décarboxylés : l'acide α cyano-4-hydroxycinnamique

Le spectre FTMS de l'acide α cyano-4-hydroxycinnamique, en mode négatif, est caractérisé par un ion $(M-H)^-$. On peut expliquer la formation de celui-ci par la présence d'un groupement hydroxyle (donneur par effet mésomère noté +M) en position para sur le cycle benzénique. Ceci se traduit par un renforcement de la liaison entre le carbone et le groupement carboxyle.



Le spectre FTMS, en mode positif, montre une décarboxylation de la molécule. Ceci semble être dû au groupement nitrile (attracteur par effet inductif noté -I) situé sur le carbone en α de la fonction carboxylique.



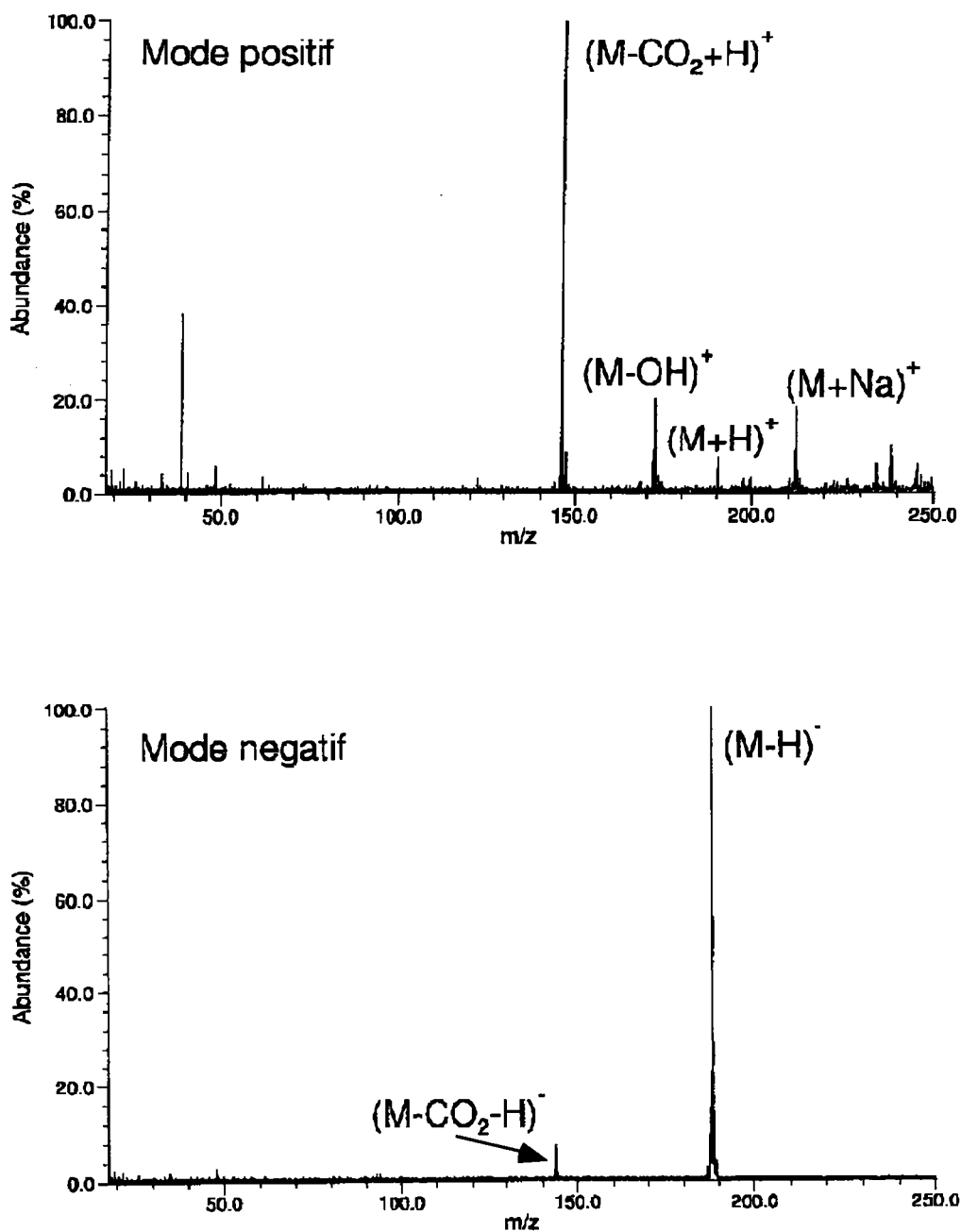


Figure 61. Spectres FTMS de l'acide α cyano-4-hydroxycinnamique

5.2 Etude par Py/GCMS des neutres formés lors de la vaporisation de la matrice

Les études réalisées par FTMS ont montré une certaine diversité au niveau des ions générés et de leurs mécanismes de formation. Les expériences de Py/GCMS ont, quant à elles, pour objectif de caractériser les molécules neutres formées lors de l'ablation des matrices. Ceci se justifie d'autant plus que, lors d'un impact laser (à faible irradianance), la grande majorité des particules formées (>90%) sont des molécules neutres.

5.3.1 Principe de la Py/GCMS

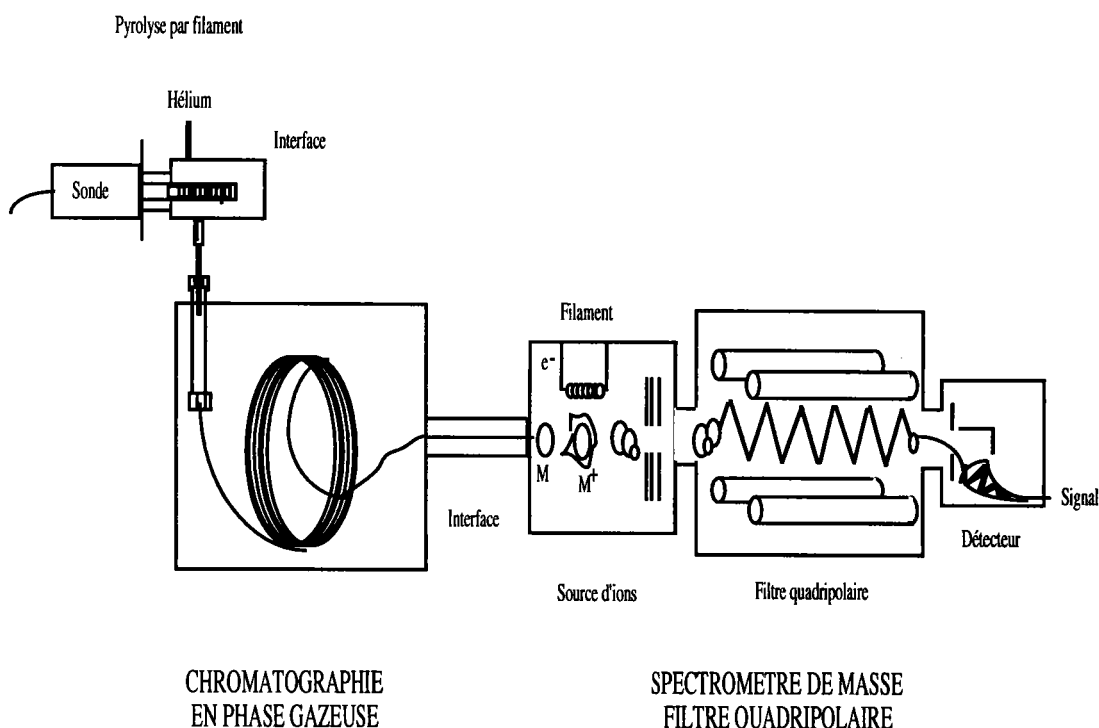


Figure 62. Schéma de principe du Pyrolyseur/GCMS

Une quantité pesée d'échantillon est placée dans un tube en quartz qui est lui-même introduit à l'intérieur du filament du pyrolyseur. On réalise une pyrolyse à 600°C pendant 5 secondes. La température de l'interface est ajustée pour chacun des échantillons afin d'éviter toute recondensation.

La séparation des produits pyrolysés est effectuée à l'aide d'une colonne capillaire (de type HP1) de 25 m de long et de 0,2 mm de diamètre interne. Le chromatographe en phase gazeuse (HP 5890) est programmé de 35°C (pendant 2 mn) à 280°C avec une montée en température de 20°C/min. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium.

Lors de ces expériences, l'ionisation des molécules dans le spectromètre de masse (HP5988 A) est obtenue par impact électronique à 70 eV. L'identification des composés a été faite par fragmentométrie de masse et comparaison avec la librairie Wiley.

5.3.2 Résultats expérimentaux

Le tableau ci-dessous récapitule les différentes molécules formées lors des expériences de Py/GCMS.

Matrices	Molécules détectées
Acide 2,5-dihydroxy-benzoïque	3-phenoxyphénol Acide benzoïque phenyl ester 1,3-propanedione
Acide Succinique	Dihydro-2,5-furanedione
Acide Ferulique	2-methoxy-4-vinylphénol
Acide Cinnamique	Styrène
Acide α cyano-4-hydroxycinnamique	7-quinolinol
Acide α cyano-3-hydroxycinnamique	8-quinolinol et 6-quinolinol
Acide Nicotinique	Pyridine
Acide Picolinique	Pyridine

Tableau 8. Récapitulatif des produits formés lors de la Py/GCMS des différents acides étudiés.

Les acides étudiés (à l'exception de l'acide succinique qui se déshydrate) sont caractérisés par une décarboxylation. L'analyse des chromatogrammes et des spectres de masse correspondant montre la présence de CO_2 et de molécules caractéristiques des matrices décarboxylées.

Nous allons reprendre la classification établie lors de l'étude FTMS et voir, dans chacun des cas, le type de molécules neutres formées.

4.3.2.1 L'acide ferulique

L'acide ferulique est uniquement caractérisé par le dioxyde de carbone et un composé de décarboxylation : le 2-méthoxy-4-vinylphénol :

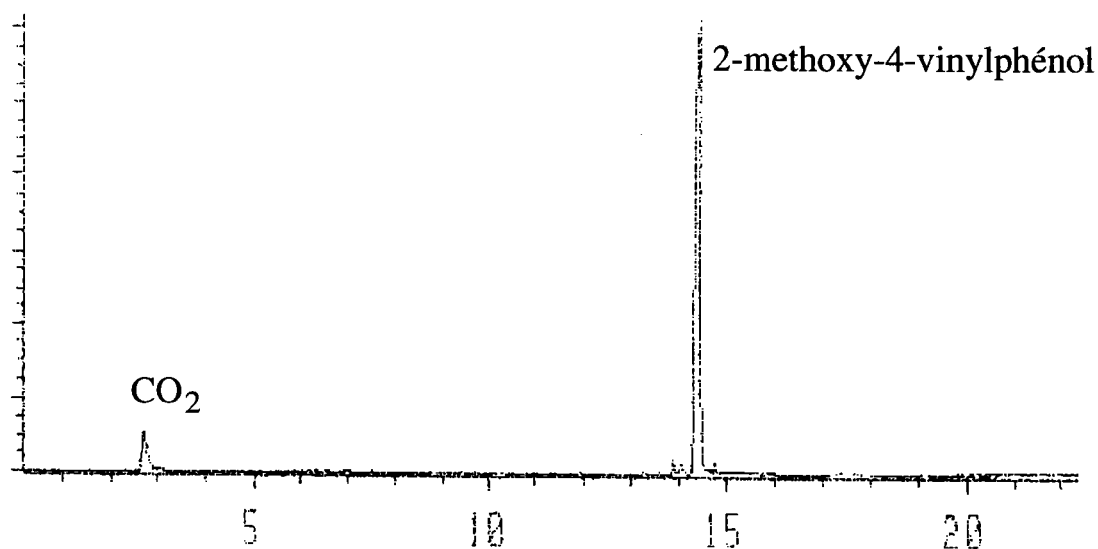
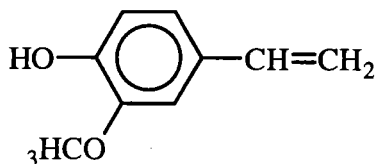


Figure 63. Chromatogramme obtenu lors de la Py/GCMS de l'acide ferulique.

4.3.2.2 l'acide α cyano-3-hydroxycinnamique

La structure asymétrique de la molécule conduit à la formation de plusieurs composés de décarboxylation. Le chromatogramme (et les spectres de masse associés) ci-après permet de caractériser les principales structures formées lors de la désorption thermique.

Nous présentons également les mécanismes de formation des deux principaux composés formés.

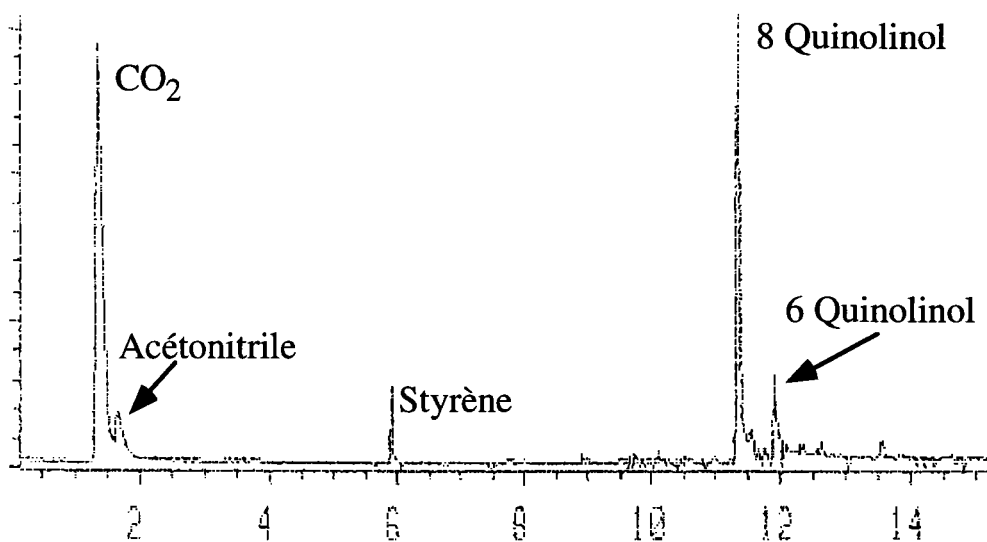


Figure 64. Chromatogramme obtenu lors de la Py/GCMS de l'acide α cyano-3-hydroxycinnamique.

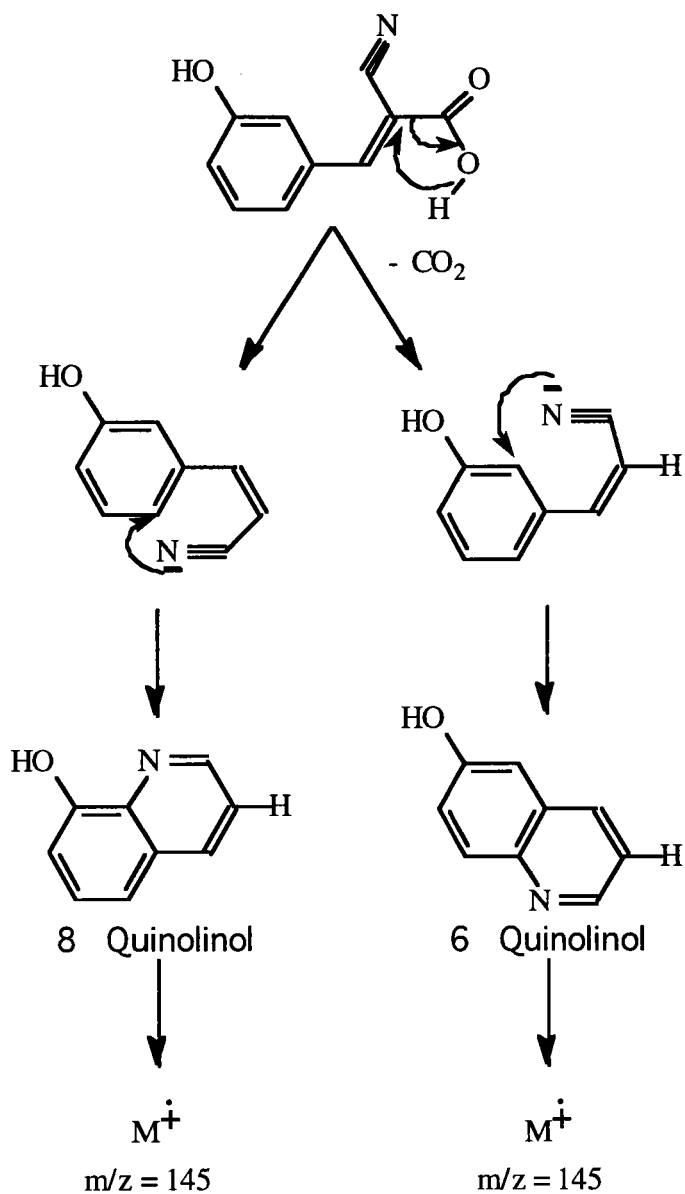


Figure 65. Mécanisme de formation des deux quinolinols issus de la Py/GCMS de l'acide α cyano-3-hydroxycinnamique.

5.3.2.3 l'acide α cyano-4-hydroxycinnamique

Dans ce cas (contrairement à celui de l'acide α cyano-3-hydroxycinnamique) la structure symétrique de la molécule conduit à l'obtention d'un seul composé de décarboxylation. Cependant, celui-ci peut se trouver soit sous forme linéaire (phénol-4-acétonitrile) soit sous forme cyclique (7-quinolinol). Le chromatogramme, ainsi que les mécanismes d'obtention de ces deux principaux composés, sont représentés ci-après.

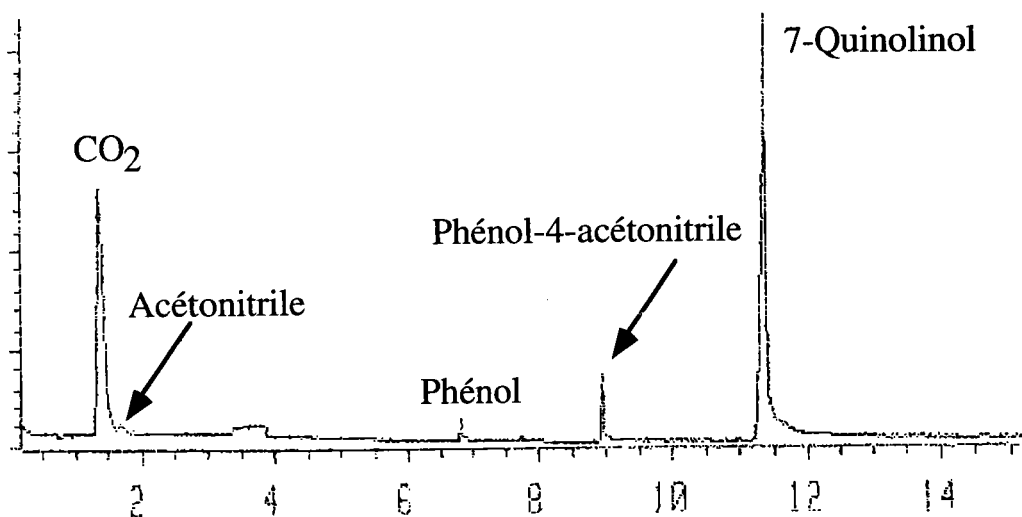
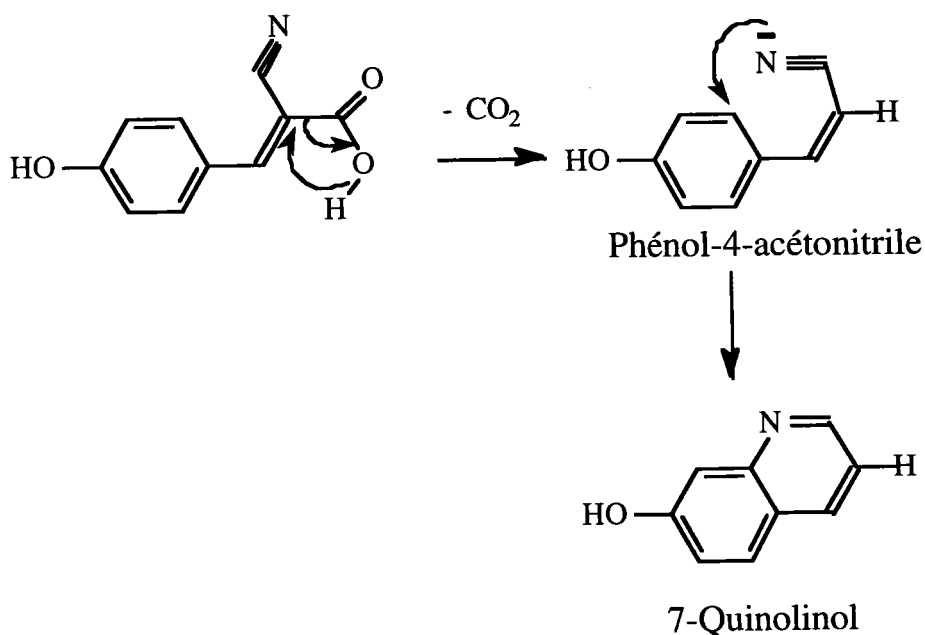


Figure 66. Chromatogramme obtenu lors de la Py/GCMS de l'acide α cyano-4-hydroxycinnamique.



5.3 Conclusions

Une pyrolyse thermique adaptée à chaque acide peut nous permettre de mieux comprendre et de quantifier les décompositions qui se produisent à partir des molécules formées. Dans chacun des cas, nous obtenons un dégagement de dioxyde de carbone. Celui-ci joue un rôle important lors de la détente adiabatique qui suit l'ablation laser. Il apparaît également que la fonctionnalisation de l'acide, utilisé comme matrice, induit plus ou moins fortement la coupure de la liaison responsable du départ du groupement carboxyle.

Les effets inductif et/ou mésomère correspondant aux différents substituants présents sur le cycle et sur le carbone en α du groupement carboxyle gouvernent le type de composés formés (monomère, dimère, décarboxylation, ...). La disponibilité du groupement carboxyle permet la formation ou non de dimères. Par exemple, la dimérisation de l'acide ferulique implique l'indisponibilité des deux groupements carboxyles. Le dégagement de dioxyde de carbone est donc rendu impossible dans ce cas.

Enfin, l'acide α cyano-4-hydroxycinnamique ne forme pas de dimère. En effet, la présence simultanée du groupement hydroxyle en position 4 sur le cycle et du groupement nitrile sur le carbone en α du COOH **induit un départ extrêmement rapide du groupement carboxyle**. De ce fait, la dimérisation ne peut pas se faire. Les excellents résultats obtenus avec l'acide α cyano-4-hydroxycinnamique peuvent, en partie, s'expliquer par sa capacité à se décarboxyler extrêmement rapidement sous l'effet du faisceau laser. Il faut également associer à ceci l'obtention d'échantillons homogènes à l'échelle du micron.

6. Partie VI : Caractérisation par MALDI de dérivés de la β -cyclodextrine

Grâce à leur forme cylindrique, les β -cyclodextrines (figure 67) peuvent accueillir en leur sein de nombreux types de molécules organiques.

Cette caractéristique explique l'intérêt porté à ce type de molécules dans de nombreux domaines. Elles sont notamment utilisées comme transporteurs de médicaments [71] ou dans la chimie des détergents.

Nous avons essayé, au cours de ce travail, de mieux comprendre :

- ✓ les interactions existant entre la molécule cible (ici différents types de β -cyclodextrines) et la matrice de co-désorption,
- ✓ l'influence de la longueur d'onde.

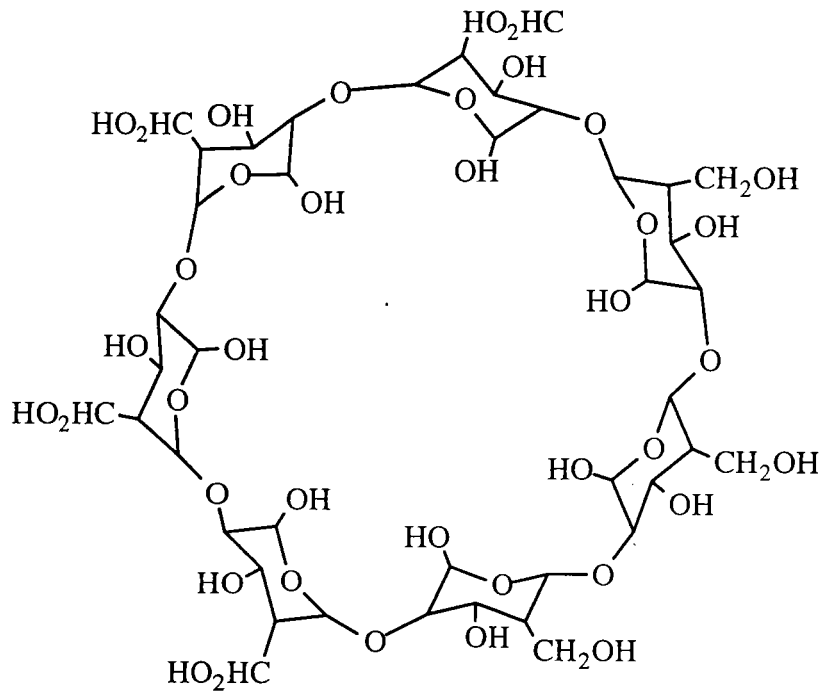


Figure 67. β -cyclodextrine native

Dans un premier temps, nous avons vérifié la capacité de la technique MALDI pour la détection de la β -cyclodextrine native. Des expériences ont été réalisées à 266 nm en utilisant comme matrice l'acide nicotinique.

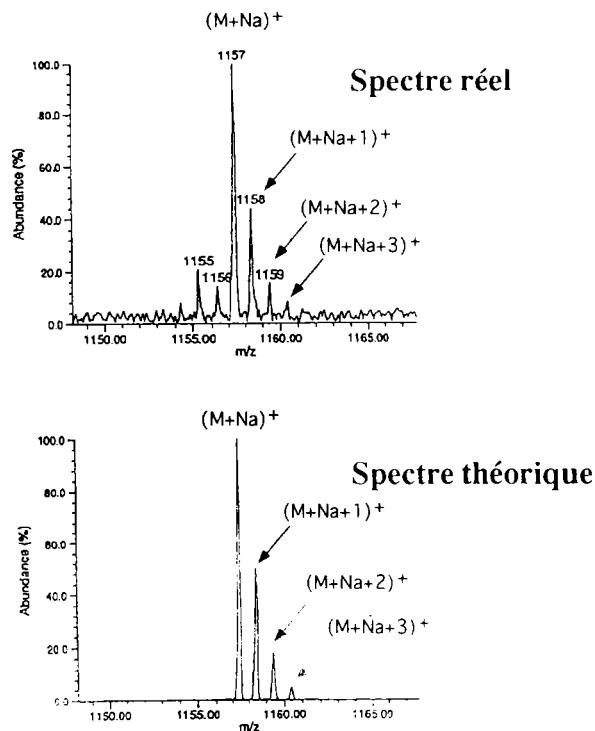


Figure 68. Spectre MALDI-FT-ICR/MS de la β -cyclodextrine à 266 nm.

La figure 68.a présente le spectre obtenu à 266 nm. On constate que l'on parvient à détecter la β -cyclodextrine sous la forme d'un ion pseudo-moléculaire du type $(M+Na)^+$ à $m/z = 1157$. L'analyse a été réalisée en mode direct (plage de masse étendue) avec une résolution élevée ($R = 7000$), ce qui nous permet de distinguer les pics isotopiques $(M+Na+1)^+$, $(M+Na+2)^+$ et $(M+Na+3)^+$ (à $m/z = 1158, 1159$ et 1160 respectivement) associés à cet ion $(M+Na)^+$.

Le spectre 68.b a été obtenu à partir du calcul théorique des pics isotopiques associés à l'ion $(M+Na)^+$. On constate que les rapports isotopiques sont bien respectés, ce qui ne laisse aucune ambiguïté quant à la nature de l'ion observé.

Nous avons également effectué une analyse à 355 nm et nous avons obtenu un résultat similaire avec une résolution tout aussi élevée.

Par la suite, l'étude de ces composés s'est orientée autour d'un axe double. Tout d'abord, l'étude de β -cyclodextrines modifiées. Ces modifications ayant pour objectif l'augmentation de la solubilité dans l'eau de ce type de composés. Enfin, nous avons étudié des complexes entre des β -cyclodextrines et différents types de molécules pour simuler la détection de futurs complexes avec des médicaments.

6.1 Etude par MALDI de β -cyclodextrines polyméthylées

La polyméthylation des β -cyclodextrines natives a pour objectif de diminuer la polarité de ces molécules et, de ce fait, d'augmenter leur solubilité dans l'eau. D'autres types de modifications peuvent également être faites, notamment l'éthylation. En raison du grand nombre possible de sites de méthylation (21 positions), il est important de pouvoir déterminer facilement le degré de substitution de ces molécules.

Au cours de cette étude, nous avons comparé deux techniques d'ionisation à savoir la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) et l'électrospray (ESI). Ces deux techniques ont été choisies pour leur conditions douces d'ionisation permettant d'obtenir des spectres ne présentant pas ou peu de fragmentations. D'autre part, elles permettent également de déterminer le degré de méthylation des molécules ainsi que leur pureté.

En ce qui concerne la partie MALDI, cette étude nous a permis également de mieux comprendre les interactions existant entre les molécules de matrice (la nitrocellulose et l'acide nicotinique) et les molécules cibles.

6.1.1 Conditions expérimentales

Les molécules utilisées dans cette étude sont différemment méthylées. Chacun des échantillons est en fait composé d'un mélange de molécules possédant différents degrés de méthylation. Deux échantillons de β -cyclodextrines polyméthylées ont été choisis pour cette étude :

- ✓ **A** : est un mélange de β -cyclodextrines présentant 14, 15 ou 16 méthyles sur les positions hydroxyles. Cet échantillon est composé de molécules méthylées de façon symétrique : statistiquement, on trouve deux groupements méthyles par unité glucose.
- ✓ **B** : est également un mélange β -cyclodextrines présentant 14, 15 ou 16 méthyles sur les positions hydroxyles. Cependant, dans ce cas, la méthylation est asymétrique : tous les groupements méthyles sont du même côté de la molécule.

L'échantillon A (N° H-0513) a été fourni par la société SIGMA (Saint Louis, USA). L'échantillon B (réf. CY 2004) a été synthétisé par la société CHINOIN en utilisant différents procédés de méthylation.

6.1.2 Préparation des échantillons

Les échantillons "MALDI" :

Les études MALDI ont été effectuées en utilisant une matrice binaire composée de nitrocellulose et d'acide nicotinique. Le choix de ce type de matrice a été effectué, dans un premier temps pour obtenir des résultats reproductibles. D'autres matrices ont également été testées tel que l'acide nicotinique seul.

La préparation des échantillons nécessite, dans un premier temps, le passage en solution de tous les composés : matrice et molécules cibles. Plusieurs solutions sont ainsi préparées :

- ✓ l'acide nicotinique (10^{-3} M dans le méthanol),
- ✓ la nitrocellulose (10 mg/ml dans le méthanol),
- ✓ la molécule cible (10^{-4} M dans le méthanol).

Le choix du méthanol comme solvant a été guidé à la fois par la nitrocellulose, qui est seulement soluble dans quelques solvants¹²⁹ et par la stabilité des β -cyclodextrines.

Les échantillons à analyser sont obtenus par mélange d'un même volume de chacune des solutions préparées préalablement. Puis 100 μ l du mélange obtenu est prélevé, déposé sur le porte-échantillon. Enfin, le solvant est évaporé.

Les échantillons "ESI" :

En ce qui concerne l'ESI, les différentes β -cyclodextrines ont été dissoutes dans un solvant complexe : (méthanol / solution de NH_4CO_3 ($5 \cdot 10^{-2}$ M) dans l'eau/ eau) (50/10/50) (V/V/V) pour obtenir une concentration finale en β -cyclodextrine de $3 \cdot 10^{-5}$ M. L'ajout de NH_4CO_3 permet la libération dans la solution d'ions NH_4^+ qui favorisent l'ionisation des β -cyclodextrines sous forme $(\text{M}+\text{NH}_4)^+$.

Les spectres d'ESI ont été réalisés au Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique (LSMBO) de l'Université de Strasbourg.

¹²⁹ solvants de la nitrocellulose : méthanol, éthanol, butanone essentiellement.

6.1.3 Résultats et discussion

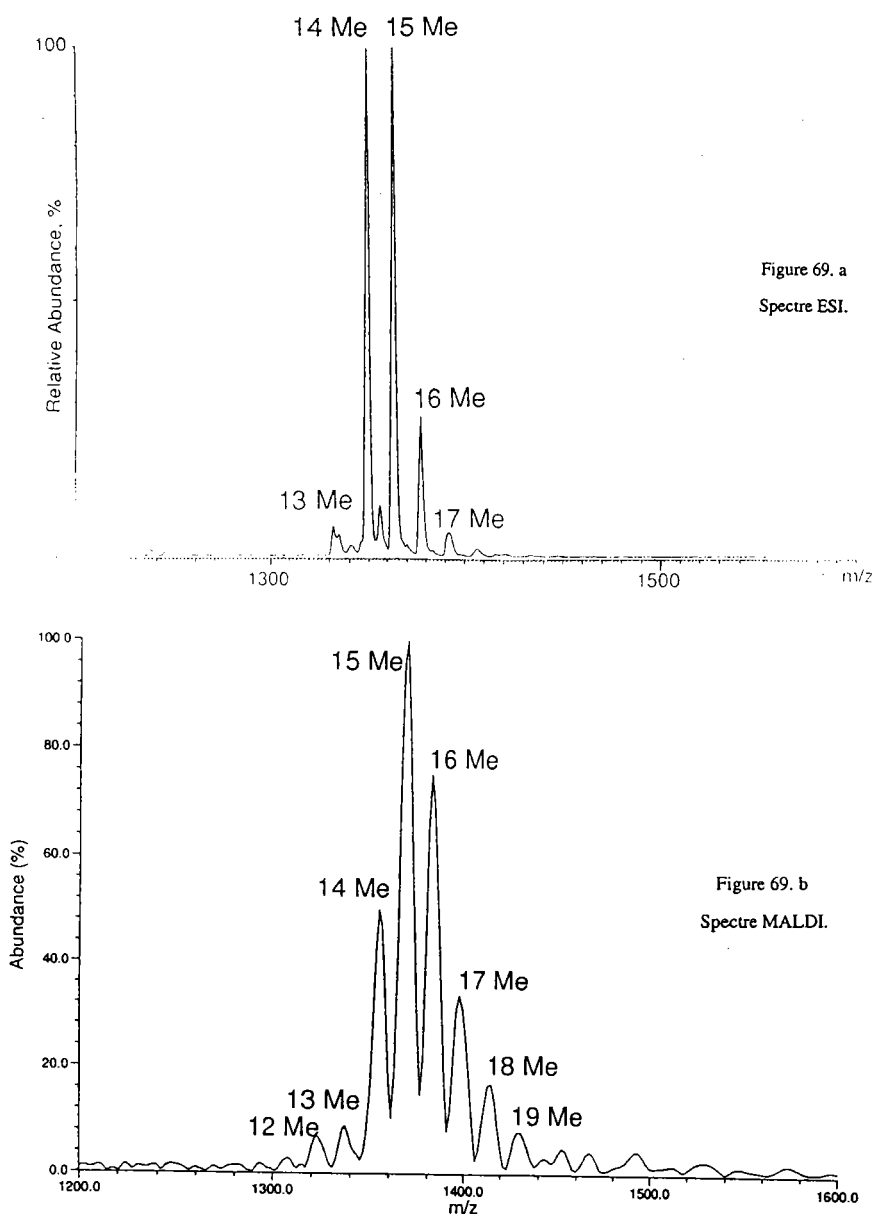


Figure 69. Spectres ESI (69a) et MALDI (69b) de la β -cyclodextrine polyméthylée B

Les meilleurs résultats ont été obtenus, pour chacune des deux techniques, en mode positif. L'ionisation de ces molécules se fait par cationisation ; deux cations ont été testés dans les différents cas : Na^+ et NH_4^+ . Il apparaît très nettement que si en ESI les meilleurs résultats sont obtenus en utilisant NH_4^+ , en ce qui concerne le MALDI, la présence naturelle des cations Na^+ dans l'échantillon donne de bons résultats. En effet, si l'on dope la solution initiale avec un composé du type NH_4CO_3 , on

obtient en MALDI, pour chaque degré de méthylation, deux pics l'un correspondant à $(M+NH_4)^+$ et l'autre à $(M+Na)^+$. Cette multiplicité des pics rend l'interprétation des spectres plus compliquée.

Les différences observées au niveau de l'ionisation entre MALDI et ESI ont été attribuées au fait que, dans le cas du MALDI, l'ionisation se fait à partir d'un solide alors que pour l'ESI c'est à partir d'une solution. L'affinité pour les cations des différentes β -cyclodextrines dépend apparemment de l'état physique dans lequel se trouve la molécule.

Les études précédemment réalisées à l'aide de la matrice NC/AN sur différents types de molécules cibles ont toujours donné des dépôts homogènes. Or, lors de l'étude des β -cyclodextrines polyméthylées, l'aspect macroscopique du dépôt obtenu est complètement différent. En effet, une cristallisation de surface apparaît à l'issue de l'évaporation du solvant. Une étude de ces cristaux a permis de les caractériser et de déterminer qu'il s'agit d'acide nicotinique.

Cette cristallisation différentielle de la nitrocellulose et de l'acide nicotinique pourrait être expliquée par une complexation de l'acide nicotinique par la β -cyclodextrine.

Comme nous l'avons vu précédemment, la β -cyclodextrine A présente une configuration symétrique (2 groupements méthyles par unité glucose). La β -cyclodextrine B présente une structure asymétrique qui a pu être mise en évidence par hydrolyse ménagée de la molécule suivie d'une analyse par GC/MS¹³⁰. Ces expériences [72] ont permis de démontrer que certaines des unités glucoses étaient complètement méthylées alors que d'autres n'y étaient pas du tout. De ce fait, ces molécules présentent une double caractéristique : un pôle hydrophobe (côté méthylé) et un pôle hydrophile (côté non méthylé).

Matrice	MALDI pic pseudo-moléculaire $(M+Na)^+$			ESI $(M+NH_4)^+$
	$\lambda = 249$ nm NC/NA	$\lambda = 249$ nm NA	$\lambda = 193$ nm NC/NA	
A	Pas détecté	Détecté	Détecté	Détecté
B	Détecté	Détecté	Détecté	Détecté

Tableau 9. Résumé des résultats obtenus sur les β -cyclodextrines A et B en MALDI et ESI couplés à la spectrométrie de masse.

¹³⁰ GC/MS : chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Les analyses réalisées en ESI/MS n'ont pas permis de mettre en évidence de différence structurale entre les échantillons A et B. Par contre, différentes expériences ont pu être réalisées en MALDI/MS. Plusieurs paramètres ont été testés notamment le type de la matrice et la longueur d'onde du laser ionisant. Les principaux résultats obtenus sont résumés tableau 9.

Dans un premier temps, nous avons comparé les résultats obtenus par ces deux techniques sur l'échantillon B. Les expériences MALDI ont été réalisées en utilisant comme matrice un mélange nitrocellulose/acide nicotinique et un laser délivrant une longueur d'onde de 249 nm. La comparaison des spectres obtenus par ESI et MALDI ne montre pas, dans ces conditions, de différences fondamentales. Cependant, une étude plus précise permet de constater que les espèces les plus méthylées (plus de 15 fois) présentent une intensité supérieure dans les spectres MALDI que dans ceux de l'ESI. Ceci est attribué à une interaction plus faible avec la matrice du fait du nombre moins important de liaisons hydrogènes dans les espèces les plus méthylées.

Dans une seconde partie, nous avons étudié, dans les mêmes conditions, l'échantillon A qui présente le même degré de méthylation que B mais une géométrie différente. En effet, dans le cas de A, les groupements methoxy sont répartis de façon aléatoire et homogène sur chaque unité glucose. De ce fait, la molécule est symétrique et il est impossible de détecter cette molécule par MALDI à 249 nm en utilisant comme matrice le mélange nitrocellulose/acide nicotinique. Ce premier résultat montre que l'on peut, à l'aide de cette technique, différencier deux stéréoisomères de position. Nous avons alors essayé de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors de cette désorption afin de mieux comprendre :

- ✓ les mécanismes de l'interaction laser-matière et donc du MALDI,
- ✓ les relations entre les molécules cibles de type protéines et les matrices de co-désorption. En effet, ces molécules (spécialement B) peuvent constituer des modèles pour les molécules biologiques telles que les protéines qui présentent à la fois des zones hydrophiles et des zones hydrophobes.

La différence constatée lors de l'étude de ces deux molécules par MALDI peut s'expliquer par une "insertion" partielle de la molécule B dans la matrice. Au contraire, la molécule A est complètement enfouie au sein de la matrice. Ce dernier résultat met en évidence le rôle extrêmement

important des liaisons hydrogènes lors de la co-cristallisation des molécules cibles et de la matrice.

Pour confirmer cette hypothèse concernant l'orientation spécifique des β -cyclodextrines B lors de leur inclusion dans la matrice nous avons étudié les deux molécules A et B dans une autre matrice non polymérique. Nous avons choisi l'acide nicotinique comme matrice pour sa forte absorption à 249 nm. Dans ces conditions, comme en ESI, nous n'avons pas pu faire de différence entre les deux molécules. Le mélange matrice-molécule cible se comporte comme une "solution solide" parfaitement homogène.

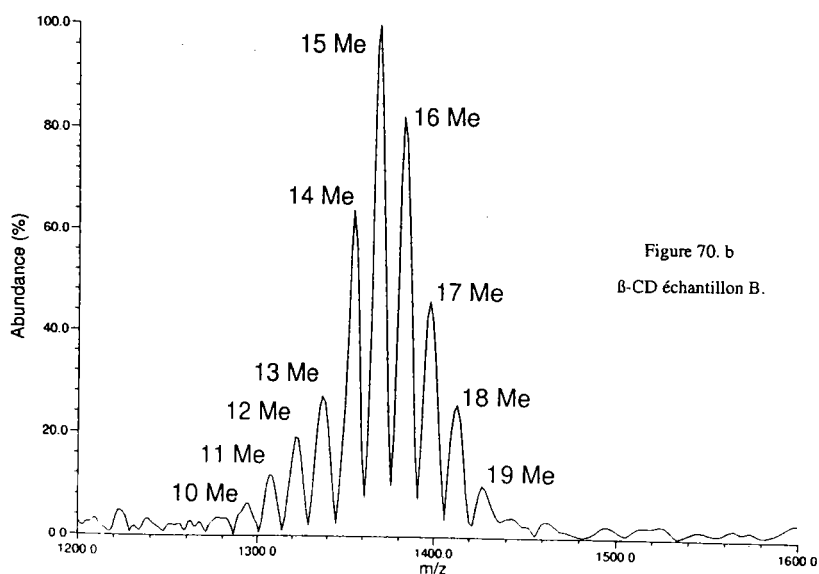
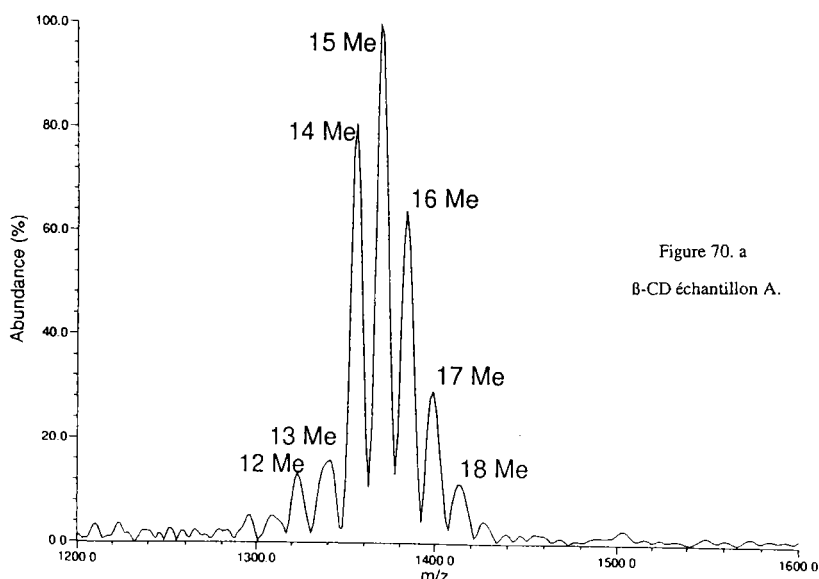


Figure 70. Spectres FTMS des β -cyclodextrines polyméthylées A (70.a) et B (70.b) à 193 nm dans la matrice nitrocellulose/acide nicotinique.

Une seconde série d'expériences nous a conduit à revenir à la matrice initiale : nitrocellulose/acide nicotinique mais à changer la longueur d'onde du laser ionisant. Nous avons choisi 193 nm qui correspond à une longueur d'onde où la nitrocellulose absorbe préférentiellement (contrairement à 249 nm). A cette longueur d'onde, elle présente une vitesse d'ablation élevée [6]. Dans ces nouvelles conditions, il n'est pas possible de différencier les deux molécules A et B. Ce dernier résultat à 249 nm est identique à celui obtenu par ESI

L'ensemble de ces résultats nous ont conduit à émettre l'hypothèse suivante que l'on pourrait dénommer "*l'effet champignon*" :



Figure 71. *L'effet champignon.*

La molécule A (symétrique) forme une "solution solide" avec la matrice ; les liaisons hydrogènes de surface assurent les liens entre la molécule et la matrice, elles peuvent s'établir en tout point de la β -cyclodextrine A. Par contre, en ce qui concerne la molécule B, la zone hydrophobe, caractérisée par la présence de groupements méthyles sur les oxygènes des unités glucoses concernées, reste à l'extérieur de la matrice. Seule la zone hydrophile, caractérisée par des unités glucoses natives, est insérée dans la couche de nitrocellulose. En fait, les molécules B se situeraient en surface de la nitrocellulose.

Cette approche permettrait d'expliquer les différences observées lors des études MALDI. En effet, la nitrocellulose n'absorbe pas à 249 nm et ne peut être ablatée à l'aide d'un rayonnement incident à cette longueur d'onde. De ce fait, l'analyse, dans ces conditions, des molécules A n'est pas possible puisque la matrice forme un "cocon" indestructible autour de la molécule cible. Par contre, en ce qui concerne les molécules B, elles se situent en surface et sont donc directement accessibles et détectables par spectrométrie de masse. L'utilisation d'un rayonnement laser de 193 nm, permet l'ablation de la nitrocellulose et rend possible la détection des deux types de molécules.

6.1.4 Conclusion

Chacune des deux techniques (ESI et MALDI) permet la détection des β -cyclodextrines polyméthylées. Cette étude a permis de mettre en

évidence la spécificité du MALDI pour distinguer deux stéréoisomères de position.

De plus, cette étude a permis de mettre en évidence la complémentarité des deux techniques douces d'ionisation (ESI et MALDI) pour la caractérisation complète des β -cyclodextrines polyméthylées.

Les β -cyclodextrines polyméthylées constituent de bons modèles pour expliquer le comportement de certaines protéines lors d'expériences MALDI/MS. En effet, les β -cyclodextrines polyméthylées B, comme les protéines, possèdent à la fois des sites hydrophiles et hydrophobes qui contrôlent le positionnement des molécules cibles au sein de la matrice.

6.2 Etude de complexes entre des β -cyclodextrines et des molécules organiques

Dans cette dernière partie, nous avons étudié deux composés formés par complexation de la β -cyclodextrine avec deux molécules "hôtes" : le rouge de méthyle et l'acide para-N diméthyl-amino-cinnamique (Figure 72).

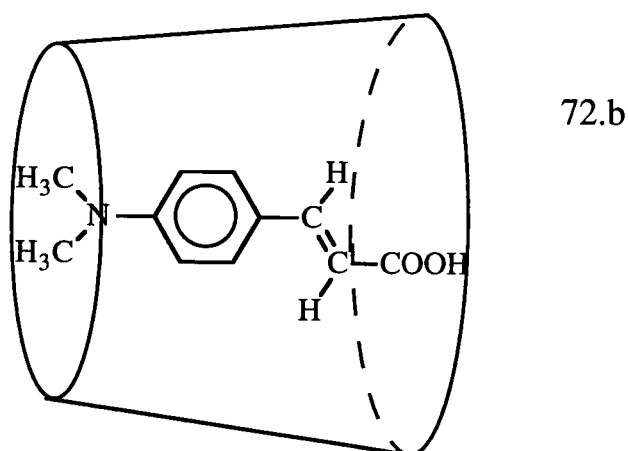
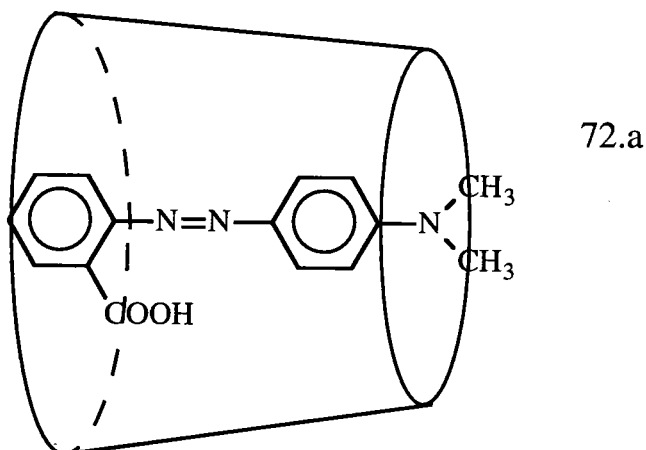


Figure 72. Complexes de la β -cyclodextrine avec le rouge de méthyle (72.a) et l'acide para-N diméthyl-amino-cinnamique (72.b)

Lorsque la cavité de la β -cyclodextrine est occupée par une molécule organique de taille appropriée, il en résulte un complexe dit d'inclusion.

Dans ce type de complexes, la β -cyclodextrine inclut une molécule "hôte" (totalement ou en partie) au sein de sa cavité uniquement par le biais d'interactions non covalentes.

Ces composés sont donc relativement instables et c'est la raison qui nous a conduit à choisir la technique MALDI pour tenter de les caractériser par spectrométrie de masse.

6.2.1 Etude RMN

L'obtention de complexes a été mise en évidence à l'aide d'une étude préalable en RMN du proton.

6.2.1.1 Nomenclature et numérotation

Nous présentons figure 73 la numérotation des différentes molécules qui sera utilisée dans ce mémoire pour l'interprétation des spectres RMN.

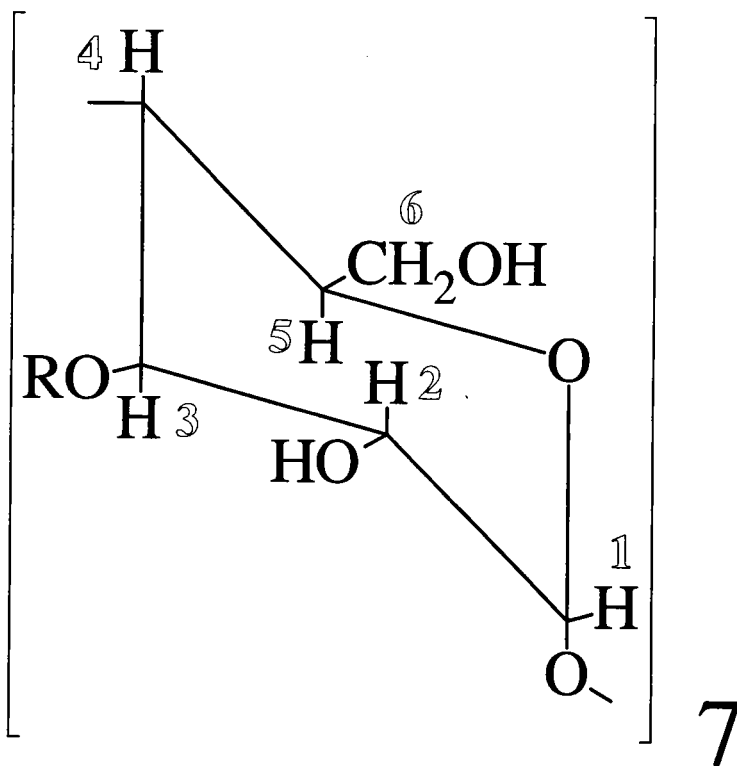


Figure 73. Numérotation des différents protons de la β -cyclodextrine native.

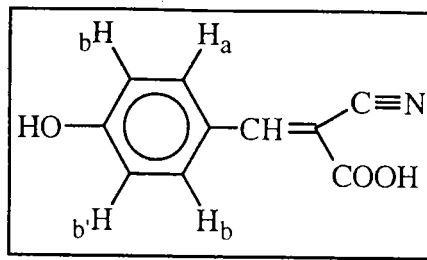


Figure 74. Numérotation des protons de l'acide α cyano-4-hydroxycinnamique.

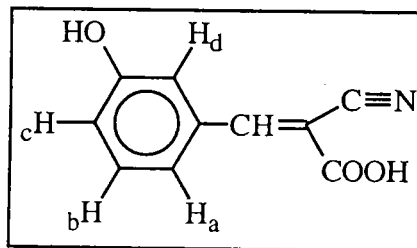


Figure 75. Numérotation des protons de l'acide α cyano-3-hydroxycinnamique.

6.2.1.2 Interprétation des spectres RMN

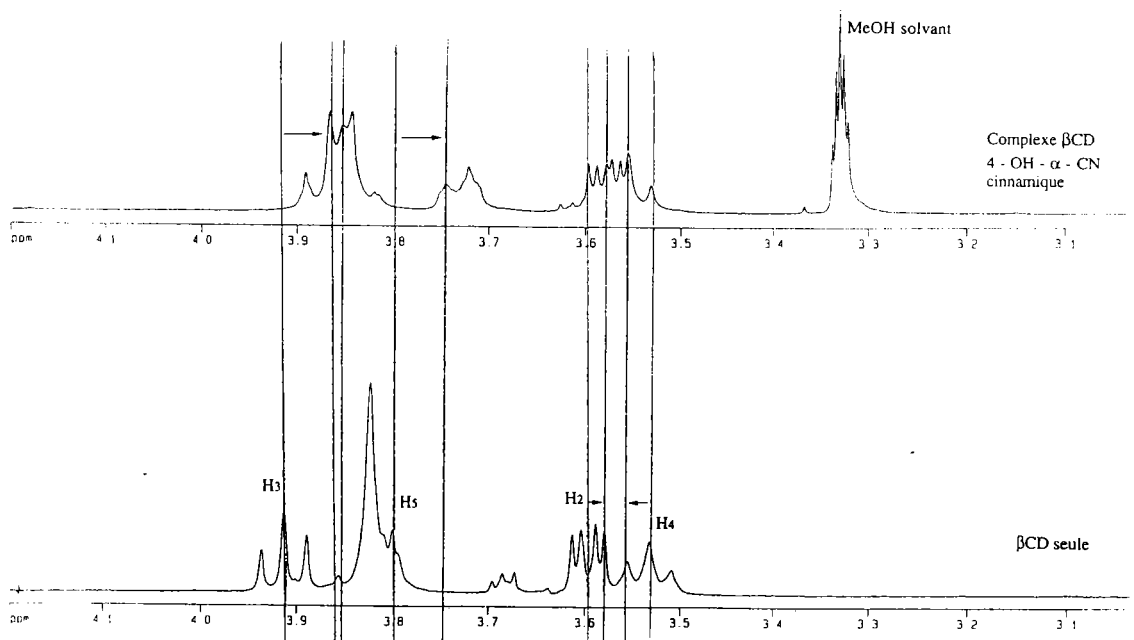


Figure 76. Spectres RMN comparés de la β -CD native et du complexe avec l'acide α cyano-4-hydroxycinnamique.

	CD native (ppm)	Complexe (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H2	3,60	3,58	-0,02
H3	3,91	3,86	-0,05
H4	3,53	3,56	+0,03
H5	3,8	3,75	-0,05

Tableau 10. Influence de la complexation entre la β -CD et l'acide α cyano-4-hydroxycinnamique sur le déplacement chimique des principaux protons de la β -CD.

	Protons aromatiques non complexés (ppm)	Protons aromatiques complexés (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
Hb-b'	7,83	7,81	-0,02
Ha-a'	6,81	6,86	+0,05

Tableau 11. Influence de la complexation entre la β -CD et l'acide α cyano-4-hydroxycinnamique sur le déplacement chimique des principaux protons de l'acide α cyano-4-hydroxycinnamique.

	CD native (ppm)	Complexe (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H3	3,91	3,86	-0,05
H4	3,53	3,56	+0,03
H5	3,8	3,75	-0,05

Tableau 12. Influence de la complexation entre la β -CD et l'acide α cyano-3-hydroxycinnamique sur le déplacement chimique des principaux protons de la β -CD.

	Protons aromatiques non complexés (ppm)	Protons aromatiques complexés (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
Ha	6,92	6,97	+0,05
Hb	7,24	7,26	+0,02
Hc	7,31	7,30	-0,01
Hd	7,37	7,35	-0,02

Tableau 13. Influence de la complexation entre la β -CD et l'acide α cyano-3-hydroxycinnamique sur le déplacement chimique des principaux protons de l'acide α cyano-3-hydroxycinnamique.

Dans le cas des deux complexes, on constate un déplacement significatif des protons du cycle glucosidique numérotés 3 et 5 (qui correspondent à ceux qui se situent à l'intérieur de la cavité de la β -CD) vers les champs forts.

De même, l'analyse des spectres RMN montre que les protons aromatiques notés c et d pour l'acide α cyano-3-hydroxycinnamique, b et b' pour l'acide α cyano-4-hydroxycinnamique se déplacent vers les champs forts. Ceci confirme la formation d'une inclusion.

Par contre, l'analyse de ces spectres ne permet pas de faire de différence entre ces deux complexes à l'aide de cette technique.

6.2.2 Conditions expérimentales

Au cours de cette étude, nous avons optimisé dans un premier temps, les conditions de préparation des échantillons puis, dans un second temps, l'analyse des complexes de la β -cyclodextrine.

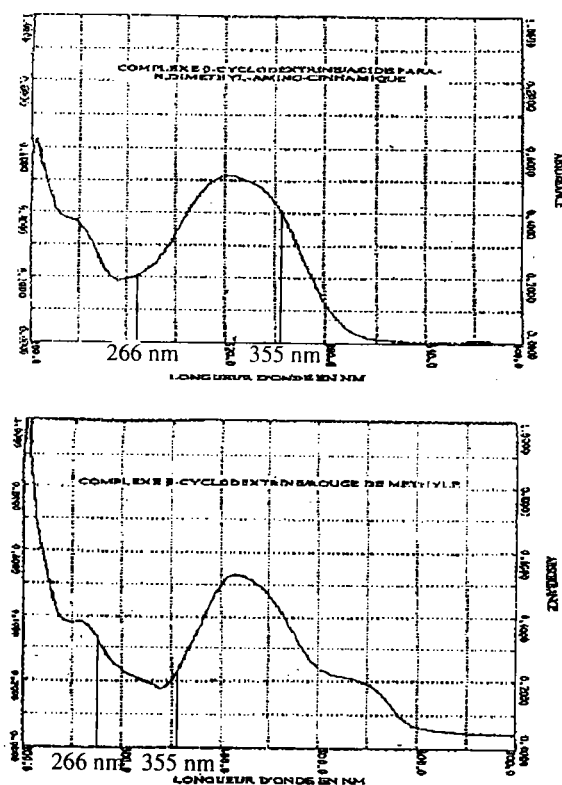


Figure 77. Spectres d'absorption des complexes étudiés.

Afin d'examiner l'influence de la longueur d'onde du laser incident et du transfert d'énergie entre la molécule cible (les différents complexes) et la matrice lors de l'analyse de ces complexes par MALDI-MS, nous avons choisi d'effectuer des analyses à deux longueurs d'onde (266 nm et 355 nm) correspondant aux différentes absorptions des deux complexes. On constate en effet sur les spectres d'absorption (Figure 77), qu'à 266 nm, le complexe β -cyclodextrine/rouge de méthyle présente une absorption beaucoup plus forte que le complexe β -cyclodextrine/acide para N, diméthyl-amino-cinnamique ; à 355 nm, la situation inverse est observée.

6.2.2 Préparation des échantillons

Tous les échantillons analysés ont été préparés selon la procédure décrite précédemment.

6.2.2.1 Choix du solvant

Les complexes étudiés sont des composés relativement instables, le choix du solvant est donc un paramètre critique ; le solvant doit dissoudre à la fois le complexe et la matrice et il ne doit pas être décomplexant (l'affinité de la β -cyclodextrine pour sa molécule hôte doit être supérieure à celle de la β -cyclodextrine pour le solvant). Il s'avère que, sur la base de ces critères, le méthanol est le solvant le plus approprié.

6.2.2.2 Choix du porte-échantillon

Le porte-échantillon utilisé pour nos analyses est une plaque en aluminium dont l'une des faces est lisse et l'autre rugueuse.

Au cours d'une première série d'expériences, nous avons choisi de déposer la solution matrice/complexe sur la face lisse du porte-échantillon en pensant que cela nous permettrait d'obtenir des échantillons plus homogènes et par conséquent plus aptes à donner des résultats reproductibles d'un impact laser à l'autre sur toute la surface.

En réalité, les échantillons obtenus en suivant cette méthode ne sont pas très homogènes ; leur observation au microscope optique montre une accumulation de cristaux sur les bords du dépôt avec la présence de quelques cristaux dispersés au centre. De plus, l'analyse de ces échantillons n'a donné aucun résultat ; seuls des pics de basse masse correspondant à la matrice fragmentée ou intacte ont été observés.

Nous avons alors émis l'hypothèse que l'état de surface du porte-échantillon pouvait jouer un rôle important. De ce fait, nous avons retourné le porte-échantillon et réalisé le dépôt sur sa face rugueuse. Nous avons dès lors pu détecter le pic pseudo-moléculaire correspondant au complexe analysé (complexe β -cyclodextrine/acide para-N,diméthyl-amino-cinnamique).

Il semble donc que l'état de surface du porte-échantillon joue effectivement un rôle non négligeable pour l'obtention de bons résultats analytiques. Il est probable qu'une augmentation de la surface spécifique du substrat (porte-échantillon) liée à la rugosité et par conséquent de la surface d'interaction entre l'échantillon et l'atmosphère soit un élément favorable pour obtenir de bons résultats. En effet, cela pourrait contribuer à accélérer le processus d'évaporation du solvant et ainsi permettre d'obtenir des cristaux plus petits, plus nombreux et mieux répartis sur toute la surface c'est à dire une meilleure homogénéité. Un suivi par microscopie optique de la cristallisation a été effectué et a confirmé cette hypothèse.

6.2.2.3 Choix de la matrice

La matrice doit présenter une forte absorption à la longueur d'onde du laser utilisé pour l'analyse. Le coefficient d'absorption molaire d'une matrice à une longueur d'onde donnée est un paramètre auquel on accède facilement par spectroscopie UV-visible. Par contre, l'état actuel des connaissances sur les processus de cristallisation ne permet pas de prévoir la capacité d'une matrice donnée à incorporer des macromolécules dans sa structure cristalline de façon homogène. Seule une observation des échantillons au microscope optique peut nous permettre de juger de l'homogénéité apparente du mélange matrice/molécule cible.

L'acide nicotinique est la matrice que nous avons utilisée à 266 nm. Elle présente un maximum d'absorption à cette longueur d'onde et donne des échantillons d'une homogénéité suffisante pour l'obtention de bons résultats.

A 355 nm, nous avons testé deux matrices : l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) et l'acide α -cyano-3-hydroxycinnamique. Alors que cette dernière matrice donne des échantillons homogènes se présentant sous la forme d'une multitude de microcristaux d'environ 1 μm uniformément répartis sur toute la surface du dépôt, la DHB forme des cristaux en aiguilles d'environ 100 μm en taille concentrés principalement sur les bords du dépôt.

L'hétérogénéité relative des échantillons obtenus avec la DHB est certainement responsable des résultats médiocres obtenus avec cette matrice, à savoir l'incapacité de produire le pic pseudo-moléculaire du complexe étudié de façon reproductible sur toute la surface de l'échantillon. Nous avons donc utilisé l'acide α -cyano-3-hydroxycinnamique comme matrice pour nos analyses à 355 nm.

6.2.3 Analyse des complexes

Les conditions de synthèse des complexes sont telles qu'il subsiste une grande quantité de β -cyclodextrine résiduelle dans les échantillons. De ce fait, les analyses ont été réalisées de façon à favoriser la sensibilité plutôt que la résolution. De plus, une éjection des ions de la masse 0 à la masse 1000 a été effectuée de manière à éliminer les ions de faible masse abondants qui pourraient occulter une partie de l'information recherchée.

6.2.3.1 Etude à 266 nm

Les spectres obtenus à cette longueur d'onde sont présentés sur la figure 78.

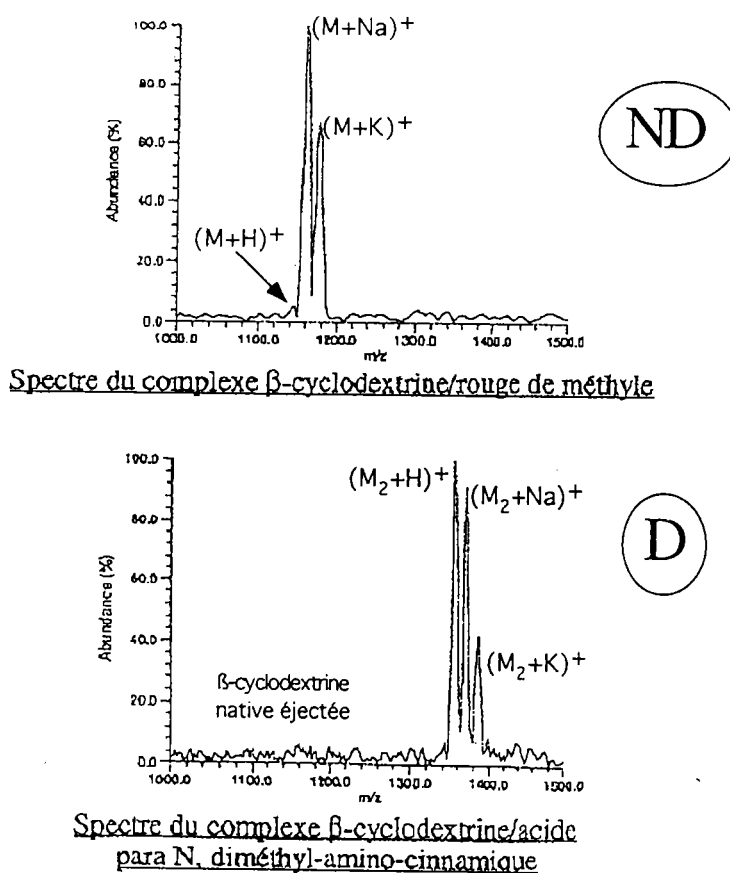


Figure 78. Spectres MALDI-FT-ICR/MS des complexes à 266 nm.

On constate que le complexe β -cyclodextrine/rouge de méthyle n'est pas détecté ; le spectre de la figure 78.a correspondant montre uniquement les pics $[M+H]^+$ ($m/z = 1135$), $[M+Na]^+$ ($m/z = 1157$) et $[M+K]^+$ ($m/z = 1173$) correspondant à la β -cyclodextrine seule. Par contre, le complexe β -cyclodextrine/acide para-N, diméthyl-amino-cinnamique est bien détecté (figure 78.b), il donne une série de pics quasi-moléculaires $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ et $[M+K]^+$ à $m/z = 1326$, 1348 et 1364 respectivement.

Le fait que le complexe β -cyclodextrine/rouge de méthyle ne soit pas détecté est certainement lié à la forte absorption de ce complexe à cette longueur d'onde. Il est probable qu'il subisse une décomplexation suite à l'absorption de photons du faisceau laser incident.

6.2.3.2 Etude à 355 nm

A cette longueur d'onde, les deux complexes ont donné des spectres quasi-identiques (Figure 79).

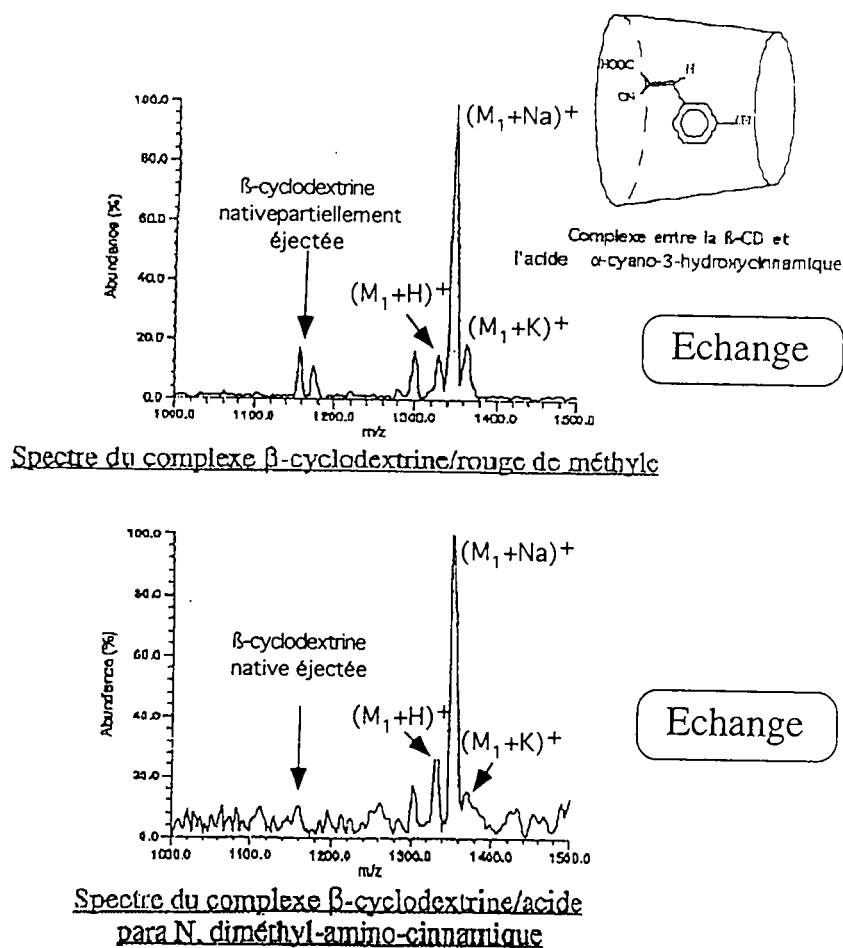


Figure 79. Spectres MALDI-FT-ICR/MS des complexes à 355 nm.

On observe sur les deux spectres une série de pics à $m/z = 1324$, 1346 et 1362 respectivement. Après avoir examiné différentes possibilités, nous avons attribué ces pics à un complexe β -cyclodextrine/acide α -cyano-3-hydroxycinnamique avec $[M'+H]^+$ à $m/z = 1324$, $[M'+Na]^+$ à $m/z = 1346$ et $[M'+K]^+$ à $m/z = 1362$. Il semble donc qu'il y ait eu, dans les deux cas, décomplexation suivie d'une recomplexation en solution de la β -cyclodextrine avec une molécule de matrice. La β -cyclodextrine présente

certainement une affinité plus grande pour la matrice que pour sa molécule "hôte" de départ.

Le spectre d'absorption du complexe résultant est présenté sur la figure 80 et montre que celui-ci n'absorbe que très faiblement à 355 nm, ce qui expliquerait qu'il soit effectivement détecté.

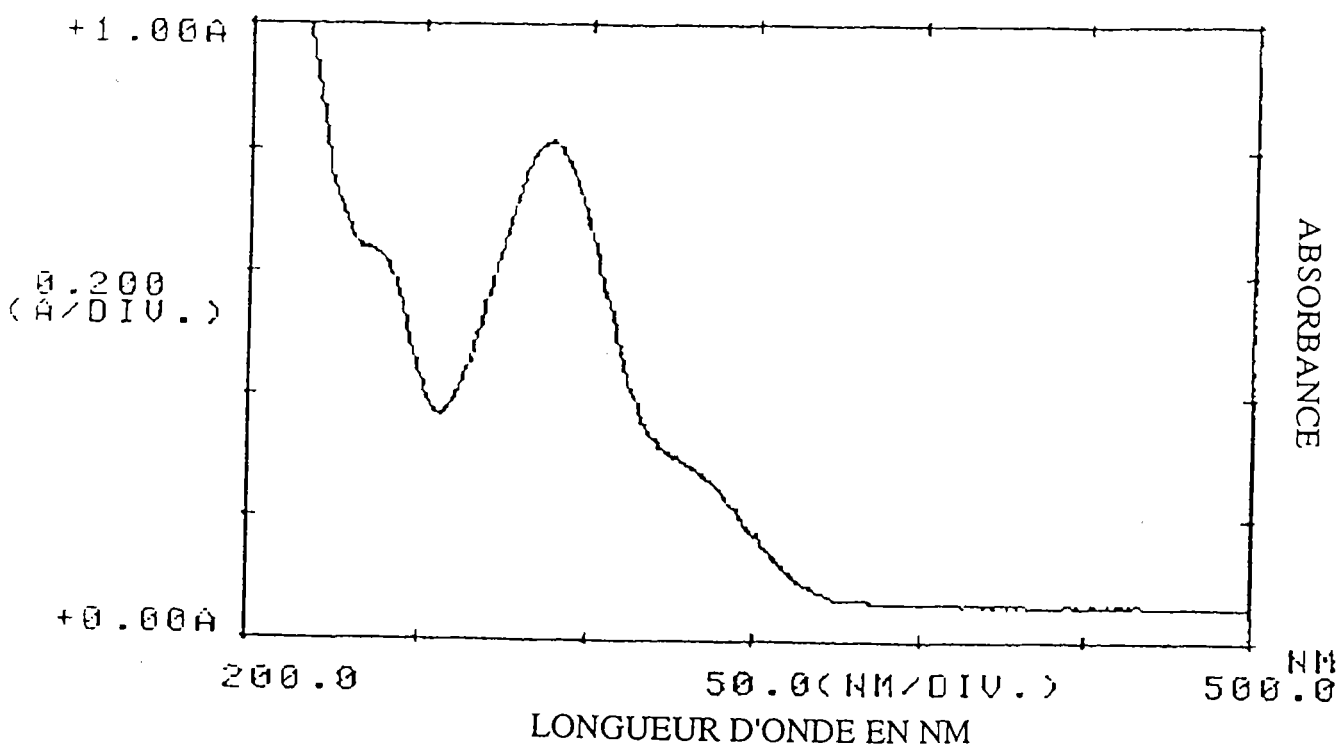


Figure 80. Spectre d'absorption du complexe β -cyclodextrine/acide α -cyano-3-hydroxycinnamique.

Le phénomène de complexation observé entre la β -cyclodextrine et la matrice fait donc obstacle à l'éventuelle détection des complexes de départ. Nous ne sommes donc pas en mesure de confirmer l'hypothèse d'une décomplexation par absorption de photons émise suite aux résultats obtenus à 266 nm. Pour cette raison, nous avons décidé de refaire des analyses, toujours à 355 nm, mais avec d'autres matrices qui n'entreraient pas en compétition avec les molécules "hôtes" pour la complexation avec la β -cyclodextrine. Nous avons essayé l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque et

l'acide cinnamique mais nous n'avons rien détecté, ni les complexes de départ ni d'éventuels complexes avec la matrice. Toutefois, il est difficile de dire pour l'instant si ce résultat est dû à l'inhomogénéité des échantillons obtenus avec ces matrices ou à l'effet d'autres paramètres expérimentaux.

6.2.4 Conclusions et perspectives

Les complexes d'inclusion de la β -cyclodextrine sont des composés fragiles stabilisés uniquement par des interactions non covalentes faibles. De ce fait, leur caractérisation est difficile.

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence la possibilité de détecter le complexe β -cyclodextrine/acide para-N,diméthyl-amino-cinnamique par la technique de désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) couplée à la spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier (FT-ICR/MS). Cependant, la multiplicité des paramètres liés à la technique MALDI et aux échantillons analysés ne nous permet pas encore la détection systématique de tous les complexes de ce type, nous n'avons notamment pas pu détecter le complexe β -cyclodextrine/rouge de méthyle.

Nous avons montré que la matrice utilisée et la longueur d'onde du laser ionisant étaient des paramètres très importants. Si la β -cyclodextrine présente une affinité plus grande pour la matrice que pour sa molécule hôte de départ, on assiste à une décomplexation en solution, lors de la préparation des échantillons, suivie d'une recomplexation de la β -cyclodextrine avec la matrice. Ce dernier point paraît intéresser particulièrement les chercheurs synthétisant ce type de complexes. En effet, ceci leur permettrait de déterminer, relativement simplement, des affinités relatives de la β -CD native pour différents complexants.

D'autre part, la longueur d'onde du laser utilisé doit se situer, semble-t-il, en dehors des bandes d'absorption du complexe. Dans le cas contraire, une décomplexation, vraisemblablement liée à l'absorption de photons du faisceau laser par le complexe, est observée.

Parallèlement, l'analyse de ces complexes par électrospray, une autre méthode d'ionisation "douce", a été réalisée. Dans cette technique, l'ionisation se fait directement à partir d'une solution du composé à analyser et ne permet pas de caractériser l'état solide. Toutefois, elle n'a pas non plus donné de résultats concluants.

La présence notable de β -cyclodextrine résiduelle dans les échantillons, liée à la méthode de synthèse, empêche la détection efficace

du complexe qui apparaît sous la forme d'un pic très faible dans les deux types de techniques. De ce fait, il serait intéressant de parvenir à purifier les complexes afin d'éliminer le gros excès de β -cyclodextrine. Dans cette hypothèse, nous serions en mesure d'obtenir une résolution nettement plus élevée. Par ailleurs, l'étude de ces complexes par MALDI à d'autres longueurs d'onde (193 nm notamment) et avec d'autres matrices pourrait certainement apporter des éléments permettant une meilleure compréhension des interactions laser-matière et molécule cible-matrice.

6.3 Bibliographie

- [6] Lazare S, Granier V, *Laser Chem*, 1989, **10**, 25.
- [71] J. Szejtli, *Medicinal Research Reviews*, 1994, **14**, 353
- [72] A. Dupont, E. Leize, O. Sorokine, A. Van Dorsselaer, J. Ropenga, M. Chateau, D. rabeau, J.F. Letavernier, E. Renard, A. Deratani (submitted to *Carbohydrate Res.*).
- [73] S. Li, W.C. Rudi, *Chem. Rev.*, 1992, **92**, 1457

Conclusion générale

L'analyse des biomolécules par spectrométrie de masse a pris un essor considérable avec en particulier le développement de la **Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice**. Cette technique est considérée comme une technique d'ionisation douce permettant l'obtention, en phase vapeur, d'ions de haut poids moléculaire.

Les analyses MALDI sont effectuées à partir d'échantillons solides. La préparation de ces derniers est une étape fondamentale pour l'obtention de bons résultats. Nous avons montré que différents paramètres jouent un rôle essentiel à ce niveau :

- ✓ le choix de la matrice dépend du type de composé à analyser, de la gamme de masses et de la reproductibilité souhaitée,
- ✓ les solvants utilisés pour dissoudre la matrice et les molécules cibles doivent être compatibles,
- ✓ la vitesse et le mode d'évaporation (chauffage, sous vide, ...) du solvant jouent un rôle important sur la cristallisation des matrices. Ils influencent la taille et la répartition des cristaux sur le porte-échantillon,

- ✓ le lavage des échantillons permet, dans certains cas, l'élimination d'une partie des sels (utilisés lors de la synthèse pour stabiliser les biomolécules) présents.

Jusqu'à un passé relativement proche, le choix des matrices a été gouverné par l'obtention de cristaux toujours plus gros. A l'heure actuelle, on recherche des **dépôts homogènes** au niveau macroscopique permettant l'obtention de **résultats plus reproductibles**. Notre travail sur les matrices polymériques s'inscrit dans cette démarche. En effet, l'utilisation de **la nitrocellulose** comme matrice permet l'obtention de dépôts extrêmement homogènes conduisant à des résultats très reproductibles. Cependant, il existe une limitation majeure à l'utilisation de ce type de matrices : comme beaucoup de polymères synthétiques, elles ne sont solubles que dans de rares solvants (la nitrocellulose est notamment insoluble dans l'eau qui est le principal solvant des molécules biologiques).

La technique MALDI est le plus souvent couplée avec un spectromètre de masse à temps de vol. Cependant, ce travail, ainsi que d'autres relatés dans la littérature toujours plus nombreux, utilise la spectrométrie de masse à transformée de Fourier. Dans ce dernier cas, l'objectif est de gagner en résolution. Les résultats obtenus sur le mélange des quatre peptides ont montré que le choix du séparateur de masses n'influe que très peu. En effet, si quelques précautions (notamment au niveau des délais existant dans une séquence FTMS entre l'ionisation et l'excitation des ions) sont prises, l'allure spectrale correspondant aux ions $(M+H)^+$ n'est pas modifiée. Ce mémoire a permis de montrer **l'intérêt de la spectrométrie de masse FTMS** lors des études MALDI. Plus particulièrement, la microsonde laser FTMS développée à Metz permet à la fois de **changer facilement de longueurs d'onde** et de **contrôler avec précision l'énergie déposée** sur le porte-échantillon. Ces deux caractéristiques nous ont permis de mieux comprendre certains aspects du mécanisme complexe de la Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice.

L'amélioration future des résultats obtenus à partir de la technique MALDI passe par une **meilleure compréhension des mécanismes de désorption** des molécules de matrice. Dans ce contexte, nous avons voulu caractériser les ions et les molécules neutres issus d'une impulsion laser afin de mieux comprendre la dynamique du jet moléculaire qui suit

l'impulsion laser. Nous avons montré que, si dans presque tous les cas, la principale molécule neutre émise était le dioxyde de carbone (et le fragment décarboxylé correspondant), il existe une grande diversité au niveau des ions formés. Les effets inductif et/ou mésomère correspondant aux différents substituants présents sur le cycle benzénique et sur le carbone en α du groupement carboxyle gouvernent le type de composés formés (monomère, dimère, ...). La disponibilité du groupement carboxyle permet ou non la formation de dimères.

L'une des matrices à la "mode" actuellement : l'acide α cyano-4-hydroxycinnamique ne forme pas de dimère. En effet, la présence simultanée du groupement hydroxyle en position 4 sur le cycle et du groupement nitrile sur le carbone en α du COOH, induit un départ extrêmement rapide du groupement carboxyle. De ce fait, la dimérisation ne peut se faire. Les excellents résultats de l'acide α cyano-4-hydroxycinnamique s'expliquent en partie par **sa capacité à se décarboxyler extrêmement rapidement** sous l'effet du faisceau laser. Il faut également associer à ce dernier point, **l'obtention de dépôts très homogènes** à l'échelle du micromètre.

L'étude des différentes β -CD a permis de mettre en évidence deux potentialités particulièrement intéressantes de la technique MALDI :

- ✓ la **distinction entre deux types de β -CD** différemment polyméthylées est possible en utilisant de **façon combinée** une **matrice polymérique** (la nitrocellulose) et **deux longueurs d'onde** afin de désorber et ioniser l'échantillon. La première d'entre elles correspond à une zone du spectre d'absorption où la matrice absorbe fortement alors que la seconde est située dans un domaine spectral d'absorption nulle,
- ✓ la **détection de complexes d'inclusion** à base de β -CD. A ce niveau nous avons montré, d'une part, l'importance du **choix de la matrice** qui peut, lors de l'étape de mise en solution, se substituer au complexant. D'autre part, si la **longueur d'onde du faisceau laser incident** correspond à un maximum d'absorption du complexe on constate une **photodissociation** de celui-ci en phase gazeuse.

Pour que cette technique d'analyse des molécules de haut poids moléculaire gagne encore en fiabilité, son principal développement dans l'avenir devra être un **gain en résolution**. Ce dernier point pourra être

obtenu grâce, tout d'abord, à la généralisation de techniques de lavage du type de celle mise au point par P. Roepstorff et coll. sur l'acide α cyano-4-hydroxycinnamique. Mais aussi grâce à des développements instrumentaux. Le dernier en date concerne les temps de vol et plus précisément l'**extraction pulsée des ions** qui a été mise au point par Brown et coll.

Enfin, il est important de préciser que l'un des inconvénients majeurs, lors de ce type d'étude est le risque de "**suppressions**". En effet, lors de l'analyse de mélanges complexes, certains composés peuvent ne pas être détectés. Ceci impose lors de l'interprétation des résultats (notamment obtenus sur des échantillons inconnus) une **extrême prudence**. Pour éviter toute erreur, le **recoupement des résultats issus de plusieurs techniques**, et plus particulièrement de l'**électrospray**, est une stratégie bien adaptée.
