

UNIVERSITÉ LILLE 1
Sciences et technologies

UFR DE PHYSIQUE

Thèse de doctorat

École doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement
Optique et lasers, physico-chimie, atmosphère

2013

Présentée par

LAURENT DIOLOGENT

**DÉVELOPPEMENT ET CARACTÉRISATION
DE TECHNIQUES POUR L'AMÉLIORATION
DE LA SENSIBILITÉ ET DE LA RÉOLUTION
SPATIALE DES SOURCES MALDI :
DÉSOLVATATION LASER ET MASQUES**

Thèse co-dirigée par :
Pr. Isabelle FOURNIER
Dr. Michael ZISKIND

Jury :

M. Gérard BOLBACH
M. Richard KNOCHENMUSS
M. Frédéric AUBRIET
M. Cristian FOCSA
Mme. Isabelle FOURNIER
M. Michael ZISKIND

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Co-directrice de thèse
Co-directeur de thèse

**DÉVELOPPEMENT ET CARACTÉRISATION
DE TECHNIQUES POUR L'AMÉLIORATION
DE LA SENSIBILITÉ ET DE LA RÉOLUTION
SPATIALE DES SOURCES MALDI :
DÉSOLVATATION LASER ET MASQUES**

Remerciements

Mes remerciements s'adressent tout d'abord aux professeurs Michel SALZET et Georges WLODARCZAK pour m'avoir permis de réaliser une thèse dans le cadre d'un partenariat entre les laboratoires LSMBFA et PhLAM.

Je tiens ensuite à remercier Madame la Professeure Isabelle FOURNIER et Monsieur le Docteur Michael ZISKIND pour ces quelques années aussi passionnantes qu'épuisantes et leur exprimer ma profonde gratitude pour leur gentillesse, leur ouverture d'esprit, leur disponibilité et bien d'autres qualités tant humaines que scientifiques.

Je remercie tout particulièrement Monsieur le Docteur Richard KNOCHENMUSS et Monsieur le Directeur de Recherche Gérard BOLBACH d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également vivement Monsieur le Professeur Frédéric AUBRIET d'avoir accepté d'être examinateur sans oublier Monsieur le Professeur Cristian FOCSA, responsable de l'équipe ANATRAC pour avoir accepté d'être membre du jury.

Dans le cadre des travaux réalisés autour des masques, j'adresse mes remerciements au Docteur Anthony TREIZEBRE et au Professeur Bertrand BOCQUET qui ont permis la réalisation des masques au sein de l'IEMN.

Merci également à Marc Le PARQUIER, Maxence WISZTORSKY, Julien FRANCK, Hervé DAMART, Thierry VITSE et Laurent MANET pour leur aide et leurs conseils d'ordre technique à divers moments de cette thèse et sans lesquels certaines manipulations n'auraient probablement pas pu être correctement réalisées.

Je remercie aussi les organisateurs des différents congrès auxquels j'ai participé, Serge DELLA-NEGRA pour Desorption 2010, la SFSM et son président, Michel SALZET, pour SMAP 2011, ainsi que Bernhard SPENGLER pour Desorption 2012. Ces congrès m'ont donné l'occasion de valoriser ce travail dans un cadre international et de toujours donner lieu à des discussions très enrichissantes.

Je veux aussi remercier l'ensemble des membres des deux laboratoires et tout ceux qui ont été d'une quelconque aide dans la réalisation de ces travaux. Merci aussi aux personnels administratifs de l'Université Lille 1 dont l'aide m'a parfois été nécessaire, notamment pour les inscriptions et mes requêtes parfois farfelues qui m'ont fait croire par moment que je réalisais le 8^{ème} des douze travaux d'Astérix.

Pour leur aide dans le cadre des nombreux enseignements auxquels j'ai participé, je remercie profondément Matthieu BEUCAMP, Guillaume PÉNIDE, Hervé HERBIN et tout ceux qui m'ont aidé d'une quelconque manière.

J'adresse une gratitude toute particulière à ma mère, ma sœur et mon frère, ainsi qu'à mes amis qui ont toujours été d'une grande aide au cours de ces années pour m'avoir soutenu et permis l'évasion morale parfois nécessaire à une santé mentale presque équilibrée.

Développement et caractérisation de techniques pour l'amélioration de la sensibilité et de la résolution spatiale des sources MALDI : Désolvatation laser et masques.

Laurent DIOLOGENT, Université Lille 1, Thèse, 2013

Des remerciements vont aussi aux deux associations auxquelles j'ai participé à la création, l'Association des Ch'tis Chinois et l'Association des doctorants de l'école doctorale SMRE, ainsi que leurs membres, amis et partenaires, qui ont été à certains moments de grandes sources de stress et d'énerverment, mais toujours compensés par la joie de voir la réalisation d'un évènement réussi.

Spéciales dédicaces à Arkantos, Castor, James Raynor, Sarah Kerrigan, Zeratul, Tassadar (ceux de 1998 et 1999 pour ces 4 derniers), Arthas, Illidan, Les Chasseurs de l'Arche, aux CL4P-TP, aux Age of (mais pas au dernier), aux Trine, aux Sacred, à Bernard WERBER, à Amélie NOTHOMB, à John LANG et au Naheulband, à Ginko, à Gally, à Gatsu, à Alpha, à Alpheus, ainsi qu'à beaucoup d'autres qui me permettent encore de m'évader de ce monde ô combien perfectible.

Enfin, même s'ils ne pourront jamais lire cela, des remerciements très spécifiques vont à ma grand-mère, mon grand-père et mon père, tous trois morts trop tôt et à des moments trop particuliers.

Résumé

La spectrométrie de masse utilisant une source MALDI est une technique d'analyse qui a montré un énorme potentiel de développement et d'application dès son apparition, et notamment pour la biologie à travers sa capacité à analyser des molécules de très haut poids moléculaires sous leur forme intacte. Cependant, des limitations liées à la technique et aux fondamentaux de cette méthode limitent son évolution, notamment pour le développement de l'imagerie biologique. Ainsi, les principales limitations de cette technique se situent au niveau de sa sensibilité à cause de la trop faible proportion de composés chargés analysables, et de sa résolution spatiale en raison de la chute de sensibilité observée lorsque les dimensions de la zone irradiée sont réduites par focalisation du laser. Le but des travaux menés dans le cadre de cette thèse a donc été de développer des systèmes qui présentent la possibilité d'aller au-delà de ces limitations.

Ainsi, l'utilisation d'un second laser pour briser les agrégats produits lors de la phase de désorption a permis d'observer que la matrice pouvait agir comme un tampon énergétique en phase gazeuse et que l'utilisation d'un laser continu ou impulsionnel n'avait pas le même effet sur l'analyse. En effet, l'utilisation du laser continu en tant que second laser montre une diminution de l'intensité des signaux de matrice et d'analyte à mesure que son énergie augmente, effet qui est plus important pour les signaux de matrice que pour ceux d'analyte. L'action du laser impulsionnel, selon l'énergie utilisée et le décalage temporel avec le premier laser, semble montrer une très légère augmentation de l'intensité des signaux.

L'utilisation de masques de silicium pour réduire les dimensions de la zone irradiée a permis non seulement de remplir cet objectif initial, mais aussi de montrer un effet significatif sur l'intensité des signaux et leur résolution spectrale tout en permettant l'analyse d'une zone très réduite par rapport à une analyse sans masque. Une résolution spatiale d'analyse d'une dizaine de micromètres a pu être atteinte avec certains masques, sans agir sur la focalisation du faisceau laser initial. Certains masques ont aussi permis d'observer une augmentation significative de l'intensité des signaux par rapport aux analyses réalisées en leur absence et cela sur une zone réduite de l'échantillon, probablement en raison d'une interaction avec le silicium et d'un confinement de la plume à l'intérieur des ouvertures. Les spectres acquis avec les masques ont aussi permis de mettre en évidence qu'à mesure que les ouvertures étaient réduites, la largeur des signaux suivait cette tendance, ce qui a permis de rendre plus visibles certains signaux. Ce phénomène peut être dû au profil du faisceau laser résultant du passage d'une partie seulement de ce faisceau à travers une ouverture qui permet d'irradier l'échantillon de

façon plus homogène et donc de limiter la dispersion d'énergie cinétique des composés chargés désorbés.

Sommaire

Remerciements.....	I
Résumé.....	III
Publications.....	IX
Liste des illustrations.....	X
Lexique des abréviations.....	XIV
Introduction.....	1
Chapitre I : État de l'art du MALDI et des mécanismes fondamentaux associés.....	3
I.1 Principe de la source MALDI.....	3
I.1.a Du LDI au MALDI.....	3
I.1.b Principe général du MALDI.....	5
I.1.c Caractéristiques Spectrales.....	6
I.1.d Les matrices MALDI.....	7
I.1.e Préparation des échantillons en MALDI.....	9
I.2 Mécanismes MALDI.....	12
I.2.a Processus de désorption.....	12
I.2.b Mécanismes d'ionisation.....	14
I.2.b.α Ionisation primaire.....	15
I.2.b.α.1 Le modèle des agrégats.....	15
I.2.b.α.2 Le modèle de photoexcitation et de mise en commun ("energy pooling").....	16
I.2.b.α.2.a Photoexcitation.....	16
I.2.b.α.2.b Mise en commun ("energy pooling").....	17
I.2.b.α.3 Le modèle du fluide polaire.....	19
I.2.b.α.4 Transfert de proton à l'état excité... ..	19
I.2.b.α.5 Assistance pneumatique / modèle de la bulle en expansion.....	20
I.2.b.β Ionisation secondaire.....	21
I.2.b.β.1 Transfert de protons.....	21
I.2.b.β.2 Transfert de cations.....	21
I.2.b.β.3 Transfert électronique.....	23

I.2.b.β.4	Effets de suppression des ions.....	23
I.2.b.β.4.a	Effet de suppression de matrice.....	24
I.2.b.β.4.b	Effet de suppression d'analyte.....	25
I.2.b.β.4.c	Analytes multi-chargés.....	26
I.3	Paramètres d'analyse.....	27
I.3.1	Effets de surface.....	28
I.3.2	Effets du laser.....	30
I.3.2.α	Fluence et irradiance.....	30
I.3.2.β	Taille du spot et résolution spatiale.....	30
I.3.2.γ	Profil du faisceau laser.....	31
I.3.3	Métallisation des échantillons.....	34
I.4	Conclusion.....	35
Chapitre II	Matériels et méthodes.....	36
II.1	Le MALDI-TOF Voyager Elite.....	36
II.1.a	La source MALDI.....	37
II.1.b	L'analyseur temps-de-vol.....	41
II.1.b.α	Principe.....	41
II.1.b.β	Extraction continue et retardée.....	42
II.1.b.γ	Focalisation.....	44
II.1.b.δ	Mode linéaire et réflectron.....	44
II.1.c	Les détecteurs.....	45
II.1.d	Le système de traitement de données.....	46
II.2	Préparation des échantillons.....	47
II.2.a	Analytes et matrices.....	47
II.2.b	Méthodes de préparation des échantillons.....	48
II.2.b.α	Les supports d'analyse.....	48
II.2.b.α.1	La plaque d'échantillonnage.....	48
II.2.b.α.2	Lames de verre-ITO.....	49
II.2.b.β	Méthodes de dépôt.....	49
II.2.b.β.1	Dépôts classiques.....	49
II.2.b.β.2	Dépôts acétone.....	50
II.2.b.β.3	Doubles dépôts.....	50
Chapitre III	Désolvatation laser des agrégats.....	51

Développement et caractérisation de techniques pour l'amélioration de la sensibilité et de la résolution spatiale des sources MALDI : Désolvatation laser et masques.

Laurent DIOLOGENT, Université Lille 1, Thèse, 2013

III.1	Introduction.....	51
III.2	Principe de la manipulation.....	53
	III.2.a Les lasers de désolvatation.....	54
	III.2.a.α Le laser YLR.....	54
	III.2.a.β Le laser Nd-YAG.....	55
	III.2.b Montages optique.....	55
	III.2.c La synchronisation des lasers.....	58
III.3	Résultats.....	59
	III.3.a Expériences de désolvatation par laser continu.....	60
	III.3.b Expériences de désolvatation par laser impulsionnel.....	62
	III.3.b.α Effet du délai de synchronisation entre le laser MALDI et le laser de désolvatation.....	63
	III.3.b.β Effet de l'énergie du second faisceau laser.....	64
III.4	Conclusions et perspectives.....	68
	III.4.a Utilisation de longueur d'onde spécifique.....	69
	III.4.a.α Lasers résonnant avec des fonctions chimiques spécifiques.....	69
	III.4.a.β Désolvatation d'agrégats métastables analyte-eau.....	70
	III.4.b Irradiation résolue spatialement de la plume.....	71
Chapitre IV : Utilisation de masques de silicium en spectrométrie de masse MALDI.....		73
IV.1	Réalisation et intégration des masques dans le spectromètre.....	74
	IV.1.a Fabrication des masques.....	75
	IV.1.a.α Gravure plasma.....	75
	IV.1.a.β Gravure chimique.....	77
	IV.1.b Utilisation des masques pour l'analyse MS.....	79
	IV.1.b.α Maintien sur la plaque d'échantillonnage.....	79
	IV.1.b.β Ciblage et analyse de l'échantillon.....	80
	IV.1.b.γ Paramètres d'acquisition.....	81
	IV.1.b.δ Phénomène de diffraction.....	81
IV.2	Effets des masques sur l'analyse MALDI.....	82
	IV.2.a Résolution spatiale.....	82
	IV.2.b Intensité des signaux.....	84
	IV.2.b.α Mise en évidence d'une augmentation de l'intensité.....	84

IV.2.b.β	Origine de l'amélioration en sensibilité.....	88
IV.2.b.β.1	Lien avec les processus MALDI.....	88
IV.2.b.β.2	Rôle du matériau : effet photoélectrique	89
IV.2.b.β.3	Rôle de la géométrie des masques.....	91
IV.2.c	Résolution Spectrale.....	92
IV.2.c.α	Mise en évidence d'une augmentation de la résolution spectrale.....	92
IV.2.c.β	Origine de l'amélioration en résolution spectrale.....	93
IV.2.d	Cas des grilles.....	94
IV.2.d.α	Comparaison avec les masques.....	94
IV.2.d.β	Origine des écarts mis en évidence.....	95
IV.3	Conclusions et perspectives.....	96
	Conclusions et perspectives.....	98
	Annexe : Complément aux manipulations sur les masques.....	101
A.I	Réalisation de masques par gravure laser.....	101
A.I.1	Montage.....	101
A.I.2	Résultats.....	102
A.II	Imagerie de la plume de désorption.....	104
	Références.....	106
	Résumé.....	135
	Abstract.....	136

Publications

Article soumis (1) :

L.DIOLOGENT, M.Wisztorski, A.Treizebre, C.Focsa, I.Fournier, M.Ziskind
Silicon masks increase sensitivity and spatial resolution in MALDI MS Soumis.

Communications orales (1) :

L.DIOLOGENT, M.WISZTORSKI, G.BOLBACH, C.FOCSA, M.ZISKIND, I.FOURNIER
 Demi-journée du club jeune de la Société Française de Spectrométrie de Masse, 28ème journée
 française de spectrométrie de masse ; 19 septembre 2011 ; Avignon, France
Aspect fondamental de l'utilisation de masques en MALDI

Posters (3) :

L.DIOLOGENT, M.ZISKIND, I.FOURNIER, C.FOCSA, G.BOLBACH
 Desorption 2010; 30 mai au 3 juin 2010; Seillac, France
Towards increase in the sensitivity of the MALDI technique

L.DIOLOGENT, M.WISZTORSKI, G.BOLBACH, C.FOCSA, M.ZISKIND, I.FOURNIER
 SMAP 2011; 19 au 22 septembre 2011; Avignon, France
Fundamental aspects of masks used in MALDI

L.DIOLOGENT, G.BOLBACH, C.FOCSA, M.ZISKIND, I.FOURNIER
 Desorption 2012; 3 au 7 juin 2012; Rauischholzhausen, Allemagne
Fundamental aspects of masks use in MALDI

Liste des illustrations

Figures :

Chapitre I :

- Figure I.1 : Structure des matrices HCCA, DHB et acide sinapinique..... 8
- Figure I.2 : Simulation des événements de désorption (a) et d'ablation (b) [R.Knochenmuss/2005].....13
- Figure I.3 : Mise en évidence du phénomène de pooling [R.Knochenmuss/2006a].....18
- Figure I.4 : Mise en évidence du phénomène de pooling et évolution de la population relative des différents états excités apparus lors de l'irradiation laser au cours du temps [R.Knochenmuss/2006a].....18
- Figure I.5 : Spectres MALDI-ToF d'échantillons contenant de la caféine réalisés avec une matrice HCCA pour différentes proportions de matrice et d'analyte (A, M/A=3 ; B, M/A=27 ; C, M/A=3 (avec une intensité laser plus élevée)) [G.McCombie/2004].....24
- Figure I.6 : Mise en évidence du phénomène de suppression du signal d'analyte sur un mélange de plusieurs analytes (A, B, C, D et E) avec la matrice DCTB, les rapports molaires entre matrice et analytes sont indiqués sur les spectres (M/A) [A.J.Hoteling/2006].....26
- Figure I.7 : Comparaison des signaux de matrice et d'analyte obtenus à partir de dépôts réalisés par électrospray pour différentes épaisseurs (du plus fin à droite au plus épais à gauche (200 à 3000 nm)) sur des substrats en acier et en or [R.Knochenmuss/2006b].....29
- Figure I.8 : Comparaison des niveaux d'énergie HOMO et LUMO de différentes matrices avec le niveau de Fermi de l'or et de l'acier [R.Knochenmuss/2006b].....29
- Figure I.9 : Photographie au microscope électronique à balayage d'un monocristal d'acide sinapinique (a) et d'un agrandissement d'une zone irradiée par un laser azote à l'intérieur d'une source MALDI [I.Fournier/2002b].....32
- Figure I.10 : Profil des lasers utilisés dans les expériences de A.Holle et al. [A.Holle/2006].33
- Figure I.11 : Évolution de l'intensité des signaux d'analyte en fonction du nombre de tirs laser pour différents profils du faisceau laser [A.Holle/2006].....33

Figure I.12 : Image optique d'un échantillon MALDI de DHB obtenu par électrospray couvert à moitié par une fine couche d'or et image MALDI du signal de matrice protonée ($[m+H]^+$) (plus sombre \equiv signal plus intense) [G.McCombie/2006]...34

Chapitre II :

Figure II.1 :	Les différentes parties du spectromètre de masse MALDI-TOF Voyager Elite.	36
Figure II.2 :	Schéma de la source du spectromètre.....	37
Figure II.3 :	Connexion du sas d'introduction avec l'enceinte de la source.....	38
Figure II.4 :	Positionnement de la plaque dans la source.	39
Figure II.5 :	Trajet optique du faisceau laser.....	40
Figure II.6 :	Évolution de l'énergie moyenne fournie par le laser du spectromètre en fonction de l'intensité donnée par le logiciel à différentes dates.....	41
Figure II.7 :	Trajet des ions à l'intérieur du TOF.....	42
Figure II.8 :	Schéma reprenant le principe de l'extraction retardée.....	43
Figure II.9 :	Système de traitement de données du spectromètre.....	46
Figure II.10 :	Plaque d'échantillonnage présentant quelques dépôts.....	48

Chapitre III :

Figure III.1 :	Profils de faisceaux laser gaussien (a) et top-hat (b).....	54
Figure III.2 :	Photographie d'un modèle de chemin optique pour les expériences de double laser avec le laser impulsionnel.....	55
Figure III.3 :	Mise en évidence des trajets des deux lasers dans le spectromètre (A) et au niveau de l'échantillon (B).....	56
Figure III.4 :	Description du montage de double laser dans le cas du laser continu.....	57
Figure III.5 :	Description du montage de double laser dans le cas du laser impulsionnel.....	57
Figure III.6 :	Schéma des étapes de déclenchement des différents éléments du système avec le second laser impulsionnel.....	59
Figure III.7 :	Représentation des différentes étapes de déclenchement des deux lasers.....	59
Figure III.8 :	Spectres de masse obtenus pour une puissance du premier laser de 2,3 $\mu\text{J}/\text{pulse}$ et différentes puissances du second laser.....	61
Figure III.9 :	Évolution de l'intensité relative des signaux des ions de la matrice à m/z 190 et 379 et de l'analyte à m/z 1061 normalisée par rapport au signal le plus intense en fonction de la puissance du second laser (Laser fibré continu YLR).....	62

Figure III.10 : Évolution de l'intensité du signal d'analyte en fonction du délai fixé entre les deux lasers. L'énergie du faisceau laser de désolvatation est fixée à 10 mJ/pulse.....	63
Figure III.11: Évolution de l'intensité des signaux $[m+H]^+$ (m/z 190) et $[2m+H]^+$ (m/z 379) de la matrice HCCA en fonction du délai fixé entre les deux lasers. L'énergie du faisceau laser de désolvatation est fixée à 10 mJ/pulse.....	64
Figure III.12 : Spectres de masse obtenus pour un délai de 80 ns entre les deux lasers et pour plusieurs énergies du second laser.....	65
Figure III.13 : Évolution de l'intensité des signaux d'analytes (a : bradykinine protonée à m/z 1061 ; b : ACTH 18-39 à m/z 2466) en fonction de l'énergie du second laser et pour plusieurs délais entre les deux lasers.....	66
Figure III.14 : Évolution de l'intensité des signaux de matrice protonée (m/z 190) en fonction de l'énergie du second laser et pour plusieurs délais entre les deux lasers.....	67
Figure III.15 : Mise en évidence d'agrégats de tryptophane hydraté obtenus par désorption résonnante (IR-OPO) d'une solution de tryptophane-eau gelée [M.Ziskind/2004].....	71
Figure III.16 : Imagerie LIF d'une plume de désorption obtenue à partir d'un échantillon de matrice 3-HPA et d'analyte Dnase I marqué au tétraméthylrhodamine [A.A.Puretzky/1999].....	72

Chapitre IV :

Figure IV.1 : Images d'ouvertures observées au microscope électronique à balayage.....	74
Figure IV.2 : Étapes de la fabrication des masques par gravure plasma.....	76
Figure IV.3 : Étape de fabrication des masques par gravure chimique.....	78
Figure IV.4 : Disposition des masques pour l'analyse MALDI MS.....	79
Figure IV.5 : Mise en évidence de la limite de visualisation de l'échantillon à travers une ouverture.....	80
Figure IV.6 : Zones désorbées observées sur des échantillons sans masque (a) et à travers des masques de dimensions $e = 60 \mu\text{m}$ et $D = 100 \mu\text{m}$ (b), $50 \mu\text{m}$ (c) et $25 \mu\text{m}$ (d) de côté, le laser arrivant à 45° par rapport à la normale.....	83
Figure IV.7 : Mise en évidence du phénomène de réflexion sur les parois des ouvertures.....	84
Figure IV.8 : Évolution de l'intensité du signal d'analyte ($[M+H]^+$, bradykinine, m/z ~ 1061 Da) avec ou sans masque en fonction de la fluence du faisceau laser (les barres d'erreurs représentent les écarts types).....	85

Développement et caractérisation de techniques pour l'amélioration de la sensibilité et de la résolution spatiale des sources MALDI : Désolvatation laser et masques.

Laurent DIOLOGENT, Université Lille 1, Thèse, 2013

Figure IV.9 : Évolution comparée des intensités des signaux de bradykinine protonée et cationée ($[M+H]^+$, 1061 Da ; $[M+Na]^+$, 1083 Da ; $[M+Si]^+$, 1088 Da ; $[M+K]^+$, 1099 Da) avec M100 en fonction de l'énergie du faisceau laser (les barres d'erreurs représentent les écarts types).....	87
Figure IV.10 : Spectres de masse obtenus à partir d'une coupe de cerveau de rat sans et avec un masque d'ouverture 100 μ m.....	88
Figure IV.11 : Irradiation d'une ouverture à flancs inclinés. Aucune réflexion spéculaire du laser vers l'échantillon n'est possible pour cette géométrie d'ouverture.....	90
Figure IV.12 : Agrandissement du signal $[M+H]^+$ de la bradykinine en l'absence et en présence de masque.....	93
Figure IV.13 : Évolution de l'intensité du signal d'analyte ($[M+H]^+$ de la bradykinine, $m/z \sim 1061$ Da) avec un masque et une grille en fonction de la fluence du faisceau laser.....	94
Figure IV.14 : Agrandissements du signal d'analyte pour un masque et une grille.....	95
Figure IV.15 : Mise en évidence du nombre d'ouverture irradiée par un spot laser de profil gaussien lors du ciblage d'une ouverture sur une grille ou un masque.....	96

Annexe :

Figure A.1 : Schéma du montage de gravure laser.....	101
Figure A.2 : Photographies d'ouvertures obtenues par gravure laser dans une plaque de cuivre (a) et un wafer de silicium (b).....	102
Figure A.3 : Photographies d'ouvertures obtenues par gravure laser pour différents temps de perçage de la plaque de cuivre.....	103
Figure A.4 : Photographies d'ouvertures obtenues par gravure laser sur plaque de cuivre pour différentes énergies d'irradiation (l'irradiation laser a été stoppée juste après la percée).....	104
Figure A.5 : Photographies d'ouvertures obtenues par gravure laser de la plaque de cuivre pour plusieurs distances séparant les positions d'irradiation, (l'irradiation laser a été stoppée juste après la percée).....	104
Figure A.7 : Représentation schématique du montage d'imagerie de plume.....	105

Tableau :

Tableau IV.1 : Paramètres d'analyse MALDI-TOF MS en mode linéaire avec extraction retardée.....	81
---	----

Développement et caractérisation de techniques pour l'amélioration de la sensibilité et de la résolution spatiale des sources MALDI : Désolvatation laser et masques.

Laurent DIOLOGENT, Université Lille 1, Thèse, 2013

Lexique des abréviations

ACN	↔	acétonitrile
ACTH	↔	Hormone adrénocorticotrophine
AP	↔	Affinité protonique
AP(-MALDI)	↔	(MALDI à) pression atmosphérique
DCTB	↔	trans-2-[3-(4-tert-Butylphenyl)-2-methyl-2-propenylidene]malononitrile
x,y-DHB	↔	acide x,y-dihydroxybenzoïque
D/I	↔	désorption/ionisation
DIOS	↔	desorption/ionization on silicon
DRIE	↔	Deep reactive ion etching
ESI	↔	electrospray ionization
F	↔	fluence
G (+nombre)	↔	grille (+dimension)
HCCA	↔	acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
HOMO	↔	highest occupied molecular orbital
3-HPA	↔	acide 3-hydroxypicolinique
HPLC	↔	high performance liquid chromatography
ICCD	↔	intensified charge-coupled device
ICP	↔	inductively coupled plasma
IEMN	↔	institut d'électronique, de microélectronique et de nanotechnologie
IR	↔	infra-rouge
IT	↔	Ion trap
ITO	↔	indium tin oxide
Laser	↔	light amplification by stimulated emission of radiation
LDI	↔	laser desorption/ionization
LIF	↔	laser induced fluorescence
LSMBFA	↔	Laboratoire de spectrométrie de masse et de biologie fondamentale et appliquée
LUMO	↔	lowest unoccupied molecular orbital
m	↔	matrice
m/z	↔	Rapport masse sur charge
M (+nombre)	↔	Masque (+dimension)
M	↔	Analyte
MALDI	↔	matrix assisted laser desorption/ionization
MCP	↔	Micro-Channel Plate
MS	↔	mass spectrometry
Mw	↔	Molecular weight
Nd:YAG	↔	neodyme:yttrium aluminium garnet
OPO	↔	oscillateur paramétrique optique
PhLAM	↔	Laboratoire de physique des lasers, atomes et molécules
SIMS	↔	secondary ion mass spectrometry
TFA	↔	acide trifluoroacétique
TMAH	↔	hydroxyde de tétraméthylammonium
ToF	↔	time-of-flight
UV	↔	ultra-violet
YLR	↔	ytterbium laser rackmount

Introduction

Depuis son introduction à la fin des années 80 suite aux travaux de M.Karas, F.Hillenkamp et K.Tanaka, le MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) est devenu l'une des principales sources de production d'ions pour l'analyse de composés de haut poids moléculaire et très polaires, ce qui en fait un outil très répandu en biologie.

Son principe améliore la désorption/ionisation laser (LDI), technique qui consiste à provoquer le passage à la phase gaz d'un échantillon solide irradié par des impulsions laser. La plume de désorption ainsi formée est constituée de composés neutres et chargés, ces derniers étant séparés puis détectés dans un spectromètre de masse. La désorption s'accompagne généralement d'une importante fragmentation des espèces irradiées, ce qui limite cette technique à l'analyse de petits composés. La MALDI repose sur l'intégration à l'échantillon d'un composé organique particulier, la matrice, caractérisée notamment par la présence d'une bande d'absorption à la longueur d'onde du laser employé. La matrice absorbe alors l'essentiel du rayonnement et protège les composés à analyser d'une irradiation directe. Elle facilite aussi l'évaporation et l'ionisation des espèces les plus lourdes grâce à des processus physico-chimiques complexes. L'addition de cette matrice à l'échantillon a donc permis de faire évoluer la LDI vers l'analyse de composés de très hautes masses et très polaires, comme les composés biologiques. Le développement à la fin des années 90 de l'imagerie MALDI sous l'impulsion du groupe de R.M.Caprioli constitue une étape décisive vers l'analyse de coupe de tissu. L'imagerie MALDI permet en effet d'établir des cartes moléculaires en deux dimensions de l'échantillon sans avoir de connaissance particulière de ses composants, en l'analysant point par point. Les spectres obtenus sont traités par informatique pour donner la localisation et, dans une certaine mesure, les proportions des constituants présents.

L'imagerie MALDI, par comparaison à d'autres techniques d'imagerie par spectrométrie de masse, permet l'identification de nombreuses familles de composés endogènes (métabolites, lipides, peptides, protéines,...) ou exogènes (médicaments, xénobiotiques,...) au tissu sous leur forme intacte. Cependant, malgré ses atouts, la MALDI fait face à certaines limitations et en particulier en termes de résolution spatiale. En effet, si la spectrométrie de masse par ion secondaire (SIMS) en mode statique permet seulement un

accès aux composés de poids moléculaire inférieur à 1 000 m/z, les images sont acquises en routine avec une résolution de 1 μm alors que les images MALDI le sont habituellement à plus de 50 μm . Cette limitation est clairement reliée aux aspects de sensibilité. En effet, la trop faible proportion d'ions qui sont extraits/produits (rapport ions/neutres typiquement de 1:10 000 dans la plume) limite la capacité d'analyse de cette technique et semble s'accroître au fur et à mesure que la zone irradiée est réduite (résolution spatiale augmentée), ce qui la rend inutilisable pour analyser des échantillons au niveau cellulaire voir subcellulaire.

Le but de ce travail de thèse est de développer des méthodes permettant de palier à ces limitations de sensibilité. Nous nous sommes concentrés sur deux méthodes, un montage à double laser et un système de masques. Le montage à double laser a été réalisé pour palier au problème de la faible sensibilité de la technique en se focalisant sur la désolvation assistée par un second laser des agrégats produits lors de l'irradiation de l'échantillon afin de profiter de cette source d'analyte chargé. Le système des masques de silicium a été développé pour améliorer la résolution spatiale du MALDI en analyse par un autre moyen que la classique focalisation du faisceau laser. On verra qu'en plus de remplir son rôle initial, ce système influe aussi sur d'autres paramètres de l'analyse telle que la sensibilité.

Chapitre I :

État de l'art du MALDI et

des mécanismes

fondamentaux associés

Depuis son invention dans les années 80 par F.Hillenkamp et M.Karas [M.Karas/1988], et par K.Tanaka et al. [K.Tanaka/1988], la source de Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI) est devenue une technique de production d'ions très répandue, tout particulièrement en biologie. La capacité de cette source à produire des ions monochargés de composés de très haute masse moléculaire et très polaires à travers un traitement simple et rapide de l'échantillon en fait une candidate privilégiée pour l'analyse de composés biologiques.

I.1 Principe de la source MALDI

I.1.a Du LDI au MALDI

Le principe de fonctionnement du MALDI est basé sur une technique plus ancienne : la Désorption/Ionisation Laser (LDI) [F.J.Vastola/1970]. Les deux techniques conduisent à une production d'ions par irradiation laser des échantillons à analyser. La différence majeure entre LDI et MALDI se situe dans le traitement préalable de l'échantillon ; alors qu'en LDI

Développement et caractérisation de techniques pour l'amélioration de la sensibilité et de la résolution spatiale des sources MALDI : Désolvatation laser et masques.

l'échantillon irradié est brut, il est préalablement co-cristallisé avec un composé appelé matrice en MALDI.

La LDI est limitée à l'analyse des composés les moins fragiles. Dans le cas contraire, les espèces irradiées auront une probabilité importante de se fragmenter, ce qui réduira considérablement le rendement d'ions d'analytes et complexifiera l'analyse des spectres. C'est généralement le cas des composés de haut poids moléculaire (supérieur à quelques milliers de m/z) tels que les peptides ou les protéines dont la LDI ne permet que rarement l'analyse. La matrice utilisée en MALDI a précisément pour rôle d'absorber l'essentiel de l'énergie apportée par le faisceau laser, protégeant ainsi le ou les analytes de l'irradiation directe tout en contribuant à leur désorption et leur ionisation suivant le principe qui sera décrit au paragraphe I.1.b.

Historiquement, le concept de matrice provient d'observations réalisées par F.Hillenkamp et M.Karas lors de l'analyse en LDI de mélanges d'acides aminés. Ces expériences ont montré une très forte augmentation des rendements d'ions pour certains mélanges correspondant à ceux présentant un acide aminé absorbant à la longueur d'onde du laser. Ces études ont par la suite conduit à volontairement ajouter un composé organique aux analytes étudiés créant ainsi les bases de la technique MALDI utilisée de nos jours.

La matrice peut être de nature très diverse (métallique [K.Tanaka/1988], organique [M.Karas/1988], inorganique [K.Tanaka/1988],...), mais a toujours pour point commun de posséder une forte bande d'absorption à une longueur d'onde coïncidant avec celle du laser utilisé. Couramment ces lasers émettent dans l'UV et sont soit des lasers azote (337 nm), soit des Nd:YAG triplés (355 nm). Si les premiers ont connus un grand succès dans les années 1990 et le début des années 2000, les Nd:YAG triplés reviennent en force ces dernières années, grâce à leur durée de vie supérieure et leur plus grande fréquence de répétition qui en font des éléments plus adaptés aux analyses haut débit dans les applications biologiques. Si l'UV-MALDI reste la technique analytique phare, l'IR-MALDI peut également être utilisée et présente des caractéristiques intéressantes pour certaines applications telles que l'analyse d'oligonucléotides de haut poids moléculaire [S.Berkenkamp/1996]. De nombreux composés ont été testés et étudiés comme matrices potentielles [M.Karas/1991 ; J.Krause/1996 ; S.Berkenkamp/1996], mais seuls quelques-uns sont encore utilisés couramment aujourd'hui (Voir § 1.1.d). En effet, l'existence d'une bande d'absorption de la matrice à la longueur d'onde du laser utilisé est une condition nécessaire mais non suffisante. Certains composés répondant à cet unique critère ne font pas de bonnes matrices MALDI et seules sont

sélectionnées les matrices permettant d'aboutir aux meilleures caractéristiques spectrales en terme de sensibilité, intensité des signaux, rapport signal/bruit et résolution spectrale (Voir § 1.1.c). Par exemple, l'efficacité d'analyse peut être très variable pour les isomères d'un même composé [V.Horneffer/1999].

Au-delà du simple aspect de transfert d'énergie de la matrice à l'analyte, celle-ci joue un rôle dans le processus qui conduit à l'ionisation des analytes en servant de source de protons, si elle en est dotée (ce qui n'est pas le cas pour les matrices métalliques). Notons que les protons transférés ne sont pas nécessairement les protons mobiles (tels que ceux des fonctions hydroxyles et carboxyles) [G.Grigorean/1996 ; C.K.L.Wong/1998]. Nous reviendrons plus en détail sur ces mécanismes au paragraphe I.2.

I.1.b Principe général du MALDI

Le MALDI est une source de production d'ions versatile dans son utilisation permettant d'analyser des échantillons initialement en solution ou solide (échantillons biologiques bruts par exemple). La force de cette technique repose sur la possibilité d'accéder à l'analyse d'une grande variété de composés de nature différente sur une grande gamme de masse, et ce, quelque soit la polarité de l'analyte. De plus c'est une technique particulièrement sensible permettant en routine l'analyse de composés jusqu'à des concentrations très faibles de l'ordre de 10^{-9} mol/L [A.N.Krutchinsky/2002 ; E.Nordhoff/2007]. Conventionnellement, les échantillons sont préparés par co-cristallisation des analytes avec la matrice dans un ratio où la matrice est présente en large excès (Voir § I.1.e). Idéalement après mélange de(s) solution(s) d'analytes et de matrice, dans un rapport connu, un faible volume (généralement 1 μ L) du mélange est déposé sur un porte-échantillon. L'évaporation du solvant à pression atmosphérique et température ambiante conduit à l'obtention d'un dépôt solide de quelques millimètres de diamètre constitué de micro-cristaux de matrice. L'échantillon, après transfert dans la source (classiquement sous vide poussé, c'est-à-dire environ 10^{-5} Pa), est irradié par le faisceau laser pulsé généralement nanoseconde. Brièvement, l'absorption par les molécules de matrice des photons conduit à les exciter. Rapidement, la relaxation de l'énergie au sein du système suivant différentes voies conduit à l'éjection de matière (plume) et son expansion sous vide. Dans ce processus, les analytes sont

entraînés par les molécules de matrice. Pendant et après le tir laser (dans un délai inférieur à quelques nanosecondes) des ions sont observés dans la plume en expansion même si ceux-ci restent très minoritaires par rapport à la quantité globale de matière éjectée. Ce phénomène, dit de désorption/ionisation, est un processus complexe qui reste encore mal contrôlé, bien qu'étudié depuis l'introduction du LDI. Nous reviendrons plus en détail sur les connaissances acquises sur ces mécanismes dans la suite de ce chapitre (Voir § I.2).

I.1.c Caractéristiques Spectrales

Les mécanismes de désorption/ionisation conduisent à la création (ou la libération) d'ions positifs et négatifs, de matrice (m) et d'analyte (M), principalement monochargés bien que l'état de charge augmente avec la taille de l'analyte considéré. Ainsi, les spectres en MALDI sont caractérisés par la présence d'ions principalement monochargés et de signaux intenses dans les bas m/z (inférieur à 500) du spectre correspondant aux signaux de la matrice. Le processus de désorption/ionisation aboutit à la présence d'ions positifs et négatifs en quantité équivalente lorsque l'échantillon est déposé sur un substrat non conducteur, mais favorise la production d'ions positifs dans les conditions d'analyses conventionnelles MALDI-ToF [M.Dashtiev/2007]. En mode positif, les ions majoritairement observés correspondent à des ions protonés de type $[M+H]^+$ (ou $[m+H]^+$ pour la matrice). Cependant, les analytes étudiés présentant souvent une bonne affinité pour les ions alcalins (Na^+ , K^+), des ions cationisés de type $[m+Na]^+$, $[m+K]^+$ sont fréquemment observés dans les spectres. Pour les composés de poids moléculaire plus élevé, soit $M > 2000$ u. (et suivant les conditions d'analyse) des ions multichargés peuvent être observés ($[M+2H]^{2+}$, $[M+3H]^{3+}$, ...), avec une augmentation du nombre de charge avec la masse de l'analyte avec un maximum vers $n=5-6$ charges pour les plus hautes masses et une nette prépondérance des ions les moins chargés. D'autres types d'ions sont observables dans certains cas tels que les ions dimères (voir multimères) d'analytes de type $[2M+H]^+$, ou encore des adduits de matrice (généralement $M > 10\,000$) de type $[M+m+H]^+$. Il faut noter que la proportion d'ions multimères et d'adduits a tendance à augmenter avec la masse des analytes étudiés. Pour la matrice, sont observés avec une abondance prépondérante, les signaux de type $[m+H]^+$, $[m+Na]^+$, $[m+K]^+$, $[2m+H]^+$, ainsi que des multimères d'ordre supérieur, les adduits cationisés des multimères ainsi que de nombreux fragments provenant de ces espèces tels que la perte d' H_2O ou de CO_2 . La matrice absorbant à la longueur d'onde du laser, ses signaux sont habituellement d'intensité

importante et nettement supérieure à ceux des analytes. Ainsi, l'analyse de composés de $m/z < 500$ dont les pics coïncideront avec la région de signaux liés à la matrice peut s'avérer difficile, en particulier si le composé recherché est isobarique à un ion de matrice. En mode négatif, le nombre de signaux est réduit et les spectres plus faciles à interpréter mais en général avec une sensibilité plus faible. Dans ce mode, les analytes sont principalement observés sous forme d'ions déprotonés $[M-H]^-$ et sans adduits. Il faut cependant bien garder en mémoire que le nombre de signaux, leur nature, leur intensité relative, la sensibilité et la résolution spectrale sont très fortement dépendants des conditions d'expérience : type de matrice utilisée, ratio analyte/matrice, paramètres de co-cristallisation entre la matrice et l'analyte (homogénéité, morphologie de l'échantillon), fluence laser, nombre de tirs,... Par exemple, une proportion d'ions multichargés plus importante est observée pour certaines matrices. Il est également possible d'observer des phénomènes de suppression des ions de matrice pour certains ratios analyte/matrice particuliers [R.Knochenmuss/1996] (Voir § I.2.b.β.4)

I.1.d Les matrices MALDI

La matrice constitue l'un des paramètres essentiels d'une analyse MALDI. En effet, selon la matrice utilisée, les performances de l'analyse (gamme de masse accessible, nature des composés analysables,...) pourront être grandement affectées. Cependant, il n'est pas facile de savoir a priori si un composé constituera une bonne matrice. Ainsi, nombres de matrices encore utilisées ont été proposées sur la base d'approches empiriques [R.C.Beavis/1989 ; U.Pieles/1993]. La propriété première que doit avoir un composé pour être utilisé en tant que matrice est de présenter une forte bande d'absorption à la longueur d'onde du laser, afin d'assurer le transfert énergétique tout en jouant le rôle de tampon vis-à-vis des analytes lors de l'irradiation. Selon ce critère, on distinguera généralement les matrices dites "ultraviolet" (UV) et celles dites "infrarouge" (IR), selon la longueur d'onde de la bande d'absorption prise en compte. Cependant, cette condition n'est pas suffisante. Comme le montre différents travaux, d'autres paramètres comme l'incorporation des analytes dans le réseau cristallin de la matrice lors de la co-cristallisation ou encore l'affinité protonique (AP) de la matrice [T.W.Jaskolla/2008] sont des paramètres déterminants bien que non encore parfaitement maîtrisés.

Développement et caractérisation de techniques pour l'amélioration de la sensibilité et de la résolution spatiale des sources MALDI : Désolvatation laser et masques.

Dans le cadre de l'analyse de biomolécules par UV-MALDI, les composés couramment utilisés aujourd'hui en tant que matrice sont généralement de petites molécules organiques possédant un noyau aromatique auquel sont reliées des fonctions chimiques susceptibles de pouvoir fournir des ions H^+ (acide carboxylique, hydroxyle, amine). Cependant, plusieurs études [G.Grigorean/1996 ; C.K.L.Wong/1998] ont montré que ces groupements avec un proton échangeable s'ils ont un rôle important dans l'obtention d'ions d'analytes protonés ne sont pas absolument nécessaires et peuvent être compensés notamment par l'incorporation au sein des cristaux de molécules de solvant présentant des hydrogènes labiles [R.Cramer/1997].

Les matrices les plus utilisées aujourd'hui sont l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB) [K.Strupat/1991], l'acide sinapinique [R.C.Beavis/1989] et l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) [R.C.Beavis/1992a] (Voir figure I.1). Ces matrices sont particulièrement utilisées pour l'analyse des composés type peptides/protéines ; d'autres matrices étant plus spécifiquement adaptées pour d'autres familles de composés parmi lesquels nous pouvons citer à titre d'exemple le dithranol pour les polymères synthétiques peu polaires ou encore l'acide 3-hydroxypicolinique (3-HPA) pour les oligonucléotides. Des matrices plus complexes, telles que les matrices ioniques [D.W.Armstrong/2001], faisant appel à une combinaison de composés (matrice conventionnelle et base organique dans le cas des matrices ioniques) peuvent également être employées.

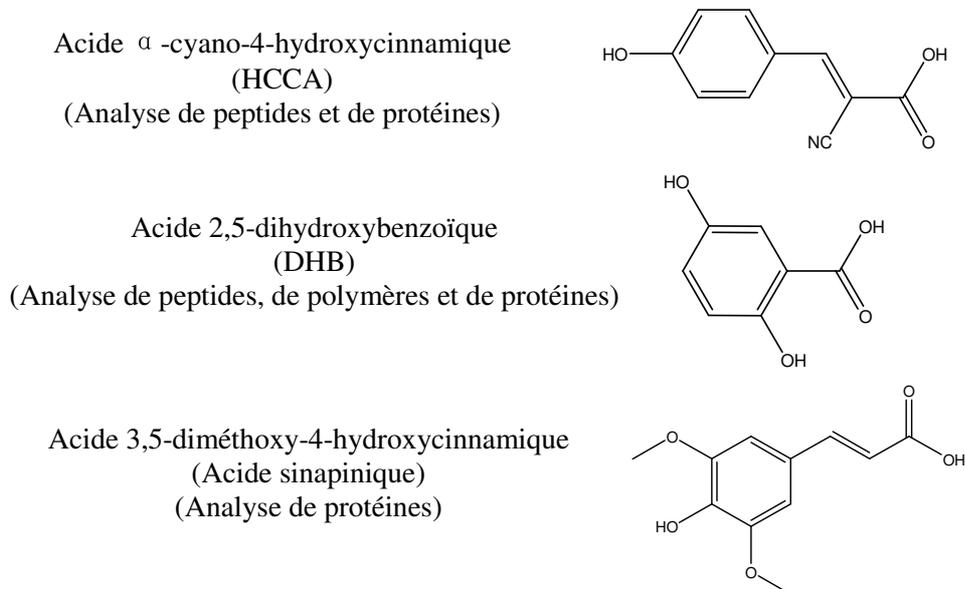


Figure I.1 : Structure des matrices HCCA, DHB et acide sinapinique.

I.1.e Préparation des échantillons en MALDI

La préparation des échantillons est une étape cruciale dans l'analyse MALDI et peut considérablement influencer les caractéristiques spectrales. Ainsi, cet aspect a été étudié dans de nombreuses études expérimentales, le plus souvent empiriques, et fréquemment déconnectées de la compréhension des mécanismes physico-chimiques de désorption/ionisation associés.

L'étude d'analytes en solution nécessite l'utilisation d'un solvant permettant une solubilisation efficace du ou des analytes. Ceux-ci étant classiquement des composés biologiques, l'eau est généralement privilégiée. L'obtention de signaux exploitables est également conditionnée par des rapports de concentration plus ou moins efficaces entre la matrice et les analytes, paramètre qu'il est parfois difficile de contrôler dans les applications biologiques ou la quantité des analytes est généralement faible et indéterminée. Cet aspect est notamment une difficulté rencontrée dans l'analyse d'échantillons biologiques bruts (tissus ou cellules) [R.M.Caprioli/1997 ; P.A. Van Veelen/1993] où la concentration et la nature des composés à étudier n'est pas connue au préalable.

Un dépôt MALDI idéal doit permettre à la fois la conservation de l'échantillon dans les conditions de l'analyse (température, pression, position,...), l'obtention de spectres reflétant la présence des analytes de l'échantillon (ou tout du moins de celui ou ceux recherchés) et la reproductibilité des analyses. Certaines matrices MALDI (par exemple 2,4,6-THAP), présentent une sublimation forte dans les conditions de vide poussé de la source, et si elles ont des caractéristiques intéressantes pour l'analyse de certaines familles de composés, restent délicates d'utilisation car imposant de réaliser les analyses sur des temps courts. Une autre caractéristique importante d'un dépôt MALDI est son homogénéité, tant au niveau de la régularité de sa surface que de sa composition. Les dépôts présentant des points chauds (analytes concentrés dans certains cristaux) ou des cristaux de taille importante peuvent perturber la reproductibilité des analyses. De nombreuses méthodes de dépôts ont été développées depuis l'apparition du MALDI et dépendent fortement de la nature de l'échantillon et/ou de la matrice. Parmi ces différentes méthodes, on peut distinguer celles réalisées manuellement (par exemple avec des pipettes [M.Kussmann/1997]) de celles

réalisées à l'aide de dispositifs automatisés tels que les électronebuliseurs (électrosprays) [J.Axelsson/1997]. Ces deux techniques présentent chacune leurs avantages et inconvénients.

Les dépôts pipettes sont simples et rapides à réaliser : ils se résument en l'obtention d'un mélange de très faibles volumes (de l'ordre du microlitre) de solutions de matrice et d'analyte(s). La méthode la plus simple consiste à déposer 1 μL de solution contenant le mélange analyte/matrice sur le porte-échantillon puis de laisser le dépôt cristalliser à pression atmosphérique et température ambiante. Pour des analyses où la concentration de l'analyte n'est pas connue et supposée faible, et afin de minimiser la dilution de l'analyte, 1 μL de solution de matrice est déposée puis 1 μL de l'analyte est ajouté. C'est la méthode de préparation dite en goutte séchée (dried droplet) qui est la plus couramment utilisée en MALDI pour les analyses de routine. Afin d'améliorer l'homogénéité de la distribution des analytes dans les dépôts (soit la reproductibilité des expériences) tout en générant des dépôts présentant des cristaux de matrice de plus faible dimension et de distribution de taille plus homogène, d'autres méthodes peuvent être employées. Citons en particulier la méthode dite de la couche mince [O.Vorm/1994] (thin layer preparation) dans laquelle 1 μL de matrice en condition de saturation dans un solvant présentant une faible tension de surface (par exemple l'acétone) est pré-déposé sur la cible. Ceci permet de créer une couche très fine de microcristaux de matrice. Par la suite, 1 μL de la solution d'analyte est ajouté sur ce dépôt solide. Le dépôt de l'analyte conduit à une dissolution partielle de la couche de matrice avant recristallisation. Ces dépôts sont clairement plus homogènes mais ne sont pas compatibles avec toutes les matrices. Ils sont particulièrement employés pour la matrice HCCA ou l'acide sinapinique. D'autres méthodes peuvent être citées telles que le dépôt en sandwich [L.Li/1996] ou par broyage des cristaux d'un dépôt en goutte séchée [F.Xiang/1994].

Les méthodes de dépôts automatisés du type électronebuliseur sont longues et requièrent un appareillage spécifique, mais permettent d'obtenir des dépôts très homogènes, donnant lieu à des analyses très reproductibles [J.Axelsson/1997], avec la possibilité de contrôler l'épaisseur de la couche de matrice déposée. De plus, ce dépôt pourra être réalisé sur une surface beaucoup plus grande que les dépôts pipettes. Ces caractéristiques en font une méthode particulièrement adaptée à l'analyse de tissus dans des applications d'imagerie MALDI MS. Les dépôts pipette peuvent aussi être utilisés dans ce cas, mais l'application de la matrice (et donc de son solvant) entraîne un risque de délocalisation des analytes sur toute la surface de l'échantillon, alors que leur maintien à leur position d'origine est essentiel pour une analyse spatiale. Si les dépôts par électronebulisation présentent un grand intérêt aussi bien en préparation conventionnelle que pour des applications particulières telles que

l'imagerie MALDI MS, ils restent essentiellement limités à l'analyse des petits composés (métabolites, composés organiques, lipides, carbohydrates,...). La détection de composés de poids moléculaires plus élevés tels que les peptides et les protéines reste en effet très problématique. Le même phénomène de ségrégation est constaté pour les préparations sans solvant. Cette différence de comportement est attribuée à la nécessité d'une réelle incorporation des peptides et protéines dans le réseau cristallin de la matrice lors de l'étape de co-cristallisation, alors que cette incorporation ne semble pas nécessaire pour les composés de plus faible masse [V.Horneffer/1999].

La question de l'incorporation des analytes au sein des cristaux s'est posée très tôt dans le développement du MALDI. Par exemple, des analyses structurales par diffraction à rayons X de cristaux de 2,5-DHB contenant des analytes dans des concentrations "classiques", ont démontrées que ces analytes pouvaient être considérés comme des "impuretés" ne perturbant pas la formation des cristaux [K.Strupat/1991 ; J.Kampmeier/1997]. La localisation des analytes en profondeur ou en surface des cristaux de matrice est très dépendante de la nature de celle-ci. Ainsi, des études menées sur des cristaux des différents isomères du DHB (2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- et 3,5-DHB) ont montré que dans les deux premiers cas, l'analyte a tendance à être incorporé aux cristaux tandis que les autres isomères de cette matrice entraînent plutôt une adsorption de l'analyte sur la surface des cristaux [V.Horneffer/1999 ; G.Grigorean/1996 ; C.K.L.Wong/1998 ; M.Kussmann/1997 ; J.Axelsson/1997 ; K.Strupat/1991 ; J.Kampmeier/1997 ; V.Horneffer/2001]. Des études menées sur la détermination de la vitesse initiale d'un analyte entre plusieurs de ces isomères ont également montrées de fortes disparités [M.Glückmann/1999] qui peuvent être expliquées par la position des analytes dans les cristaux.

Les mécanismes d'incorporation proposés sont principalement l'inclusion liquide [A.A.Chernoy/1989] et l'incorporation par solution solide [G.G.Z.Zhang/1999]. Dans le premier cas, l'intégration des analytes dans les cristaux serait due à des bulles de solutions emprisonnées dans les cristaux au moment de leur croissance. Dans le second cas, les molécules d'analyte seraient isolées les unes des autres et leur solvation par les molécules de matrice réalisée au sein même des cristaux. Les molécules de solvant retrouvées dans des cristaux [R.Krüger/2001] confirment l'existence du premier scénario, mais ces processus semblent minoritaires par rapport au phénomène de solution solide [G.G.Z.Zhang/1999 ; R.Krüger/2001 ; V.Horneffer/2003].

I.2 Mécanismes MALDI

Les mécanismes qui sous-tendent le processus MALDI constituent une source de questionnements importante depuis son apparition. En effet, si le MALDI est une technique qui s'est largement démocratisée au cours de ces vingt dernières années et est devenue incontournable pour l'analyse des biomolécules, il reste encore difficile d'avoir un contrôle fin sur le processus de désorption/ionisation, c'est-à-dire de contrôler précisément les caractéristiques spectrales. Ainsi, de nombreuses études fondamentales ont été menées depuis la fin des années 90 afin d'appréhender ce processus. Les différents travaux réalisés ont suivis des approches soit expérimentales, soit théoriques au travers de modélisations, l'essentiel des mécanismes qui seront présentés dans les parties suivantes sont à prendre en compte dans les conditions classiques du MALDI, c'est-à-dire lorsque les analyses sont réalisées sous vides et en présence d'un champ électrique au niveau de l'échantillon. Comme l'indique le nom MALDI, les deux processus principaux mis en jeu sont la désorption et l'ionisation, processus sur lesquels nous reviendrons plus en détail dans les paragraphes qui suivent.

I.2.a Processus de désorption

Lors de l'irradiation laser de l'échantillon, l'énergie absorbée par la matrice est convertie principalement sous forme de chaleur. Si l'énergie apportée est suffisante, ceci entraîne le passage d'une partie de l'échantillon progressivement de la phase solide à la phase gazeuse. Suivant la fluence laser, le processus d'éjection de matière est caractérisé par différents régimes. Trois régimes se distinguent : la désorption, l'ablation ou la spallation [L.V.Zhigilei/1997b,2003].

La désorption est un phénomène qui requiert peu d'énergie et qui libère en phase gazeuse des composés isolés neutres et ionisés à partir de la couche superficielle de l'échantillon, avec peu ou pas de particules, gouttes ou amas. Lorsque l'énergie d'irradiation est augmentée (à partir de quelques dizaines de J/m^2 , assez dépendant de la matrice utilisée), le régime d'ablation apparaît. Dans celui-ci, la libération de composés à partir des couches superficielles de l'échantillon perdure, mais s'accompagne d'un phénomène dit d'explosion

de phase. En effet, la chaleur générée dans l'échantillon va entraîner la formation de poches de gaz sous la surface et provoquer l'éjection de plusieurs couches superficielles. Cette éjection de matière plus violente fait apparaître des amas de composés, résidus de la structure solide de l'échantillon (agrégats), qui se dilueront progressivement sous vide pendant l'expansion de la plume (voir figure I.2).

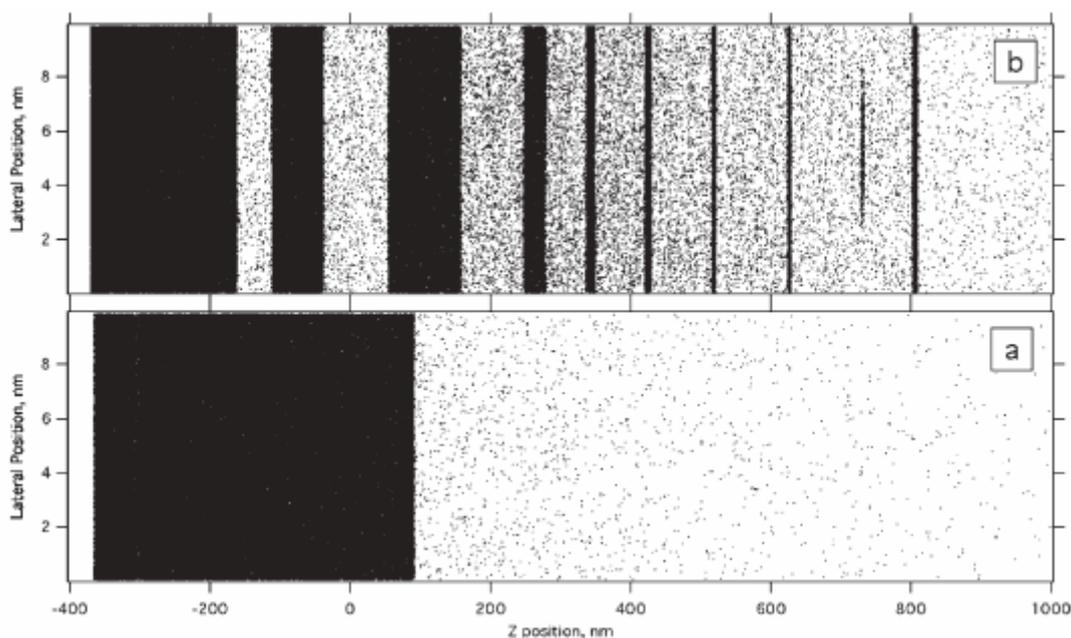


Figure I.2 : Simulation des évènements de désorption (a) et d'ablation (b)

[R.Knochenmuss/2005].

La spallation est un phénomène qui requiert un transfert d'énergie particulièrement rapide vers l'échantillon. Dans ces conditions, l'échantillon a tendance à libérer des blocs de matière plutôt que des composés isolés, ce qui rend inutile de rechercher à obtenir ce phénomène dans le cadre d'une analyse MALDI.

L'apparition de l'un de ces trois phénomènes est donc conditionnée par la fluence mais également par la durée et de l'impulsion laser. En effet, si la structure de l'échantillon n'est pas en mesure de permettre une relaxation suffisante du stress généré par les ondes de pression retour au sein de l'échantillon suite à l'impulsion laser, un phénomène de spallation sera observé. Cependant, des impulsions de l'ordre de la nanoseconde, bien que généralement très courtes par rapport aux durées de relaxation énergétiques de la matrice, suffisent à celle-ci pour stocker l'énergie apportée. Les états excités agissent comme des tampons et permettent la redistribution de cette énergie sur des échelles de temps compatibles

avec une relaxation intra- et intermoléculaire (jusqu'à quelques dizaines de nanosecondes). Le retour à l'équilibre conduit aussi à un phénomène d'éjection de matière qui peut durer pendant plusieurs microsecondes, habituellement appelé plume de désorption. Les observations expérimentales et les études fondamentales réalisées tendraient à montrer qu'en conditions MALDI conventionnelles, des particules isolées et des agrégats seraient observés simultanément. Cette description des mécanismes de désorption est largement étayée par les simulations moléculaires réalisées [L.V.Zhigilei/1997b,2003 ; R.Knochenmuss/2005,2010,2012] et fait l'objet d'un relatif consensus au sein de la communauté même si certaines observations expérimentales ne sont pas encore décrites par ces modèles. Ceci, tendrait plutôt à associer le MALDI à un régime d'ablation (ou tout du moins à un mélange de désorption et d'ablation) plutôt qu'à un régime de désorption pur (contrairement à ce que l'acronyme MALDI suggère). Bien que les fluences moyennes utilisées en conditions d'analyse soient typiquement situées dans une gamme de désorption, il faut remarquer que le profil d'énergie du faisceau laser n'est le plus souvent pas homogène et que certaines parties de l'échantillon reçoivent une fluence bien supérieure à la moyenne estimée, ce qui fait que cette mesure n'est pas forcément la plus adaptée à l'estimation de l'énergie laser reçue par l'échantillon. De plus, les dimensions très réduites des cristaux par rapport au spot laser vont entraîner l'apparition de micro-plumes à partir de chacun d'eux qui vont permettre, selon l'énergie reçue, des processus de désorption plus ou moins prononcés. Il existe ainsi en MALDI des effets de désorption localisés pouvant notamment expliquer la coexistence de différents régimes.

I.2.b Mécanismes d'ionisation

Si les différents travaux expérimentaux (imagerie de la dynamique de la plume, [D.B.Geohegan/1996 ; A.A.Puretzky/1998(a-b)-1999 ; A.Leisner/2005]) et les calculs théoriques ont permis au fil des ans d'acquérir une vision plus complète du processus de désorption, les mécanismes donnant naissance à la formation des ions en MALDI sont encore largement discutés et font l'objet de nombreux modèles étayés par différentes expériences et mesures de paramètres. Il est cependant établi que la production d'ion est un processus à deux étapes caractérisé par deux échelles de temps très différentes : l'ionisation primaire, correspondant à la formation ou à la libération d'ions pendant ou très rapidement après

l'impulsion laser (jusqu'à 20 ns après le déclenchement du laser), et l'ionisation secondaire correspondant à la production d'ions ultérieure par transfert de charges entre les espèces (neutres et ionisés) présentes dans la plume de désorption (jusqu'à quelques microsecondes après le déclenchement du laser). Dans la suite, nous nous proposons de passer en revue les modèles principaux d'ionisation primaire (I.2.b.α) et secondaire (I.2.b.β).

I.2.b.α Ionisation primaire

I.2.b.α.1 Le modèle des agrégats

Dans le modèle des agrégats ou « Lucky Survivor » proposé par l'équipe de M.Karas [M.Karas/2000], des ions préformés seraient entraînés en phase gazeuse lors de l'éjection d'agrégats créés par explosion de phase au sein desquels ils sont piégés. Ces agrégats se désolvant progressivement libèreraient ces ions. Ce modèle se rapproche des mécanismes mis en jeu en Ionisation par Electronébulisation (ESI) où des gouttelettes fortement chargées sont émises puis progressivement désolvatées pour donner naissance à l'observation des ions d'analytes libres. Dans ce modèle les ions sont supposés préformés, et les charges conservées lors de la cristallisation des dépôts, comme dans le cas des sels. Des expériences réalisées par utilisation d'indicateurs colorés sensibles au pH [R.Krüger/2001] dans des solutions de matrice tendent à confirmer cette hypothèse. Cependant, une solution ou un solide étant globalement neutre, chaque composé chargé est associé à un contre-ion de charge opposée ou solvaté. Les mécanismes de photoionisation induits par l'absorption des photons et la perte d'électrons de l'échantillon engendreraient la séparation du contre-ion et entraîneraient l'apparition de nombreuses espèces chargées positivement dans les premiers nanomètres de l'échantillon, une capture de ces électrons se produisant plus profondément dans la matrice pour former des espèces chargées négativement [S.A.Pshenichnyuk/2003(a-b) ; R.Knochenmuss/2004]. La libération de ces électrons est limitée dans la mesure où l'accumulation de charges positives à la surface de l'échantillon crée un champ électrique qui empêche les électrons les moins énergétiques de s'en échapper [R.Knochenmuss/2004].

La désolvatation des agrégats produits suite à l'irradiation laser se ferait suivant deux types de mécanismes, une désolvatation douce et une désolvatation dure [S.Alves/2006]. La désolvatation douce conduit à la libération de molécules neutres de matrice. La charge

globale n'étant pas modifiée, la/les charge(s) se concentre(nt) sur l'espèce restante. Ce type de processus peut donc faire apparaître des composés multi-chargés, la migration des charges étant réalisée par transfert de protons, de cations ou d'électrons. La désolvatation dure conduit à la libération de matrice chargée, ce qui contribue donc à obtenir une espèce finale "nue" avec peu de charges. Cette hypothèse fait largement référence aux deux mécanismes admis pour décrire la formation des ions en ESI. En effet, dans le modèle de Dole également appelé modèle de la charge résiduelle [M.Dole/1968] les gouttelettes se désolvent progressivement de molécules de solvant jusqu'à l'obtention de l'ion d'analyte libre. Dans le second modèle de J.V.Iribarne et B.A.Thomson connu sous le nom de modèle d'évaporation des ions [J.V.Iribarne/1976] les ions d'analytes sont éjectés de la surface des gouttelettes multichargées. Le premier de ces modèles semble mieux décrire le comportement des composés de hautes masses lors de l'analyse ESI alors que le second modèle s'applique plutôt aux composés de faible poids moléculaire.

Si l'existence d'agrégats en plus des ions libres est largement étayée de faits expérimentaux et théoriques [M.Karas/2000 ; A.N.Krutchinsky/2002], ceci ne permet cependant pas d'expliquer la formation d'ions pour des basses fluences où seuls des ions libres sont attendus. Ainsi, il faut faire appel à d'autres modèles d'ionisation pour expliquer la formation de tous les ions en MALDI.

I.2.b.a.2 Le modèle de photoexcitation et de mise en commun ("energy pooling")

I.2.b.a.2.a Photoexcitation

La voie d'ionisation la plus intuitive en UV MALDI est la photoionisation directe de la matrice. Cependant, le rendement d'ionisation lié à ce mécanisme est faible au vu des potentiels d'ionisation des molécules de matrice isolées et de l'énergie apportée par chaque photon. Par exemple, dans le cas du 2,5-DHB, dont le potentiel d'ionisation est de 8,054 eV [V.Karbach/1998], sachant qu'un laser azote ou Nd:YAG apportent respectivement 3,7 et 3,5 eV par photon, 3 photons sont nécessaires pour induire une photoionisation de la matrice. Le même constat est fait pour d'autres matrices couramment utilisées (acide sinapinique : 8,67 eV ; Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique : 8,5 eV ;... [A.J.Hoteling/2006 ; S.Bourcier/2001-2002 ; F.H.Yassin/2003-2005]). Cependant, le caractère condensé de l'échantillon augmente les interactions entre molécules ce qui peut conduire à une réduction

de leur potentiel d'ionisation par rapport à des molécules isolées, rendant possible une ionisation à deux photons [Q.Lin/2001]. Des études [G.R.Kinsel/2002] montrent que cet effet reste néanmoins peu efficace pour un échantillon de matrice pure. Dans le cas des interactions entre la matrice et l'analyte, ces effets de réduction du potentiel d'ionisation peuvent être plus efficaces, les interactions entre ces deux composés pouvant être plus fortes qu'entre des molécules de matrice. Des études théoriques et expérimentales menées par G.R.Kinsel et al. ont pu mettre en évidence un tel effet [G.R.Kinsel/2002-2004 ; C.M.Land/1998-2001 ; F.H.Yassin/2006] sur les complexes DHB-proline dont le potentiel d'ionisation passe de 8,05 eV pour la matrice seule à environ 7 eV pour le complexe [G.R.Kinsel/2002], la fragmentation de certains complexes produisant alors des analytes protonés [C.M.Land/1998-2001]. Cependant, ce processus d'ionisation à deux photons n'est probablement pas transposable à tous les complexes analyte/matrice.

I.2.b.a.2.b Mise en commun ("energy pooling")

La photoexcitation de l'échantillon, même si elle n'est pas suffisante pour provoquer une ionisation efficace des espèces présentes dans l'échantillon, peut permettre d'initier des mécanismes de transfert d'énergie entre ces espèces. Ce phénomène dit de pooling [V.Karbach/1998 ; P.Setz/2005 ; R.Knochenmuss/2002] se traduit par le transfert ou la mise en commun de quantum d'énergie (appelé "exciton") entre composés en interaction dont l'un au moins est dans un état excité (voir figure I.3). Ceci permet d'accumuler assez d'énergie pour que certains composés puissent atteindre le seuil d'ionisation. Par exemple, si on prend un système de deux composés en contact ayant atteint le premier état d'excitation (système $S_1:S_1$), l'un de ces deux composés peut revenir à son état fondamental en transférant son énergie à son voisin qui atteindra donc un état d'excitation supérieur (système $S_0:S_n$). Ces excitons peuvent donc se déplacer dans l'échantillon du fait de son caractère solide [D.L.Dexter/1965]. Dans le DHB, le transfert de ce quantum d'énergie se fait en 50 ps, ce qui est minime par rapport à la durée de vie de l'état excité (0,5 à 1,5 ns) [D.L.Dexter/1965 ; H.C.Lüdemann/2002]. Ceci permet donc une diffusion relativement étendue dans l'échantillon et augmente donc les chances que les excitons se concentrent sur certaines molécules et augmentent le taux d'espèces ionisées au cours du temps (voir figure I.4).

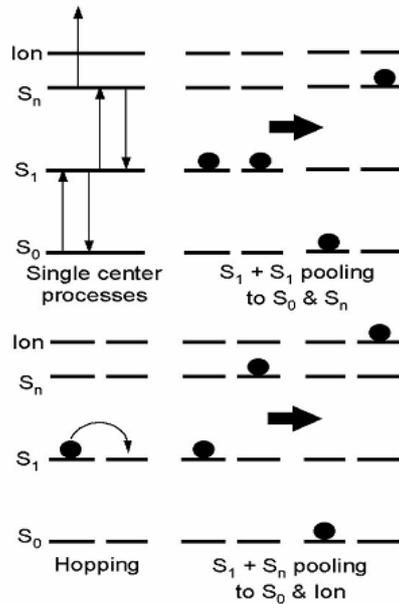


Figure I.3 : Mise en évidence du phénomène de pooling [R.Knochenmuss/2006a].

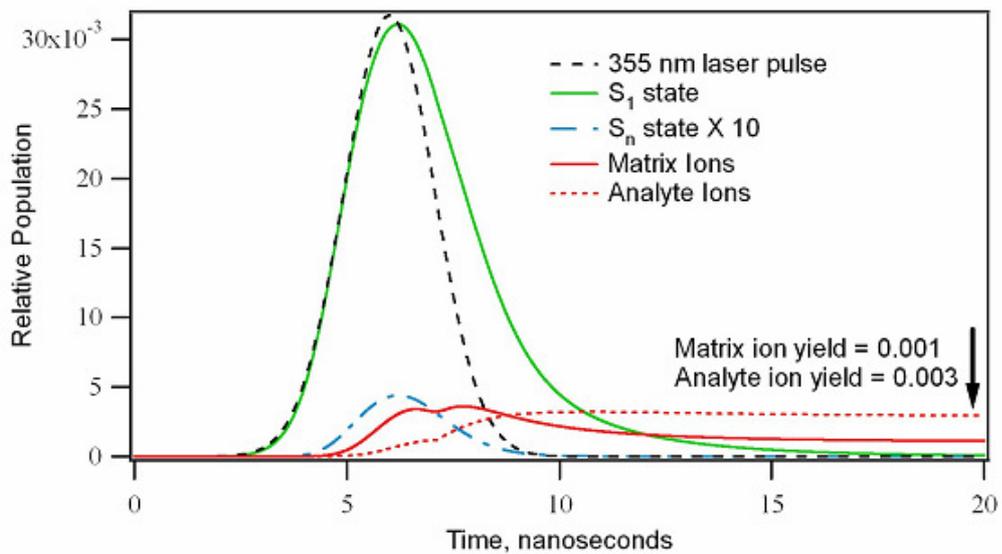


Figure I.4 : Mise en évidence du phénomène de pooling et évolution de la population relative des différents états excités apparus lors de l'irradiation laser au cours du temps [R.Knochenmuss/2006a].

Ce phénomène sera observé tant que l'échantillon sera assez dense pour permettre la transmission d'excitons entre les différents composés, ce qui le rend donc très dépendant de l'expansion de la plume. Cette dépendance permet d'expliquer la chute assez précoce de la population d'état excité S_n par rapport aux états excités S_1 qui perdurent plus longtemps.

I.2.b.α.3 Le modèle du fluide polaire

Le modèle du fluide polaire [X.Chen/1998 ; S.Niu/1998] se concentre sur la phase de vaporisation de la matrice déclenchée par l'augmentation de température de l'échantillon qui fait suite à l'irradiation laser. Durant la phase de vaporisation, l'échantillon passerait par un état où le volume de matière désorbé se comporte comme une solution dont le solvant serait la matrice (analogue à un fluide en phase supercritique). Le caractère polaire de la plupart des composés utilisés en tant que matrice fournirait à cette solution la propriété de dissocier les composés ioniques tels que les sels. Les hydrogènes labiles présents sur les molécules de matrice fournissent un excellent agent de solvation et une source pour une mobilité libre de protons dans le fluide jusqu'à l'analyte. Ce modèle permet d'expliquer les similarités observées entre des spectres obtenus en IR- et UV-MALDI. Cependant le principal contre-argument de ce modèle est que le caractère polaire de composés similaires aux matrices MALDI diminue lorsqu'ils sont portés à haute température, comme c'est le cas suite à l'irradiation laser, ce qui pourrait limiter fortement leurs capacités à dissocier les composés ioniques. Néanmoins, même si ce modèle ne constitue pas un des mécanismes principaux de l'ionisation des composés en MALDI, il ne peut être totalement exclu.

I.2.b.α.4 Transfert de proton à l'état excité

Comme précédemment décrit, le seuil d'ionisation de l'essentiel des composés de l'échantillon n'est probablement pas atteint par la simple absorption de photons. Cependant, l'absorption d'au moins un photon peut mener certains de ces composés jusqu'à un niveau d'énergie qui influe sur leur pKa et favorise le transfert de protons vers des composés accepteurs. Certaines matrices comme le DHB ont une structure similaire à celle de composés dans lesquels cet effet est connu, tel que l'acide salicylique, où le niveau électronique recherché peut être atteint par l'absorption d'un photon UV. Cette hypothèse a conduit à réaliser des études pour examiner la contribution de ce phénomène aux mécanismes MALDI [J.Krause/1996 ; J.Barthel/1994 ; M.Karas/1987 ; M.E.Gimon/1992 ; B.Spengler/1992 ; M.P.Chiarelli/1993 ; H.Yong/1998 ; H.C.Lüdemann/2000]. Cependant, les travaux montrent que ce transfert n'aurait pas une contribution prépondérante dans le cas des matrices les plus courantes, car nécessitant une certaine stabilisation de la « charge » créée à travers l'environnement, possible dans l'eau ou dans un environnement amine, conditions

non atteintes a priori dans la plume. Il faut cependant prendre ces résultats avec précaution, seule la matrice 2,5-DHB ayant été largement étudiée. [V.Karbach/1998]. L'addition de composés plus favorables à ce phénomène dans l'échantillon ne s'est pas montrée plus concluante [H.Ehring/1992]. L'ensemble de ces travaux tend à démontrer que ce phénomène, s'il existe en MALDI, serait probablement minoritaire et ne se produirait que pour des couples analyte/matrice bien spécifiques.

I.2.b.α.5 Assistance pneumatique / modèle de la bulle en expansion

À l'instar du modèle des agrégats, le modèle de la bulle en expansion [M.A.Baldwin/2002 ; V.L.Talroze/2000-2001(a-b)-2003-2004] repose d'une part sur la préformation des ions et d'autre part sur la température atteinte par l'échantillon grâce à l'apport d'énergie. En effet, l'augmentation de la température de l'échantillon va permettre la vaporisation de certains composés ou la libération de certaines espèces (CO₂ dans le cas de matrice dotées d'une fonction acide carboxylique) de façon d'autant plus importante que l'énergie du laser est élevée [V.L.Talroze/2001a]). La formation de ces volumes de composés gazeux sous la surface permet l'apparition de "bulles" qui éclatent en libérant des gouttes ou des fragments de matières qui nécessitent une désolvatation pour fournir les ions "nus" recherchés. Les simulations réalisées pour ce modèle [V.L.Talroze/2001a-2003-2004] ont montrées que, selon les paramètres pris en compte, la pression à l'intérieur des bulles pourrait atteindre 10 à 100 atmosphères, ce qui entraînerait des processus plus proches de l'ablation que de la désorption. La quantité de composés gazeux produits serait en grande partie dépendante de la quantité d'énergie apportée par le laser sur la durée. S'il est difficile de conclure quant à la validité de ce modèle, certaines expériences pourraient l'étayer. Par exemple, la diminution progressive du signal d'analyte par irradiation de monocristaux de la matrice dopés par des analytes de type protéine, serait liée à une modification progressive de la morphologie de la surface avec une apparition de structures très particulières et une modification chimique des molécules de matrice [I.Fournier/2002b-2003]. Cependant, la sensibilité en MALDI n'est globalement pas dépendante de la durée du pulse laser [P.Demirev/1992 ; K.Dreisewerd/1996 ; M.R.Chevrier/1991 ; M.R.Papantonakis/2002 ; A.Meffert/2001], ce qui suggèrerait que ce phénomène n'est pas décisif pour la formation des ions en MALDI.

I.2.b.β Ionisation secondaire

Les processus d'ionisation secondaire désignent les mécanismes de production d'ions qui se déroulent à l'intérieur de la plume de désorption entre les composés neutres et ioniques produits ou libérés lors de l'irradiation laser. Seuls les ions primaires, quel que soit le mécanisme par lequel ils sont formés, contribuent aux mécanismes d'ionisation secondaires. Ces mécanismes sont généralement associés à des transferts de charges entre espèces lors de leur collision. Ils diminuent donc au fur et à mesure de l'expansion de la plume.

I.2.b.β.1 Transfert de protons

Le transfert de protons entre des acides aminés et la matrice est le facteur principal contribuant à la fixation de charges sur les peptides contenant des fonctions basiques. Sur des polypeptides, du fait de leur plus grande basicité, la charge est mieux stabilisée (stabilisation sur plusieurs sites basiques) [A.G.Harrison/1997 ; S.R.Carr/1996-1997 ; Z.Olume/1998]. En phase gazeuse, l'efficacité du transfert de proton peut se mesurer au travers de la basicité en phase gazeuse des analytes [S.Baumgart/2004 ; H.Wenschuh/1998 ; T.Nishikaze/2006 ; W.I.Burkitt/2003 ; M.L.Valero/1999]. Dans le cas d'espèces faiblement basiques, tels que les oligonucléotides, il faudra alors tenir compte de la basicité en phase gazeuse des espèces [C.W.Chou/1999]. Cependant, quel que soit l'analyte, si l'AP de la matrice est inférieure à celle de l'analyte alors la réaction de transfert est exothermique et sera favorable.

I.2.b.β.2 Transfert de cations

Du fait des affinités des composés couramment analysés en MALDI, la forme protonée est généralement prépondérante. Cependant, les composés peuvent également présenter une affinité pour les métaux alcalins ou de transition. Les alcalins (en particulier Na^+ et K^+) sont souvent présents à l'état de trace sur les supports ou en quantité abondante dans les solutions (échantillons biologiques). Ainsi, il est courant de retrouver des ions cationisés au sodium ou au potassium dans les spectres, si les échantillons n'ont pas été préalablement dessalés. Dans certains cas, les alcalins (Na^+ , K^+ , Li^+) ou les métaux de transition (Cu^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+}) peuvent être volontairement ajoutés aux solutions. Ces préparations sont habituellement réalisées pour permettre une pré-ionisation de composés qui ne présentent pas d'hétéroatomes et pour

lesquels l'affinité protonique est faible. Par exemple, l'ajout de sels d'argent permet de stabiliser des polymères synthétiques de type polystyrènes, comme la cationisation au lithium pour certaines familles de lipides. Elles peuvent aussi permettre d'étudier l'affinité relative de certains composés vis-à-vis de certains métaux (l'affinité de protéines pour différents métaux de transition par exemple).

Bien qu'il ne soit pas rare d'observer des adduits (sodium et potassium dans de nombreux cas) dans les spectres MALDI à cause des impuretés présentes dans les solutions mères de matrice et d'analyte, certaines matrices [P.C.Liao/1995 ; J.Zhang/2004], comme le dithranol, peuvent favoriser ce processus de cationisation. Il faut remarquer que si les processus de cationisation peuvent se produire en solution avant l'analyse, plusieurs études ont également montrées l'existence d'un processus de cationisation en phase gaz [A.M.Hoberg/1997 ; P.C.Burgers/1998 ; H.Rashidezadeh/1998 ; B.H.Wang/1993 ; W.J.Erb/2006].

Il est tout de même assez difficile de contrôler la cationisation des composés, et en particulier des analytes, lors d'une analyse MALDI. En effet, les échantillons de matrice et d'analyte commerciaux sont toujours contaminés par des sels, et seule une prépurification de la matrice permet de rendre ces signaux pratiquement inexistantes. L'ajout de quantités connues de cations présente plusieurs inconvénients, au niveau de la cristallisation et de la compétition lors des processus d'ionisation. L'ajout d'un excès de sels lors de la préparation des solutions d'analyse peut entraîner une perturbation lors de la co-cristallisation du dépôt, les cristaux peuvent ainsi refléter la cristallisation du sel et non plus celle de la matrice en plus de saturer les spectres au-delà d'une certaine quantité [A.J.Hoteling/2005 ; S.D.Hanton/2004]. Il est clair que pour des concentrations trop élevées en sels, qui conduisent à une cristallisation suivant le réseau cristallin du sel et non plus celui de la matrice, il n'est plus possible d'observer le processus MALDI et d'observer des signaux. De manière générale, l'augmentation de la concentration en sels détériore la qualité spectrale et augmente le bruit de fond. Ainsi, si le MALDI est tolérant aux sels, il peut être clairement bénéfique pour la qualité spectrale de dessaler les échantillons avant analyse.

Il est également difficile de contrôler précisément les sites de cationisation. L'ajout d'une quantité de sel équivalente à celle de l'analyte ne suffit pas, une compétition avec la matrice étant inévitable [A.J.Hoteling/2005], à plus forte raison si l'on considère la forme déprotonée de la matrice qui aura une affinité cationique forcément plus grande que les analytes neutres [P.Lecchi/2005].

I.2.b.β.3 Transfert électronique

Parmi les composés réactifs qui peuvent jouer un rôle dans les processus d'ionisation secondaires, on trouve également des espèces radicalaires (radicaux cations ou anions) [P.Juhasz/1993 ; T.Donovan/1998 ; S.F.Macha/1999 ; A.V.Streletskii/2005 ; R.Lidgard/1995 ; L.Ulmer/2000] qui peuvent être formées à partir des analytes ou de la matrice. Ces composés sont assez problématiques dans le cadre des processus MALDI car ils peuvent entraîner la neutralisation de composés ionisés qui ne sont donc plus à même de contribuer à l'analyse.

Ces transferts électroniques peuvent être mis en évidence dans des études avec des cations métalliques divalents comme Ca^{2+} et Cu^{2+} . En effet, les études montrent que ces espèces sont réduites au degré d'oxydation 1 dans les spectres. [E.Lehmann/1997 ; M.J.Deery/1997 ; R.Knochenmuss/1998a ; T.Yalcin/1997 ; J.Zhang/2003]. Dans le cas de radicaux moléculaires, des protons peuvent être libérés pour compenser la charge du radical [R.W.Nelson/1992 ; A.S.Woods/1995].

I.2.b.β.4 Effets de suppression des ions

Les collisions dans la plume peuvent également donner lieu à des phénomènes de suppression d'ions qui se traduisent par l'absence de signaux que l'on s'attendrait normalement à observer sur les spectres. Suivant les conditions d'analyse il est possible d'observer des effets de suppression des ions de matrice ou d'analyte [T.W.Dominic Chan/1991-1992 ; V.Bökelmann/1995]. Cet effet est étroitement lié au rapport en nombre des molécules de matrice et d'analyte.

I.2.b.β.4.a Effet de suppression de matrice

L'effet de suppression des ions de matrice est observé pour des ratios analyte/matrice croissants et particuliers. Au-delà d'un ratio important d'analyte, tous les signaux de matrice (protonés, cationisés, dichargés,...) disparaissent [R.Knochenmuss/1996-1998b-2000] et le spectre ne fait plus apparaître que le signal des ions d'analyte [G.McCombie/2004]. Cette observation renforce le rôle d'un mécanisme d'ionisation secondaire où des analytes fortement basiques et en proportion suffisante vont pouvoir réduire la quantité d'ions

protonés primaires de la matrice. La suppression des ions des autres types pouvant s'expliquer par des processus de reconversion internes.

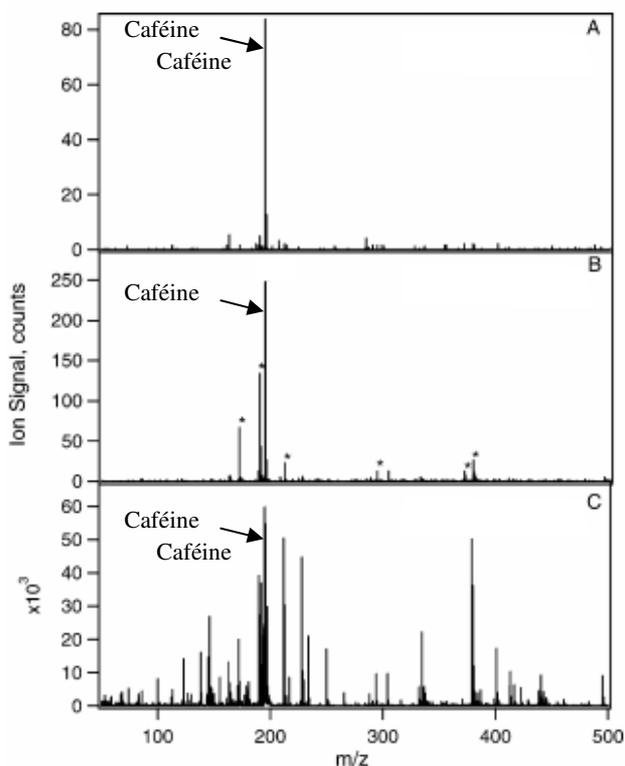
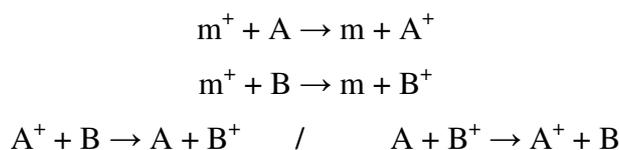


Figure 1.5 : Spectres MALDI-ToF d'échantillons contenant de la caféine réalisés avec une matrice HCCA pour différentes proportions de matrice et d'analyte (A, $M/A=3$; B, $M/A=27$; C, $M/A=3$ (avec une intensité laser plus élevée)) [G.McCombie/2004].

I.2.b.β.4.b Effet de suppression d'analyte

Ces effets de suppressions sont également observés pour des analytes en mélange, certains analytes pouvant supprimer le signal des autres. Dans ce schéma d'ionisation secondaire, suivant la matrice et les mélanges d'analyte utilisés, certaines réactions de transfert de charge sont favorisées au détriment des autres en fonction de l'exothermicité de la réaction. Les compétitions peuvent avoir lieu avec la matrice ou entre analytes, par exemple :



Comme pour l'effet de suppression des signaux de matrice, l'apparition de ce phénomène pour les analytes est liée aux proportions des différents composés présents dans l'échantillon et à la quantité d'ions primaires produits [R.Knochenmuss/2000]:

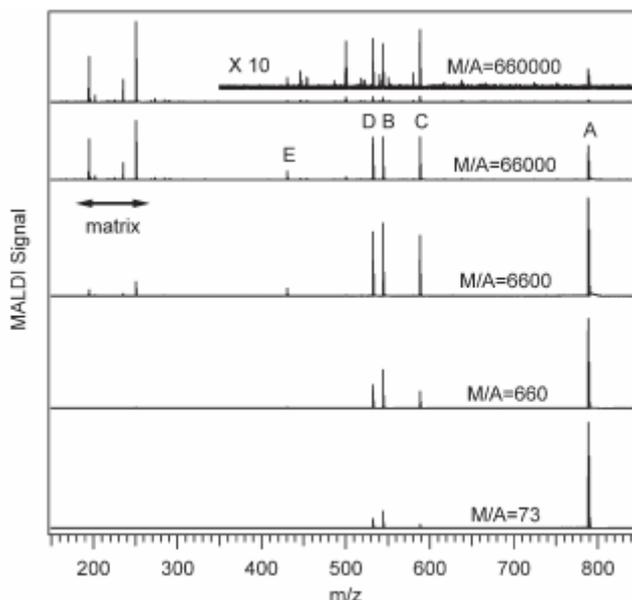


Figure 1.6 : Mise en évidence du phénomène de suppression du signal d'analyte sur un mélange de plusieurs analytes (A, B, C, D et E) avec la matrice DCTB, les rapports molaires entre matrice et analytes sont indiqués sur les spectres (M/A) [A.J.Hoteling/2006].

Ceci demeure un problème majeur en MALDI pour l'analyse de mélanges complexes avec une importante gamme dynamique, certains analytes n'étant jamais observés. Cependant, la compréhension de ces phénomènes pourrait être particulièrement intéressante pour favoriser la fixation de charge sur une espèce particulière.

1.2.b.β.4.c Analytes multi-chargés

Contrairement à d'autres sources de spectrométrie de masse comme l'ESI, les ions multichargés sont peu prépondérants en MALDI.

L'apparition de multiples charges sur un même composé lui confère une plus grande énergie interne, ce qui le rend d'autant plus favorable à un transfert de charge vers un autre composé lors d'une collision. Symétriquement, le transfert de charge vers un ion multi-chargé est de plus en plus défavorable à mesure que le nombre de charges qu'il porte est

important, ce qui induit une diminution de sa basicité en phase gazeuse. La probabilité qu'un composé devienne multi-chargé dépendra aussi de sa taille [S.R.Carr/1997 ; R.Knochenmuss/2000 ; X.Zhang/1996 ; G.A.Pallante/2002], et de sa capacité à conserver sa structure intacte car des charges de même nature peuvent entraîner une fragmentation par répulsion coulombienne, particulièrement dans le cas des agrégats [S.Alves/2006]. Dans un modèle d'ionisation secondaire par transfert de charges, les espèces multichargées sont donc clairement défavorisées du point de vue thermodynamique et cinétique. Dans son modèle d'agrégats [M.Karas/2000], M.Karas émet l'hypothèse que les ions sont initialement fortement multichargés dans les agrégats mais perdent progressivement leur charge par reneutralisation, notamment par capture des électrons libres émis au cours du processus de désorption/ionisation. Cette hypothèse est étayée par les résultats obtenus ces dernières années par S.Trimpin et al. qui démontrent la possibilité de générer des espèces multichargées, avec des distributions relativement proches de celles observées en ESI, pour des protéines, dans une source AP MALDI en activant la désolvatation des espèces dans un capillaire de transfert chauffé [C.N.McEwen/2010]. Cette technique permet également d'amplifier la production des ions multi-chargés à partir de coupe de tissu [E.D.Inutan/2011] grâce à l'utilisation de matrices particulières [S.Trimpin/2011]. Ceci confère à cette source de grande possibilité de développements et d'applications, car elle permettrait d'observer des composés de très haut poids moléculaire pour des rapports m/z bien moins élevés que s'ils étaient monochargés. En effet, l'irradiation d'un échantillon dans une source de type AP-MALDI permet, grâce aux interactions entre les composés désorbés et le gaz ambiant présent dans la source, une réduction de l'énergie interne des composés désorbés et donc leur stabilisation en phase gazeuse. Très récemment, R.Cramer et al. [R.Cramer/2013] ont montré la possibilité d'obtenir des ions multichargés à partir de peptides de faible masse en UV MALDI dans une source AP MALDI et une transmission des ions via un capillaire de transfert chauffé et par utilisation de matrices liquides. Dans ces dernières expériences, les analytes sont détectés pour la première fois sous forme multichargée avec une bonne sensibilité. Les résultats démontrent une grande dépendance du nombre de charges avec la composition de la matrice liquide. Si ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives d'analyse, peu d'hypothèses sont avancées pour expliquer ces résultats.

I.3 Paramètres d'analyse

Si les différentes études fondamentales, expérimentales et théoriques permettent d'affiner progressivement la compréhension des mécanismes de désorption/ionisation, il n'est pas toujours aisé de relier ces travaux à l'analyse au quotidien et aux paramètres accessibles à l'utilisateur pour influencer les caractéristiques spectrales. Si certains paramètres expérimentaux tels que la matrice, son mode de dépôt, l'énergie laser, ont été largement étudiés d'autres paramètres restent encore mal contrôlés et conduisent à des effets particuliers.

I.3.1 Effets de surface

Le support (ou porte échantillon) utilisé pour réaliser les dépôts peut avoir une influence soit directe, soit indirecte (via la cristallisation) sur le processus de désorption/ionisation MALDI. Par exemple, certaines cibles présentent un revêtement hydrophobe qui permet une concentration de l'échantillon. Ces cibles sont très utiles pour les applications biologiques où les quantités de matériel récoltées sont parfois très faibles. Ainsi, les supports habituellement en acier inoxydable sont remplacés par des supports en silicium, revêtus d'une couche d'or, ou encore de lames de verre recouvertes d'un film conducteur transparent pour des applications particulières telles que l'imagerie MALDI MS. Si la nature des supports est assez variée, peu d'études se sont intéressées aux effets liés au support.

Des études ont par exemple montrées [G.McCombie/2006 ; R.Knochenmuss/2006b] que des variations d'intensité dans les signaux de matrice et d'analyte étaient observées par comparaison d'analyse sur des supports acier et or. (voir figure I.7). Les expériences montrent une variation d'intensité avec la nature du support et l'épaisseur du dépôt cristallin, les épaisseurs les plus faibles donnant des signaux plus intenses. En particulier, les régions d'interface avec le support, en bord de dépôt, de faible épaisseur conduisent à des signaux d'intensité plus élevée.

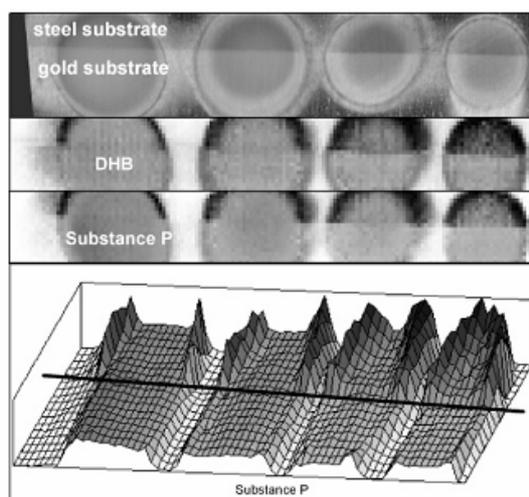


Figure I.7 : Comparaison des signaux de matrice et d'analyte obtenus à partir de dépôts réalisés par électrospray pour différentes épaisseurs (du plus fin à droite au plus épais à gauche (200 à 3000 nm)) sur des substrats en acier et en or [R.Knochenmuss/2006b].

Cet effet d'exaltation des signaux observé sur l'acier semble connecté aux relations que peuvent entretenir les niveaux d'énergie de la matrice et du substrat. Ainsi, pour l'acier (contrairement à l'or) le niveau de Fermi va permettre la conduction d'électrons vers un niveau excité de la matrice et ainsi réduire la quantité de photons nécessaire à l'ionisation (voir figure I.8). Bien évidemment, afin de considérer le rapport entre ces différents niveaux d'énergie et donc l'apparition de ce phénomène, il faut prendre en compte le fait que chaque matrice présente des propriétés différentes entraînant *de facto* une variation des niveaux d'énergie. Ce phénomène sera décrit plus amplement dans la partie IV.2.b.β.2.

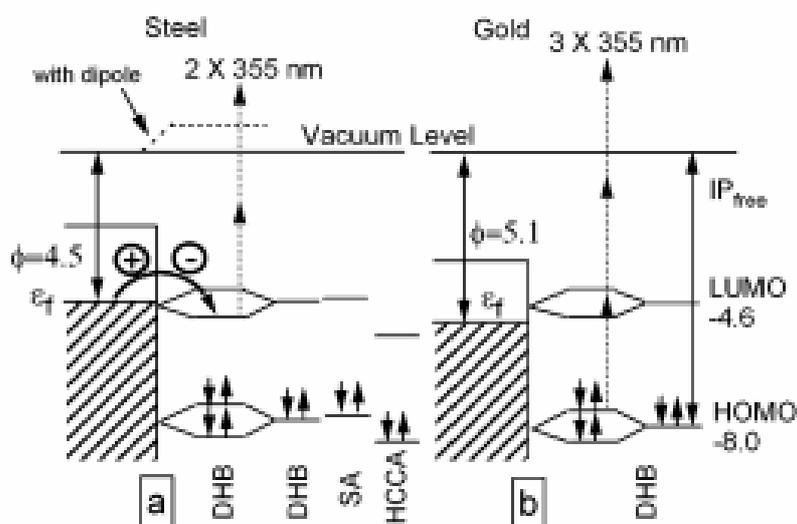


Figure I.8 : Comparaison des niveaux d'énergie HOMO et LUMO de différentes matrices avec le niveau de Fermi de l'or et de l'acier [R.Knochenmuss/2006b].

I.3.2 Effets du laser

Comme précédemment mentionné, les paramètres laser jouent un rôle prédominant dans le processus de désorption/ionisation. Ces paramètres laser revêtent un rôle particulièrement important dans la mesure où ils peuvent être le plus souvent modifiés par l'utilisateur.

I.3.2.a Fluence et irradiance

Dans des conditions classiques d'utilisation, une analyse MALDI est dépendante de la fluence (quantité d'énergie par unité de surface), mais pas de l'irradiance (puissance par unité de surface) [P.Demirev/1992 ; M.R.Papantonakis/2002 ; K.Riahi/1994 ; R.C.Beavis/1992b]. Cette fluence met en évidence un seuil de désorption et un seuil d'ionisation dépendant principalement de la matrice (et dans une certaine mesure de la morphologie de l'échantillon, par exemple tissus ou monocristaux par rapport à des préparations conventionnelles) et de l'ordre de quelques dizaines de J/m² [K.Dreisewerd/1996].

I.3.2.β Taille du spot et résolution spatiale

L'aire irradiée par le faisceau incident est un paramètre important pour l'analyse de surfaces et des applications dans l'imagerie MALDI MS. En effet, la résolution des images est conditionnée par le nombre et la taille des pixels enregistrés en mode microsonde. Certaines études ont ainsi montré l'existence d'effets particuliers pour des dimensions de spots laser réduites (mais à fluence égale), en particulier une diminution drastique de l'intensité des signaux observés sur les spectres en-dessous de 30-50 µm de diamètre voire une disparition du signal vers 10 µm [R.Knochenmuss/2002 ; K.Dreisewerd/1995]. Cette perte de sensibilité importante à haute résolution spatiale constitue une limitation majeure pour des applications de type imagerie MALDI MS. Différents systèmes ont été développés afin d'accéder à ces hautes résolutions spatiales (\leq µm) par focalisation du faisceau laser [B.Spengler/2002]. Cependant ces systèmes restent clairement inadaptés à l'analyse des macromolécules. D'autres méthodes permettent de compenser artificiellement cet effet

délétère tel que la technique dite « d'over sampling » présentée par J.C.Jurchen et al. [J.C.Jurchen/2005] pour l'analyse directe de tissus. Dans ce mode, le faisceau est conservé à une focalisation moyenne, cependant, chaque point de l'échantillon est soumis à irradiation jusqu'à ablation totale de l'échantillon. Les points d'analyse sont volontairement très rapprochés et le pas de déplacement inférieur au diamètre de la zone irradiée. L'ablation totale de chaque point conduit à réduire la zone analysée en ne conservant pour chaque analyse que la zone qui ne se recouvre pas entre les points d'analyse. Cette méthode permet de descendre aisément à des résolutions spatiales d'environ 30 μm sans modifications particulières et est couramment employée dans les laboratoires pour l'imagerie MS lorsque l'équipement ne permet pas de modification de la focalisation du faisceau. Elle présente également l'avantage de se dégager des problèmes de pertes de rendements de production d'ions qui pourraient être observés. Alternativement, ces difficultés peuvent être contournées en travaillant en mode microscope stigmatique [T.H.Mize/2004] plutôt que microsonde. En mode microscope, le laser est défocalisé (irradiant ainsi une partie large de l'échantillon) et les ions émis sont guidés jusqu'au détecteur en conservant leur localisation initiale en 2 dimensions. Le détecteur reproduit la localisation des ions qu'il reçoit. L'utilisation de cette méthode permet de réaliser des images de cellules isolées avec une résolution de l'ordre du micromètre [A.F.Maarten Altelaar/2007], cependant lors d'une acquisition un seul rapport m/z déterminé est analysé. En outre, ce système de microscope stigmatique n'est pas commercialisé et son développement est extrêmement long et coûteux.

I.3.2.γ Profil du faisceau laser

Les études fondamentales et les observations lors des analyses ont démontré l'existence d'un effet net du profil d'énergie du faisceau laser sur le processus de désorption/ionisation. Ces effets sont clairement mis en évidence lors de l'étude des zones d'irradiation sur des monocristaux de matrice (Acide sinapinique et 2,5-DHB) par microscopie électronique à balayage dans différentes conditions d'irradiation (énergie laser, nombre de tirs) avec un laser N_2 dont le profil est hétérogène (profil non gaussien avec présence de plusieurs pointes d'énergie) [I.Fournier/2002b-2003] (voir figure I.9).

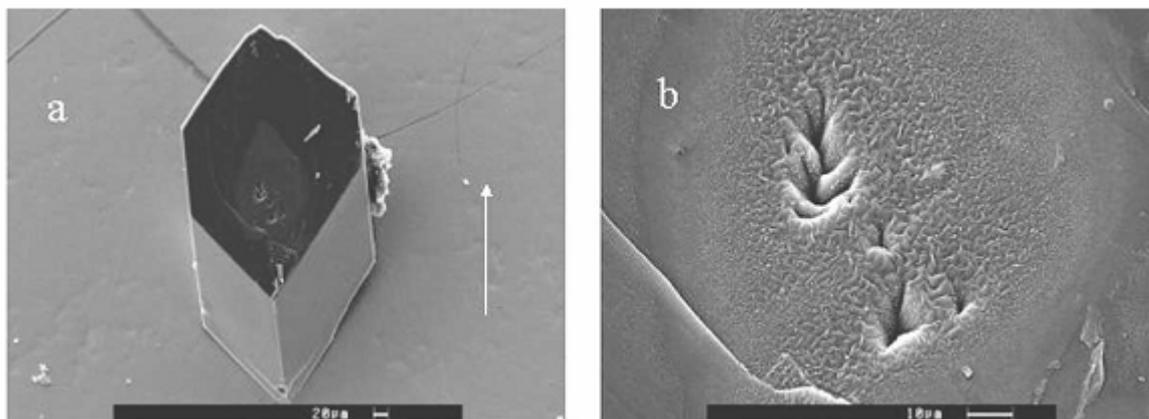


Figure I.9 : Photographie au microscope électronique à balayage d'un monocristal d'acide sinapinique (a) et d'un agrandissement d'une zone irradiée par un laser azote à l'intérieur d'une source MALDI [I.Fournier/2002b].

Ces expériences conduisent à l'apparition de zones de morphologie variable (cratères, zones présentant une morphologie particulière sans cratère) soulignant l'existence d'effets de désorption locaux. Plus récemment, des études menées par A.Holle et al. lors du développement de spectromètres MALDI-TOF/TOF tendent à confirmer ces observations [A.Holle/2006]. Ces instruments étant utilisés dans des applications «haut-débit» (LC-MALDI pour la protéomique ou imagerie), les lasers N_2 (de fréquence de répétition limitée et de durée de vie plus courte) ont été remplacés par des lasers de type Nd :YAG. Les spectres obtenus avec ce laser sont cependant caractérisés par une diminution de l'intensité des signaux liée à son profil naturellement homogène et gaussien. En structurant le profil du faisceau en plusieurs pointes d'énergie réparties de façon homogène (voir figure I.10), l'intensité des signaux augmente de nouveau. Ainsi, en créant un profil volontairement structuré (et non naturellement déstructuré comme pour le laser N_2) il est possible d'obtenir une intensité des signaux supérieure aux analyses avec le laser N_2 et pour des énergies d'irradiation moins grandes (voir figure I.11). Ainsi les effets locaux d'absorption d'énergie influencent directement le rendement de production d'ions.

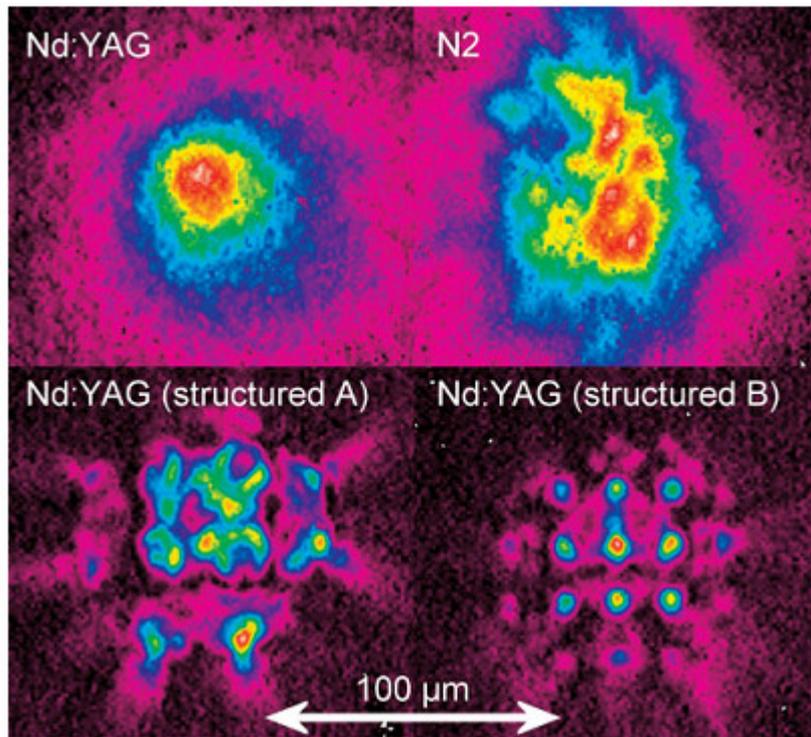


Figure I.10 : Profil des lasers utilisés dans les expériences de A.Holle et al. [A.Holle/2006].

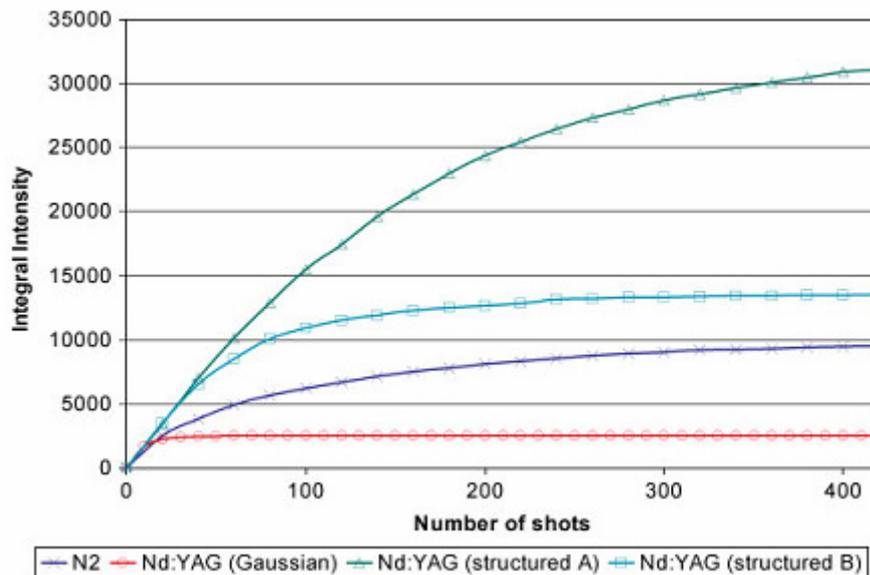


Figure I.11 : Évolution de l'intensité des signaux d'analyte en fonction du nombre de tirs laser pour différents profils du faisceau laser [A.Holle/2006].

I.3.3 Métallisation des échantillons

L'effet d'une métallisation des dépôts a été étudié sur dépôt conventionnel [G.McCombie/2006] et sur coupe de tissu [A.F.Maarten Altelaar/2006]. Des études réalisées avec dépôt d'une fine couche d'or (de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres) à la surface des échantillons montrent une augmentation des signaux d'analyte. Ces effets positifs sont observés à la fois sur les préparations conventionnelles et les tissus.

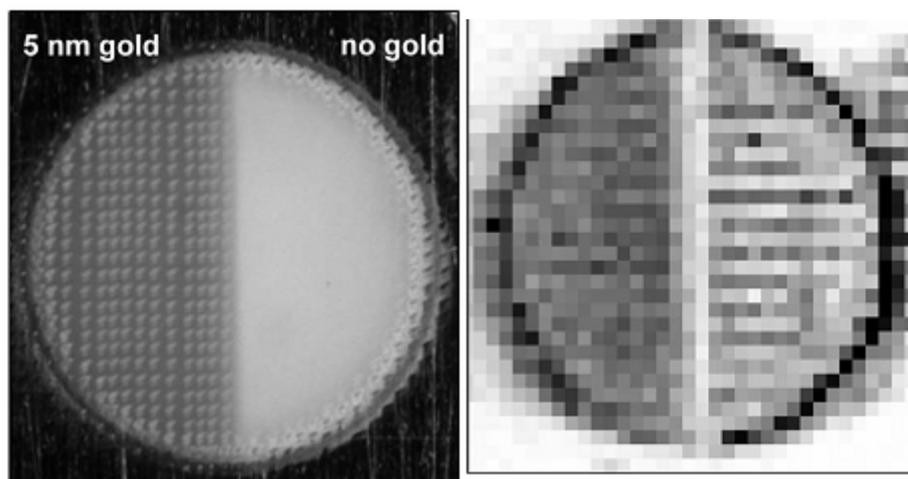


Figure I.12 : Image optique d'un échantillon MALDI de DHB obtenu par électrospray couvert à moitié par une fine couche d'or et image MALDI du signal de matrice protonée ($[m+H]^+$) (plus sombre \equiv signal plus intense) [G.McCombie/2006].

Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer ce phénomène d'augmentation. D'une part, cet effet semble être lié à la diminution de la quantité de charges en surface de l'échantillon [A.Scherl/2005], mais ceci ne devrait affecter que le temps de vol des ions et non leur signal. D'autre part, il a pu être observé la formation d'îlots de métal lors de la métallisation de l'échantillon [A.Delcorte/2002], ces îlots pouvant ainsi agir comme des points chauds, comme dans le cas des particules de cobalt de K.Tanaka et al. [K.Tanaka/1988], ou des particules de graphites [J.Sunner/1995].

I.4 Conclusion

Les sources MALDI, sont devenues des outils aux performances indéniables et incontournables dans le domaine des biomolécules avec des applications multiples en biologie, clinique, environnement, agroalimentaire,.... Leur principe repose sur des processus de désorption/ionisation extrêmement complexes. Si les nombreuses études expérimentales et théoriques ont permis de préciser l'image de ces mécanismes, tous ses aspects ne sont pas encore parfaitement élucidés, et il reste difficile de pouvoir contrôler finement ces processus lors des analyses. Les échelles de temps et d'espace sur lesquels se produisent ces mécanismes rendent extrêmement difficiles les observations et mesures, et dans de nombreux cas, les informations sont obtenues à partir des spectres de masse sur des échelles de temps et d'espace considérables par rapport aux évènements étudiés. Différents modèles ont été proposés et les simulations permettent maintenant de confirmer certaines hypothèses. Cependant, il semble aujourd'hui difficile d'expliquer toutes les observations expérimentales par un modèle unique. Finalement, le processus de désorption/ionisation implique probablement différents mécanismes dont les effets se superposent avec une prépondérance de certains ou d'autres suivant les conditions d'analyses et les analytes considérés.

Ainsi, la relative méconnaissance que nous avons de ces mécanismes freine aujourd'hui le développement du MALDI, et plus particulièrement dans certains domaines d'applications tels que l'imagerie MALDI MS, en faisant apparaître certaines limitations notamment en termes de rendement d'ions produits et de résolution spatiale. A partir de considérations pratiques liées à nos applications (imagerie MALDI en particulier), nous avons cherché à développer des systèmes qui permettaient, dans des conditions classiques d'analyse une augmentation de la sensibilité des analyses MALDI ou de contrebalancer les effets de perte de production d'ions pour des analyses de plus haute résolution spatiale. Nous avons ainsi développé et étudié un système de désolvatation laser pour répondre au problème de la sensibilité (voir §-III) et des masques pour la réduction des dimensions de la zone analysable (voir §-IV). Les résultats obtenus fourniront un excellent fond de discussion par les implications qu'ils pouvaient entraîner quant aux mécanismes MALDI présentés dans ce chapitre.

Chapitre II :

Matériels et méthodes

II.1 Le MALDI-TOF Voyager Elite

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés sur un spectromètre de masse MALDI-TOF Voyager DE-STR Elite (PerSeptive Biosystems, aujourd'hui AB Sciex).

Les différents éléments de ce spectromètre présentent l'avantage d'être aisément accessibles grâce aux panneaux et aux brides démontables dont il est équipé. Cette accessibilité en fait un outil qui permet de l'adapter au développement instrumental prévu pour mener à bien les études décrites aux chapitres III et IV.

Comme tout spectromètre de masse, il est constitué de 4 parties principales : la source, l'analyseur, les détecteurs et le module de traitement de données (Voir figure II.1). Chacune de ces parties sera décrite dans les paragraphes suivants.

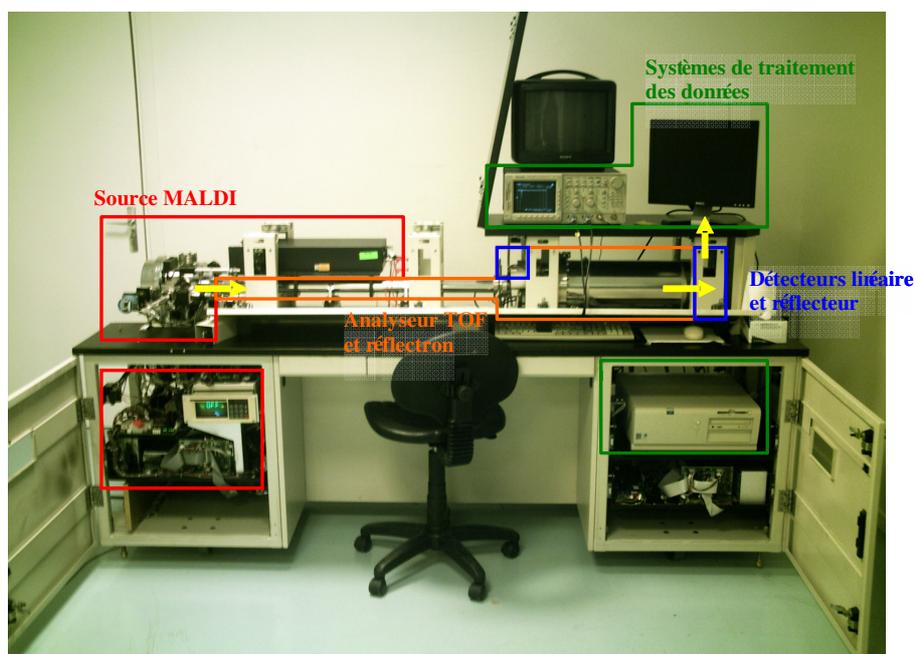


Figure II.1 : Les différentes parties du spectromètre de masse MALDI-TOF Voyager Elite.

Développement et caractérisation de techniques pour l'amélioration de la sensibilité et de la résolution spatiale des sources MALDI : Désolvatation laser et masques.

II.1.a La source MALDI

La production d'ions est assurée par une source de type MALDI dont le principe est détaillé au § I.1. La source peut être décomposée en 3 sous-parties (Voir figure II.2) :

- la chambre d'introduction de la plaque d'échantillonnage ;
- l'enceinte de la source de production d'ions ;
- le laser d'irradiation et son chemin optique.

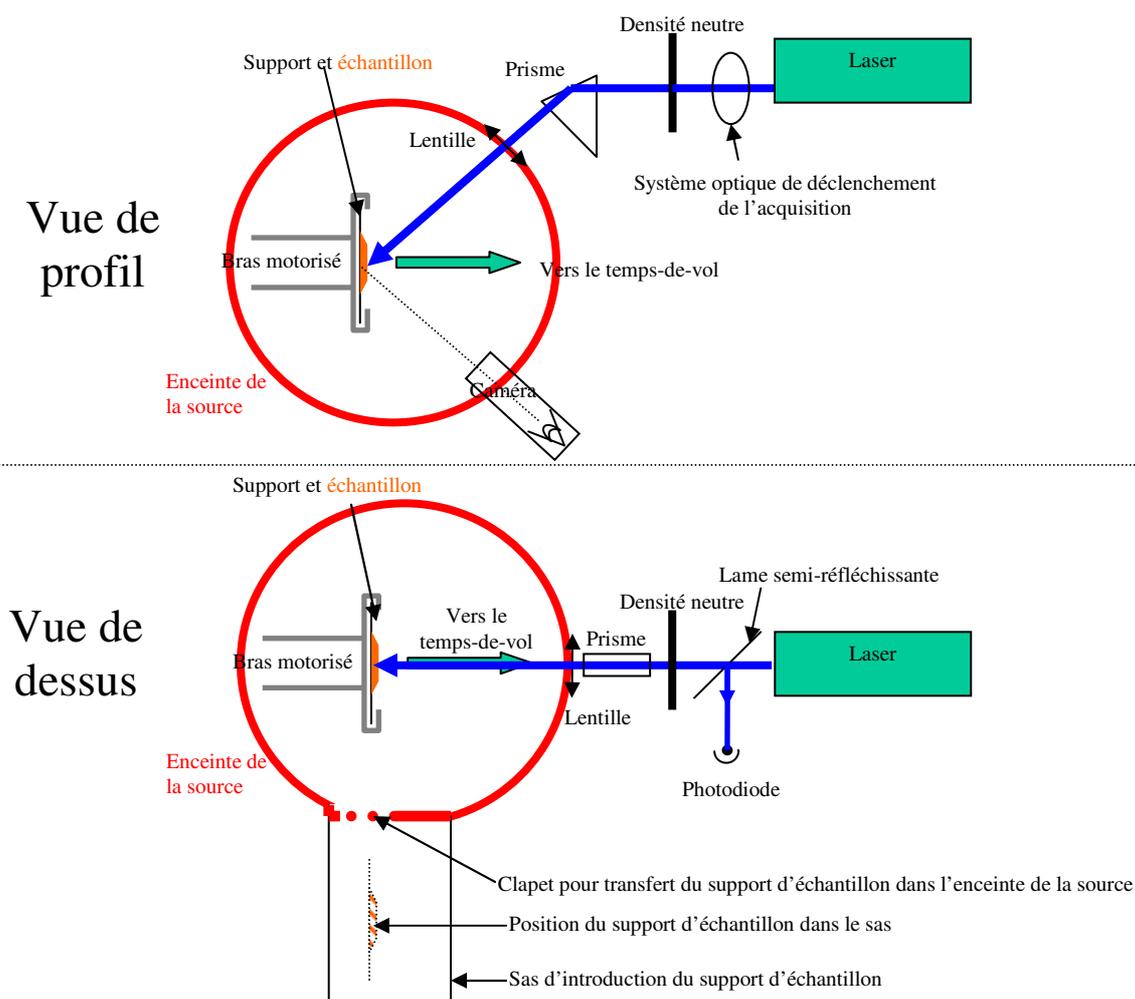


Figure II.2 : Schéma de la source du spectromètre.

Lors de toute analyse, la plaque d'échantillonnage sur laquelle a été déposé un échantillon selon un des protocoles décrit au § II.2.b.β est insérée dans le sas d'introduction où est mis en place un vide primaire (environ 8 Pa). Le chargement de cette plaque dans le sas se fait par l'intermédiaire d'un bras motorisé sur lequel elle est fixée (Voir figure II.3).

Le passage par ce sas est nécessaire pour introduire via un clapet à commande électrique la plaque d'échantillonnage dans la partie de la source soumise au vide poussé (9.10^{-5} Pa environ) sans casser ce vide à chaque changement d'échantillon. L'acheminement de la plaque au centre de la source par le bras motorisé et l'ouverture/fermeture du clapet sont entièrement automatisés.

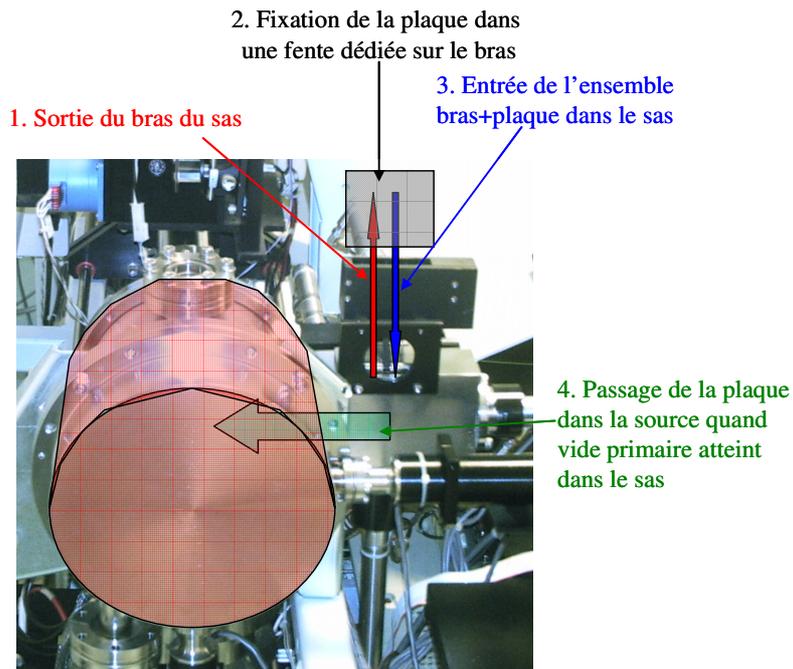


Figure II.3 : Connexion du sas d'introduction avec l'enceinte de la source.

Dans la partie centrale de la source (Voir figure II.4), la plaque d'échantillonnage est maintenue sur un support solidaire d'une platine motorisée. Ce système permet le déplacement de la plaque avec une précision d'environ $3 \mu\text{m}$ dans le plan vertical perpendiculaire à l'axe du tube de temps de vol.

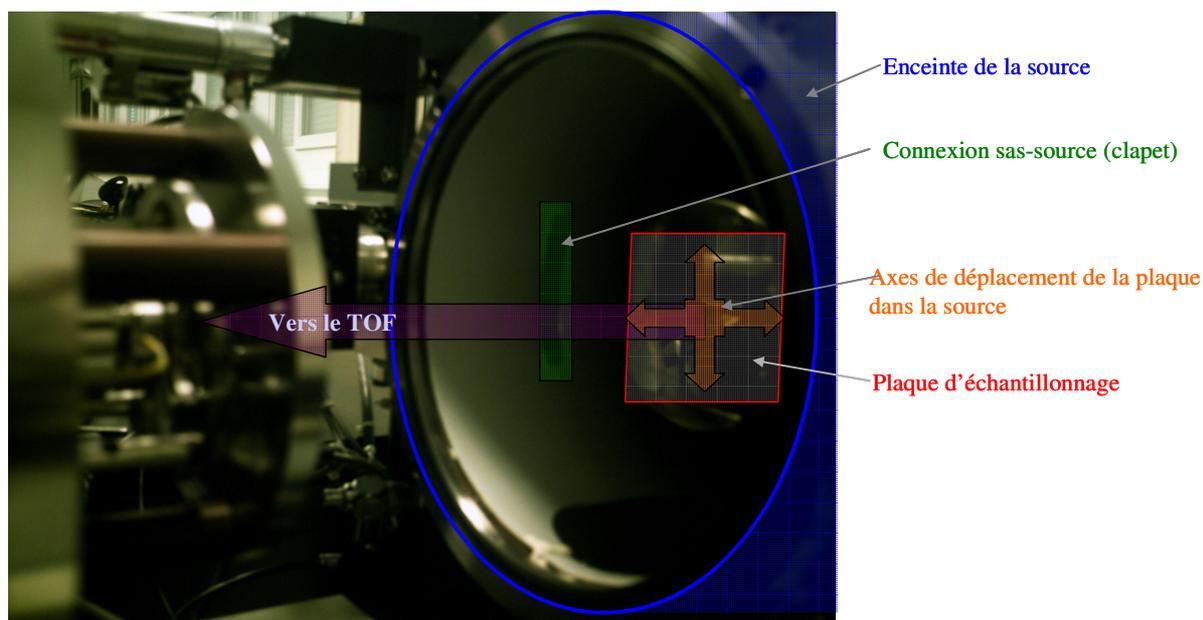


Figure II.4 : Positionnement de la plaque dans la source.

La dernière partie de la source est le laser de désorption et d'ionisation intégré au spectromètre. Il s'agit d'un laser azote qui génère des impulsions laser de 3 ns à une longueur d'onde de 337 nm (correspondant à une forte absorption de la matrice utilisée dans ces études) avec un profil gaussien, présentant de nombreux défauts.

Le taux de répétition des impulsions peut être ajusté entre 1 et 20 Hz, mais l'électronique du spectromètre limite la vitesse d'acquisition des données. Par conséquent, la fréquence d'analyse (et donc des tirs lasers) sera toujours fixée à la valeur seuil (3Hz). L'énergie disponible en sortie du laser est de 200 μ J/pulse (soit \sim 65 kW de puissance crête).

Avant de pénétrer dans l'enceinte de la source, le faisceau laser traverse plusieurs systèmes optiques (Voir figure II.5). Le premier est une lame semi-réfléchissante qui prélève une infime partie du faisceau laser et l'envoie vers une photodiode afin de synchroniser toute l'électronique du spectromètre lors de la séquence d'acquisition des spectres. L'élément suivant, une densité neutre (un disque rotatif motorisé dont l'opacité varie en fonction de son orientation), permet d'ajuster l'énergie du faisceau. L'orientation de la densité neutre est contrôlée par le logiciel d'analyse du spectromètre.

Le faisceau laser est finalement envoyé dans la source via un prisme à réflexion totale, une lentille convergente fixée à l'enceinte de la source destinée à focaliser le faisceau sur l'échantillon et une fenêtre d'entrée en quartz. Le faisceau laser attaque l'échantillon avec un angle d'incidence de 45°. Le diamètre du spot sur l'échantillon (typiquement 200 μ m) peut

être modifié grâce à une vis qui permet de régler légèrement la distance entre la lentille et l'échantillon.

L'énergie avec laquelle le faisceau laser irradie l'échantillon n'est pas directement accessible (elle est contrôlée à partir du logiciel d'acquisition à travers une échelle d'intensités graduée arbitrairement de 0 à 4600) mais elle a pu être mesurée puis calibrée expérimentalement grâce à un mesureur de puissance placé entre le prisme et la lentille d'entrée de la source lors de ces mesures (Voir figure II.5).

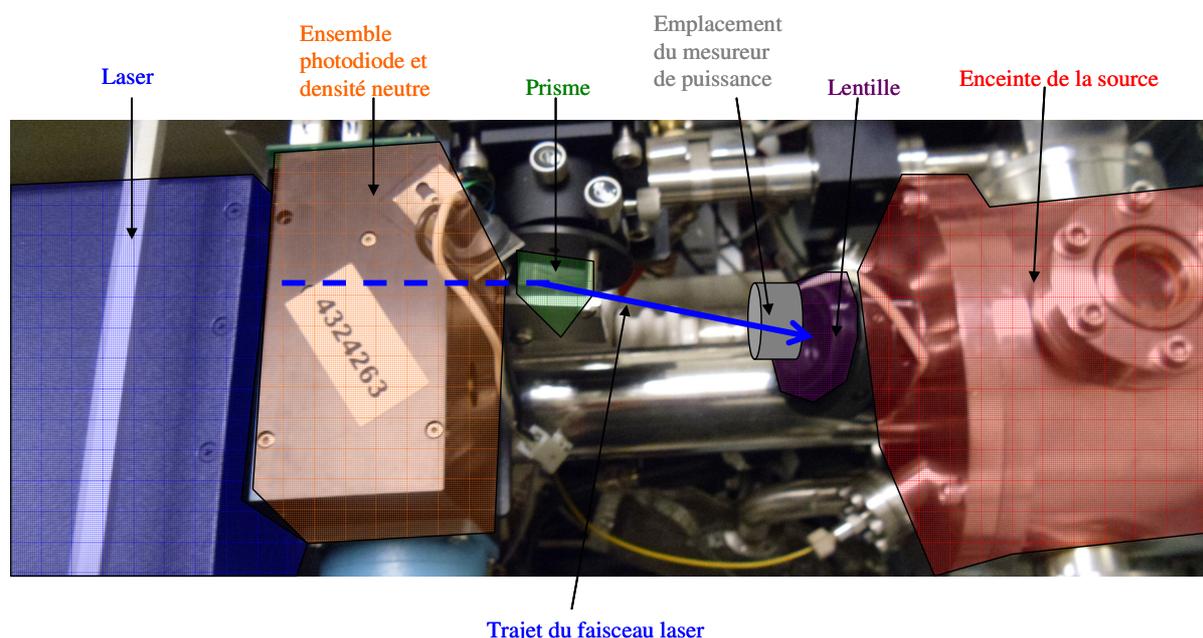


Figure II.5 : Trajet optique du faisceau laser.

Ces mesures reproduites régulièrement pendant la thèse ont permis de mettre en évidence une diminution progressive de l'énergie laser disponible (Voir figure II.6). Ce phénomène n'a que très peu affecté les analyses car les valeurs d'intensité du laser accessibles sur le logiciel ont pu être ajustées en fonction des variations observées par les mesures réalisées avec le puissance-mètre.

Finalement, la source est équipée d'une caméra fixée à 45° de l'axe du tube du temps de vol qui permet de contrôler la position d'irradiation du laser sur l'échantillon en temps réel sur un moniteur.

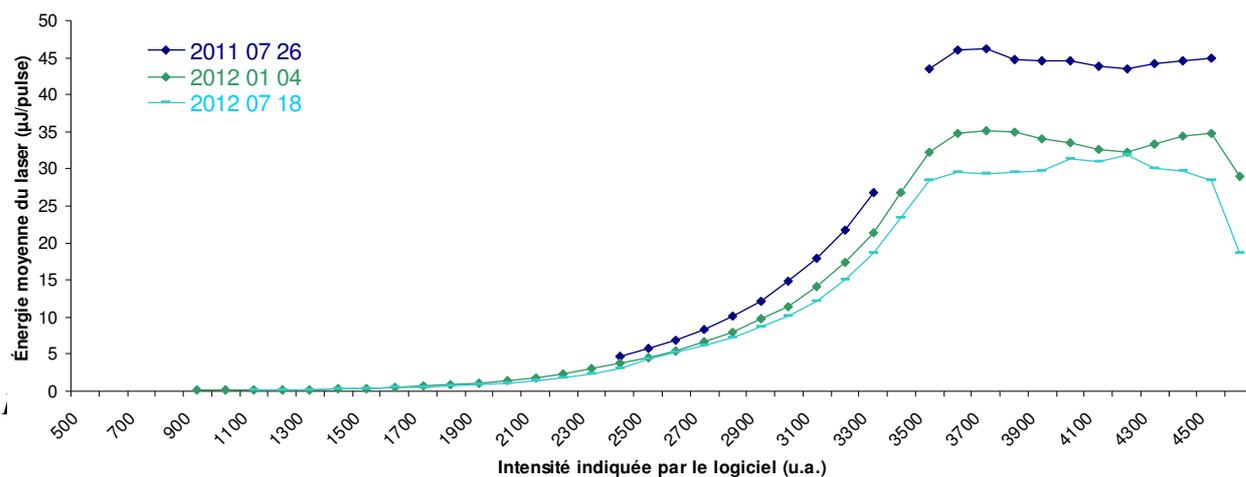


Figure II.6 : Évolution de l'énergie moyenne fournie par le laser du spectromètre en fonction de l'intensité donnée par le logiciel à différentes dates.

II.1.b L'analyseur temps-de-vol

II.1.b.a Principe

L'analyseur de type temps-de-vol (time-of-flight, TOF) permet en principe l'analyse de composés sans limitation de masse. Il est donc particulièrement adapté à l'étude des composés (principalement monochargés) de haute masse produits en MALDI. Son principe de fonctionnement repose sur les mesures de temps que mettent des ions préalablement accélérés par une différence de potentiel U (typiquement 25 kV lors de nos analyses) à parcourir une distance donnée dans une zone libre de champs (le tube de vol) [W.E.Stephens/1946]. Plus précisément, les ions acquièrent dans la région dite d'accélération une vitesse (relative) inversement proportionnelle à leur rapport m/z . Ils entrent alors dans la région libre de champ où ils continuent à évoluer à vitesse constante. Les ions se séparent donc progressivement et atteignent le détecteur dans l'ordre des m/z croissants.

Le temps de vol total de l'ion correspond à l'addition des temps passés dans la région d'accélération (t_{acc}) et dans la région libre de champ (t_{lc}). Connaissant les tensions appliquées et les paramètres géométriques de l'instrument, la mesure du temps de vol permet de remonter à la valeur de m/z . Ainsi, le spectre brut enregistré en temps est reconvertit en échelle m/z .

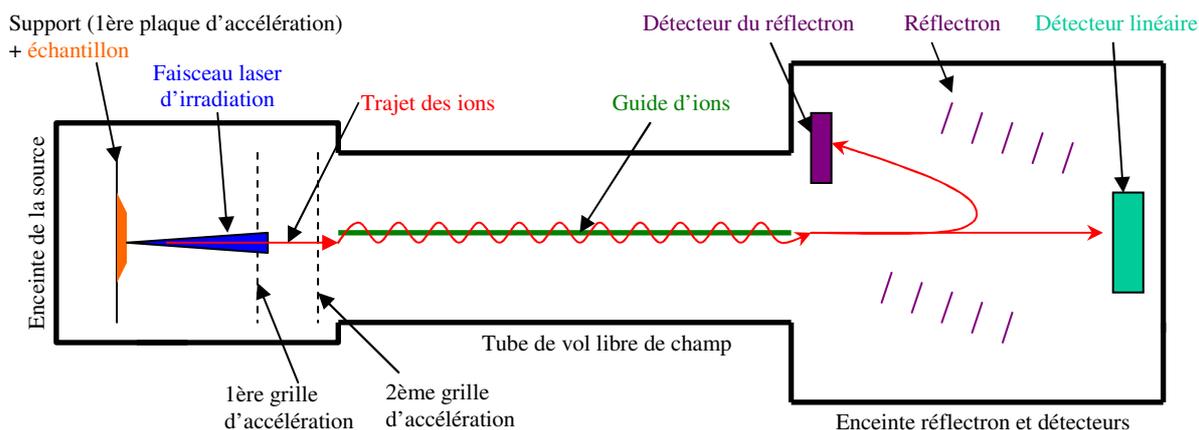


Figure II.7 : Trajet des ions à l'intérieur du TOF.

Sur le Voyager Elite, l'accélération des ions se fait au niveau de la source grâce à trois éléments (Voir figure II.7) : la plaque d'échantillonnage elle-même et deux grilles qui lui font face, la première est placée à 2,8 mm de la plaque et à 17,4 mm de la seconde (données constructeur), toutes centrées sur l'axe du tube de vol. Ces trois éléments forment deux zones d'accélération successives. La région libre de champ correspond à la distance délimitée par la 2^{ème} grille d'accélération et l'entrée du détecteur. La dimension de la zone libre de champ est d'environ 1,3 m sur notre instrument.

II.1.b.β Extraction continue et retardée

L'accélération des composés chargés à travers les deux zones peut se faire selon deux modes : l'extraction continue ou l'extraction retardée. Dans le premier cas, des champs électriques constants sont appliqués sur la plaque et la première grille pendant toute la durée de l'analyse, la dernière grille étant maintenue à la masse afin de garantir l'absence de champ électrique dans le tube de vol. Dans le second cas (utilisé dans toutes nos expériences) la mise en place du champ électrique est postérieure à la production de la plume de désorption. Ce mode permet d'améliorer la résolution spectrale qui constituait initialement la limitation majeure des analyseurs TOF linéaires (et qui contrebalançait des performances inégalées en terme de gamme de m/z accessibles (illimitée), sensibilité et de rapidité (100 μ s environ pour les plus hauts m/z)). En effet, le temps-de-vol est directement affecté par la position et la vitesse de l'ion au moment où l'accélération est appliquée. Ainsi, des ions présentant une

vitesse initiale différente au moment de l'accélération contribuent à l'élargissement des signaux observés sur les spectres et à la dégradation de la résolution. Ce problème est particulièrement critique dans le cas des sources MALDI où les ions formés sont caractérisés par une distribution importante en vitesse initiale. Dès 1955, W.C.Wiley et I.H.McLaren [W.C.Wiley/1955,1956] proposent un dispositif permettant de compenser partiellement cette dispersion. C'est sur la base de ce système qu'ont été proposés les systèmes d'extraction retardée modernes pour le MALDI [M.L.Vestal/1995] caractérisés par l'introduction d'un temps de retard t_d fixé par l'utilisateur avant lequel les tensions électriques de la plaque et de la première grille sont maintenues à la même tension $G.U$ (par exemple $G=0$). Les ions évoluent alors librement sous l'effet de leur vitesse initiale. Les ions les plus rapides parcourent une distance plus grande dans cette région libre de champ. À $t=t_d$, on augmente le champ électrique de la plaque. Le gradient de champs accélère alors davantage les ions les plus proches de la plaque, c'est-à-dire les plus lents. Ces derniers rattrapent donc dans la zone libre de champs ceux qui étaient les plus proches de la première grille. En sélectionnant les bons jeux de paramètres (G , U et t_d) il devient possible de focaliser tous les ions sur le détecteur situé après le tube de vol et ainsi améliorer la résolution spectrale (Voir figure II.8).

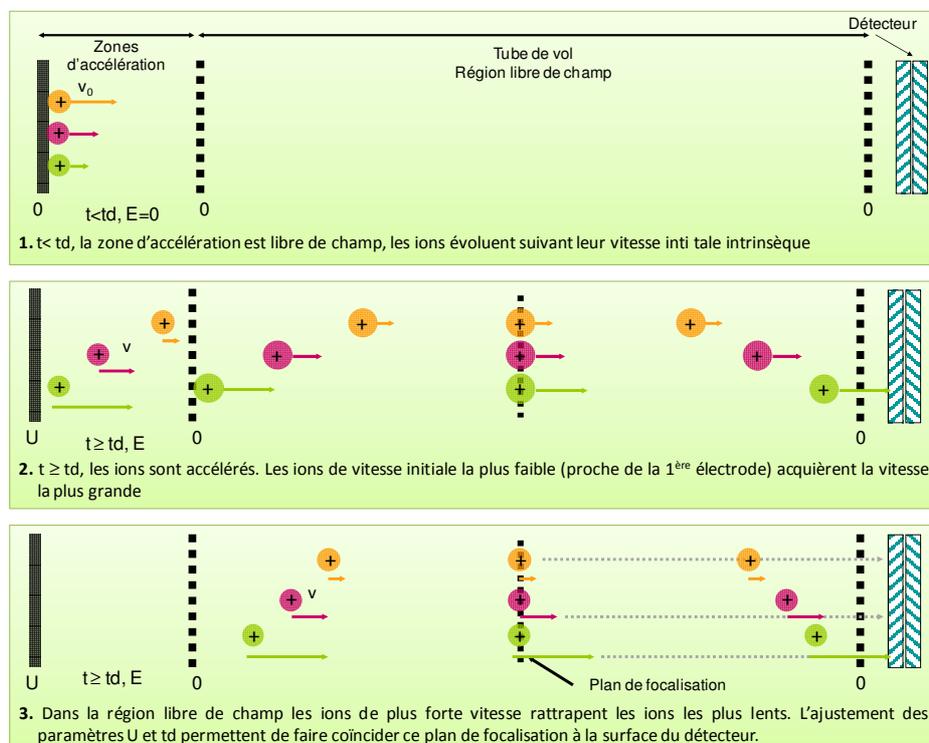


Figure II.8 : Schéma reprenant le principe de l'extraction retardée.

Notons que les paramètres doivent être optimisés pour une gamme de m/z donnée. Ainsi, il n'est pas possible d'atteindre une résolution spectrale maximum sur l'ensemble d'un même spectre. Par exemple, un temps de retard de quelques centaines de nanosecondes optimisera la résolution des signaux correspondant à quelques milliers de m/z . Le temps de mise en place des champs électriques (environ 180 ns dans notre instrument) fixe la valeur minimum du temps de retard t_d accessible et donc la gamme de masse optimisée.

II.1.b.γ Focalisation

Dans le tube de vol, un système de focalisation des ions est souvent nécessaire pour éviter que le faisceau d'ions ne diverge trop et dégrade la sensibilité des mesures par perte des ions. Sur de nombreux spectromètres de masse à temps-de-vol, ce rôle est assuré par des lentilles électrostatiques (lentilles de Einzel) situées après la dernière grille. Dans notre instrument, la focalisation est assurée par un guide d'ion placé au centre du tube de vol. Le guide d'ion est un fil métallique sur lequel est appliquée une petite tension (généralement 25 V dans notre cas, selon la valeur de la tension d'accélération) et de polarité opposée à la tension d'accélération (le temps de vol n'est donc plus strictement une zone libre de champ). Ceci permet de faire osciller les ions à proximité du guide et de limiter la dispersion du faisceau.

II.1.b.δ Mode linéaire et réflectron

Le spectromètre est également équipé d'un réflecteur (ou miroir électrostatique) situé au bout du tube de vol dont la vocation est d'améliorer la résolution spectrale [V.I.Karataev/1972 ; B.A.Mamyrin/1973-1979], complétant ainsi le dispositif d'extraction retardée. Le réflecteur permet également de réaliser des études de fragmentation en séparant en fonction de m/z les ions fragments générés par décomposition métastable dans la région libre de champ de l'instrument. Son principe repose sur la mise en place d'un gradient de potentiel avec un champ électrique homogène (habituellement linéaire) opposé à la trajectoire des ions. En pénétrant dans le miroir, les ions seront ralentis jusqu'à l'annulation de leur vitesse puis accélérés en sens inverse. Soit deux ions de même rapport m/z mais

Développement et caractérisation de techniques pour l'amélioration de la sensibilité et de la résolution spatiale des sources MALDI : Désolvatation laser et masques.

d'énergie cinétique différente, entrant ensemble dans la zone libre de champ, le plus énergétique pénétrera à la fois plus tôt et plus profondément dans le réflecteur de telle sorte qu'il perdra son avance sur le moins énergétique. Ainsi il est possible de compenser les dispersions en énergie cinétique en ramenant les ions sur un plan focal en sortie du réflecteur sur le détecteur. Pour obtenir cette refocalisation à la surface du détecteur en mode réflecteur l'instrument devra respecter certaines conditions géométriques en termes de longueur des régions libres de champ par rapport à la longueur du réflecteur ($d(\text{libre de champ}) = 4d(\text{réflecteur})$). Les instruments commerciaux sont bien sûr construits en respectant ce principe. Pour des raisons pratiques les ions sont envoyés dans le réflecteur avec un léger angle conduisant à une trajectoire globalement parabolique et permettant d'insérer le détecteur du mode réflecteur. Notons que l'homogénéité du champ dans le réflecteur est un paramètre crucial qui, s'il n'est pas parfaitement contrôlé, conduit à la perte des ions dans le miroir. Ainsi pour des facilités de mise en œuvre les instruments commerciaux (tel notre spectromètre) sont équipés d'un réflecteur de diamètre limité. Ceci implique une impossibilité d'utiliser ce dispositif pour des rapports m/z très élevés. Sur notre instrument le réflecteur est utilisable jusqu'à des m/z d'environ 15000, mais une perte très nette de sensibilité est observée au-delà de cette gamme. Ainsi pour les composés de poids moléculaires élevés, les analyses sont habituellement réalisées en l'absence de tension appliquée sur le réflecteur même si la résolution spectrale atteinte est très nettement inférieure. On parle alors de mode linéaire, les ions conservant une trajectoire rectiligne jusqu'au détecteur. Ce mode présente également l'avantage de réduire le jeu de paramètres nécessaires à l'obtention des spectres. Ceci simplifiera les études paramétriques que nous décrirons dans les chapitres suivants. Nous travaillerons donc exclusivement en mode linéaire dans la suite de nos études.

II.1.c Les détecteurs

Le détecteur placé à l'extrémité du spectromètre (en mode linéaire) est constitué d'une galette de micro-canaux (MCP), d'un scintillateur et d'un photomultiplicateur favorisant la détection des hauts m/z (par comparaison aux 2 MCP montées en chevrons du système de détection en mode réflecteur). À travers la galette de micro-canaux, le courant ionique provoque l'émission d'électrons, qui, en frappant à leur tour la paroi du scintillateur

conduisent à l'émission de photons. Ces derniers sont convertis en électrons grâce au photomultiplicateur qui permet la création d'un courant électrique mesurable.

II.1.d Le système de traitement de données

Le signal électrique fourni par le détecteur est préalablement enregistré par un oscilloscope avant transmission au système de traitement de données, lequel permet d'observer au fur et à mesure des acquisitions au tir par tir la formation du spectre final (Voir figure II.9). Couplé à l'observation de l'échantillon par la caméra, ceci permet de cibler efficacement les zones d'intérêt de l'échantillon si la visualisation de la fluorescence de l'échantillon lors de l'irradiation laser n'est pas possible ou suffisante lors d'une analyse.

Une fois la série d'acquisition terminée, seul le spectre final est transmis à un ordinateur qui permet de l'examiner en détail via le logiciel d'acquisition (Voyager Control Panel) ou d'en extraire les informations pertinentes (intensité des signaux, résolution spectrale,...) via le logiciel de traitement de données (Data explorer). Le fichier du spectre peut également être stocké au format ASCII, ce qui permet de le traiter par un logiciel tiers (Excel ou Origin par exemple).

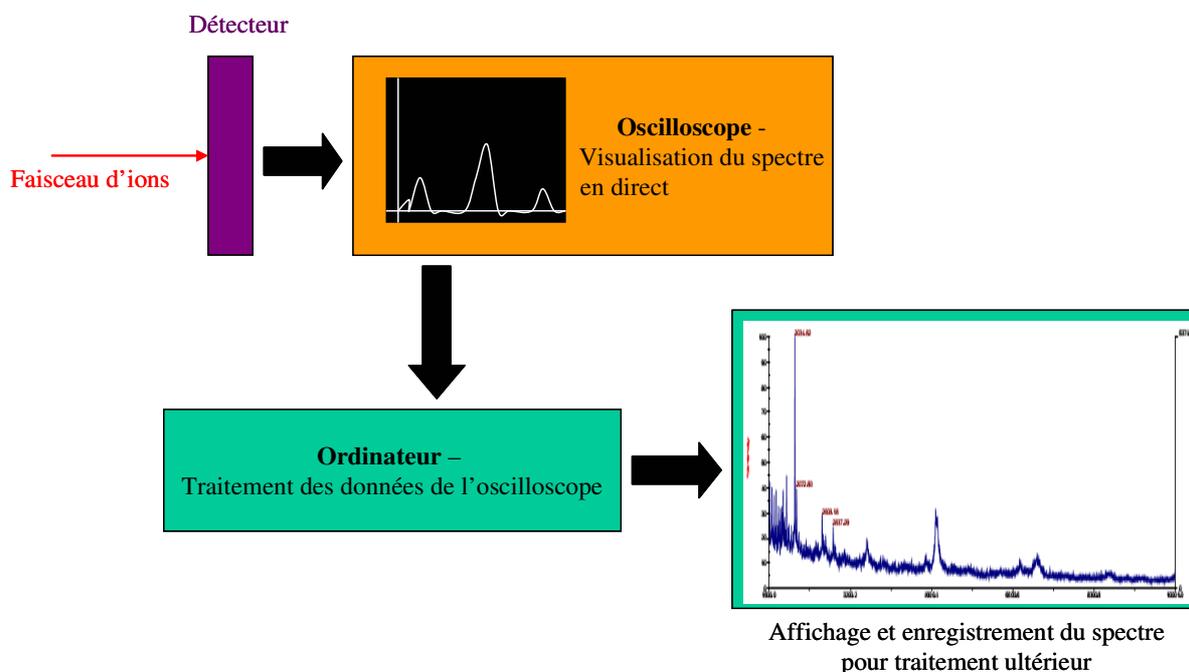


Figure II.9 : Système de traitement de données du spectromètre.

II.2 Préparation des échantillons

II.2.a Analytes et matrices

Les analytes sélectionnés dans ces travaux sont des standards peptidiques et plus particulièrement la bradykinine (Mw~1060 Da), l'ACTH 18-39 (Mw~2466 Da) et l'insuline bovine (Mw~5733 Da), couramment utilisés en tant que calibrant pour l'analyse MALDI. Des solutions de ces analytes sont obtenues par dissolution de poudre de l'un ou l'autre des composés sous forme de sel de TFA (pureté à 71.5%_m de peptide en masse) dans le cas de la bradykinine et sous forme pure dans le cas de l'ACTH 18-39 et de l'insuline bovine. Les solutions d'analytes utilisées ont généralement une concentration de 5.10⁻⁶ mol/L pour la bradykinine, de 5.10⁻⁵ mol/L pour l'insuline et de 10⁻⁶ mol/L pour l'ACTH 18-39. Le solvant utilisé pour ces solutions est de l'eau de qualité HPLC.

La matrice utilisée est l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA ; Mw~189 Da - Sigma-Aldrich) sous forme pure et en poudre, choisie en raison de sa forte absorption à 337 nm - longueur d'onde du laser à azote de la source - et de sa polyvalence qui lui permet d'analyser aussi bien les peptides que les protéines. Les solutions de matrice HCCA utilisées sont des solutions dont la concentration varie de 10 à 20 mg/mL suivant le mode de dépôt à réaliser.

Des coupes de cerveau de rat de 10 μ m d'épaisseur ont également été nécessaires pour les études du chapitre IV. Ces coupes ont été réalisées sur un cryostat (Leica) disponible au laboratoire LSMBFA. Pour les expériences, les tissus n'ont pas subis de traitement particulier et ont été directement cocrystallisés avec la solution de matrice. Pour ces expériences la matrice HCCA est préparée à 10 ou 20 mg/mL dans un mélange ACN/ 0.1% TFA dans l'eau (7 :3, v/v). Deux modes de dépôts ont été testés. Le 1^{er} mode consiste à déposer la solution de matrice manuellement à l'aide d'une micropipette (15-20 μ L environ dispersés). Des dépôts en mode automatique par utilisation d'un micro-nébuliseur (Imageprep, Bruker Daltonics) ont également été réalisés en utilisant les paramètres constructeurs proposés par défaut pour le dépôt de la matrice HCCA.

II.2.b Méthodes de préparation des échantillons

II.2.b.α Les supports d'analyse

Les analyses sont effectuées sur des échantillons déposés sur deux types de supports, une plaque d'échantillonnage de type support inox ou des lames de verre présentant un revêtement ITO (Indium Tin Oxyde) permettant de rendre les lames conductrices (la tension étant appliquée sur le support) mais permettant de leur conserver leur transparence pour les observations au microscope. Les lames de verre-ITO sont plus adaptées aux manipulations avec les masques (chapitre IV), à la fois pour le maintien du masque sur l'échantillon mais aussi pour certaines analyses, comme celles des coupes de tissu, dont les analyses sont couramment réalisées sur ces types de support.

II.2.b.α.1 La plaque d'échantillonnage

Les supports d'origine des échantillons pour ce spectromètre sont des plaques d'échantillonnage en acier inoxydable (certaines avec un revêtement en or), contenant cent dépôts pré-marqués numérotés (Voir figure II.10).

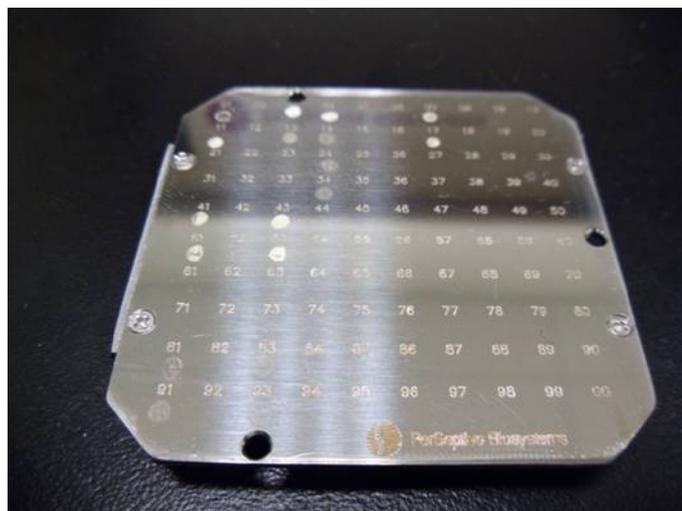


Figure II.10 : Plaque d'échantillonnage présentant quelques dépôts.

II.2.b.α.2 Lames de verre-ITO

Les lames de verre-ITO utilisées pour faire les analyses ont une épaisseur d'environ 0,5 mm. Elles sont recouvertes sur une de leurs faces d'une fine couche métallique conductrice constituée d'indium et d'oxyde d'étain qui maintient le champ électrique d'accélération au niveau de l'échantillon.

Les plaques d'échantillonnage originelles ne permettent pas l'installation d'une lame de verre de ce type car l'écart entre la lame et la première grille entraînerait un risque d'apparition d'arc électrique dans la source si elle était simplement fixée à sa surface. On a donc creusé une de ces plaques afin de pouvoir y maintenir une lame sans que cette dernière ne modifie la distance entre la surface de la plaque et la première grille d'accélération. L'ensemble est maintenu par du scotch conducteur et l'échantillon est déposé sur le côté métallisé de la lame de verre-ITO.

II.2.b.β Méthodes de dépôt

Les études systématiques menées lors de cette thèse nécessitent des dépôts homogènes, tant en termes de densité cristalline sur l'ensemble de la surface du dépôt qu'en termes de signal qu'ils permettent d'obtenir dans les spectres. Trois types de dépôts ont été testés dans ce but.

II.2.b.β.1 Dépôts classiques

Les dépôts classiques sont réalisés à partir d'une solution de matrice à 10 mg/mL dissous dans un mélange de solvant à ACN/0.1%_vTFA dans l'eau, 7:3 (v/v) et d'une solution d'analyte. Pour ce faire, 1 μL de solution d'analyte est déposé sur le support d'échantillonnage auquel on ajoute 1 μL de solution de matrice. Le mélange sèche à pression et température ambiante jusqu'à sa complète cristallisation et l'évaporation du solvant.

II.2.b.β.2 Dépôts acétone

Ce type de dépôt a été testé afin de vérifier l'effet en analyse d'un dépôt utilisant l'acétone comme solvant de matrice, ce solvant ayant généralement tendance à permettre

l'obtention de dépôts constitués de cristaux très fins et assez réguliers. Ainsi, il est pratiquement identique au dépôt simple puisque seul le solvant – de l'acétone – et la concentration massique de la solution de matrice (20 mg/mL) sont modifiés. Le protocole de préparation reste lui aussi le même.

II.2.b.β.3 Doubles dépôts

Ces dépôts en couche mince sont particulièrement réguliers du point de vue de la densité cristalline. Les solutions utilisées sont les mêmes que dans le cas des dépôts acétone, mais la méthode de préparation diffère. On dépose dans un premier temps 1 μL de la solution de matrice seule sur le support d'analyse. Ce premier dépôt en séchant à pression et température ambiante va s'étaler fortement et se cristalliser. C'est sur cette surface cristalline qu'on dépose alors 1 μL de la solution d'analyte. On laisse reposer l'ensemble jusqu'à complète évaporation du solvant.

Ce type de dépôt donnera toujours les signaux les plus intenses dans nos spectres de masse. On privilégiera son utilisation dans les manipulations présentées dans le chapitre IV en raison de la grande régularité de la surface de ces dépôts qui est requise pour la réalisation d'analyses avec certains masques.

Chapitre III :

Désolvatation laser des agrégats

III.1 Introduction

Les agrégats peuvent être considérés comme des fragments de la structure cristalline de l'échantillon dont les différents composés sont liés par des interactions non covalentes faibles (forces de Van der Waals) ou fortes (liaisons ioniques). Comme décrit dans la partie bibliographique, les études fondamentales menées par différents groupes [I.Fournier/2002a-2005 ; M.Karas/2000 ; E.Sachon/2007] ainsi que les simulations numériques [L.V.Zhigilei/1997a,2000] ont conduit peu à peu à converger vers un modèle de désorption/ionisation en MALDI intégrant la formation d'agrégats (Voir § I.2.b). Les simulations numériques démontrent ainsi le passage d'un régime d'évaporation thermique caractérisé par l'éjection quasi-exclusive de neutre vers un régime mixte d'évaporation et d'ablation (explosion de phase) avec émission de composés chargés et d'agrégats lorsque la fluence augmente. Ces résultats sont confortés par une série d'expériences mettant en évidence l'existence de ces agrégats par utilisation d'un champ répulsif dans la source de l'instrument pendant la période de temps de retard [I.Fournier/2002a-2005]. Cependant, si l'éjection d'agrégats est devenue un modèle admis parmi la communauté, leur rôle dans les mécanismes d'ionisation reste encore en débat [R.Knochenmuss/2006a]. D'après les simulations ces agrégats apparaissent très rapidement après le tir laser ($< 1\text{ns}$) et présentent une distribution en taille très large. Le principal problème soulevé par la présence des agrégats vient du fait que les ions d'analytes piégés dans ces complexes ne sont pas présents sous leur forme libre. Ainsi, par analogie avec les mécanismes associés à la technique ESI, certains analytes se trouvent solvatés par de nombreuses molécules de matrice.

Les différentes expériences réalisées tendent à démontrer que les champs électriques appliqués pour transférer les ions dans l'analyseur de masse (par exemple : trappes ioniques, orbitrap, ICR) ou appliqués pour assurer une séparation en fonction du rapport m/z (Temps-de-Vol) contribuent à apporter une désolvation de ces complexes, qui reste cependant, partielle. Les études menées sur les sources AP MALDI [A.Verentchikov/1999] lors du développement de ces dernières démontrent, entre autre, que pour des pressions de l'ordre de l'atmosphère, les agrégats peuvent être stabilisés par des collisions relaxantes. La relaxation est alors suffisante pour conduire à l'observation de molécules d'analytes accompagnées par de nombreux pics d'agrégats de matrice ($[M+nm]^+$). Des manipulations de type AP MALDI réalisées en l'absence de champ électrique appliqué au niveau de l'échantillon [C.N.McEwen/2010 ; S.Trimpin/2011] montrent cependant la possibilité d'observer des composés multi-chargés dans les spectres. La conservation de ces charges sur les analytes serait reliée à des collisions relaxantes de ces espèces à l'intérieur de la source suivies par une désolvation des agrégats au sein d'un capillaire chauffé qui permettrait d'obtenir des ions libres multi-chargés. Néanmoins, dans des conditions classiques d'analyse MALDI (vide poussé ou intermédiaire et champs électrique appliqué au niveau de l'échantillon) , les expériences démontrent que les collisions ne permettent ni de stabiliser efficacement les agrégats, ni de promouvoir leur désolvation intégrale ; l'essentiel des espèces chargées produites est observées sous leur forme mono-chargées.

Ce phénomène reste un problème majeur pour la qualité des spectres. Dans le cas d'ions libres, formés avant la fin de la période de temps de retard, ces derniers seront détectés à un temps défini sous la forme d'un pic résolu et dépendant uniquement des paramètres d'éjection et des conditions analytiques (géométrie de l'instrument, tensions appliquées, temps de retards,...). En revanche, dans le cas d'agrégats, si ceux-ci ne sont pas entièrement désolvatés avant la fin de la période de temps de retard et poursuivent un processus de désolvation au cours de l'accélération, il n'y a plus de corrélation entre le temps-de-vol et la valeur de m/z . Les agrégats qui présentent une distribution en taille et en temps de désolvation importante apparaissent sous forme de signaux non résolus et contribuent en particulier à augmenter le bruit de fond des spectres. C'est à ce phénomène qu'est attribué le bruit de fond important observé dans les spectres MALDI-TOF et dénommé « bruit chimique » par opposition au bruit provenant purement de l'électronique. Ce phénomène a été décrit par plusieurs auteurs. En particulier, les travaux de A.N.Krutchinsky et B.T.Chait [A.N.Krutchinsky/2002] ont mis en évidence l'existence d'ions de matrice seuls ou en

agrégats par sélection du bruit de fond et études en mode MS/MS. Dans ces études réalisées sur un instrument de type MALDI-Ion Trap (IT) la présence d'agrégats est démontrée pour pratiquement toutes les valeurs de m/z sélectionnées et pour des temps de survie nettement supérieurs à ceux attendus en MALDI-TOF. Plus récemment, Sachon et al. [E.Sachon/2007] ont étudié la désolvation des agrégats en MALDI-TOF en mode linéaire par variation du faisceau de déflexion. Ces expériences ont permis de mettre en évidence, pour deux matrices différentes, l'existence d'une composante plus lente compatible avec l'hypothèse d'une désolvation dans la source. De plus des études complémentaires menées en mode MS/MS démontrent la présence de l'ion d'analyte comme fragment principal lorsque le bruit de fond pour des m/z supérieur à l'analyte (jusqu'à 300 et au-delà) est sélectionné. L'ensemble des travaux réalisés met en avant les effets délétères liés à la désolvation progressive et partielle de ces agrégats au cours de l'analyse, ce qui conduit à une perte de qualité spectrale par augmentation du bruit de fond et perte sur le signal d'analyte.

Ainsi, obtenir une désolvation des agrégats analytes-matrice ou matrice-matrice avant leur transfert dans l'analyseur (pendant la période de temps de retard précédent l'accélération pour un système MALDI-TOF) devrait générer une amélioration de la qualité spectrale et plus particulièrement de la sensibilité par augmentation de l'intensité du signal de l'analyte et diminution du bruit de fond chimique.

III.2 Principe de la manipulation

L'objectif de l'étude a consisté à développer puis tester un système qui permette d'obtenir une désolvation efficace des agrégats libérés en MALDI lors du processus de désorption dans des conditions d'analyse classique. Compte-tenu de la prépondérance actuelle des systèmes de type MALDI-TOF pour l'analyse en laboratoires, nous avons imaginé un système compatible avec ces instruments. Pour essayer d'obtenir une désolvation efficace des agrégats sur un laps de temps court (inférieur au temps de retard soit quelques centaines de ns au maximum) notre choix s'est porté vers une désolvation assistée par irradiation laser qui permet d'intercepter la plume de désorption au cours de son expansion. Cet effet d'un second laser sur l'analyse se traduira par une diminution du bruit de fond observable sur les spectres et une augmentation de la sensibilité.

Nous avons donc travaillé à l'ajout d'un second laser sur notre instrument, sur le principe d'un faisceau arrivant le plus près possible du porte-échantillon, parallèle à ce dernier, et donc perpendiculaire à l'axe du temps-de-vol. Nous n'avons pas cherché à faire en sorte que ce second faisceau laser soit colinéaire au laser MALDI car, outre la grande difficulté à réaliser ce montage, il aurait également entraîné l'irradiation de l'échantillon, ce qui n'aurait pas été le but recherché. Le système a été monté sur l'instrument MALDI-TOF à disposition pour cette étude, le Voyager Elite upgradé STR (Applied Biosystems) décrit au chapitre II. Un temps conséquent a été nécessaire pour réaliser ce montage. Les principales difficultés sont bien sûr liées au caractère novateur de la solution proposée et à l'adaptation du spectromètre commercial au dispositif souhaité. D'autre part, les modifications réalisées ont engendré de nouvelles difficultés techniques qui seront discutées plus loin dans ce chapitre, et dont le contrôle a retardé le démarrage des expériences. Ceci confère aux travaux présentés un caractère préliminaire.

III.2.a Les lasers de désolvation

Deux types de lasers ont été successivement implémentés sur le dispositif à notre disposition : un laser fibré continu de type YLR à 1070 nm et un laser impulsionnel de type Nd:YAG à 1064 nm. A ces longueurs d'onde, seuls des effets thermiques peuvent être initiés. Il sera donc extrêmement peu probable d'ioniser directement les espèces irradiées, et les effets observés seront liés à une désolvation des agrégats et/ou de fragmentation des autres composés présents dans la plume et non à un effet de post-ionisation.

Le laser continu est plus simple à utiliser pour intercepter la plume puisque seul l'alignement entre le laser et la plume est critique. Ce réglage est tout aussi important dans le cas du laser impulsionnel, mais la synchronisation temporelle avec la source MALDI peut également se révéler cruciale pour irradier la plume au meilleur moment. En contrepartie, la désolvation par une source impulsionnelle permet en principe une analyse plus fine de l'effet de désolvation dans la plume, à travers la modification du délai entre les déclenchements des lasers MALDI et de désolvation.

III.2.a.α Le laser YLR

Le laser YLR fibré utilisé (IPG photonics) fournit un faisceau continu à 1070 nm d'environ 4 mm de diamètre d'une puissance réglable jusqu'à 100W et de profil gaussien (Voir figure III.1.a), avec un maximum d'énergie en son centre.

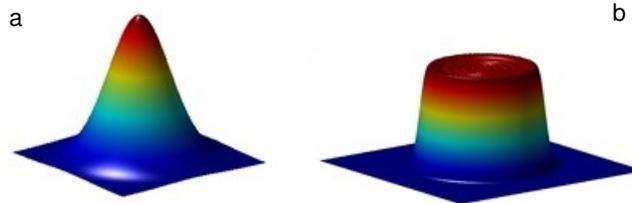


Figure III.1 : Profils de faisceaux laser gaussien (a) et top-hat (b).

III.2.a.β Le laser Nd-YAG

Le laser Nd:YAG (Quantel, Brilliant EaZy) fournit des impulsions lasers de 8 ns à une longueur d'onde de 1064 nm, d'énergie maximale par impulsion 400 mJ à une cadence maximale de 10Hz. Le faisceau laser de 5 mm de diamètre environ est de profil top-hat, (Voir figure III.1.b), caractérisé par une densité d'énergie relativement uniforme.

III.2.b Montages optique

Le chemin optique mis en place doit permettre au faisceau laser de désolvatation d'arriver à l'intérieur de la source, avant la première grille d'accélération puisque le champ électrique est maintenu à 0 dans cette région pendant le temps de retard (Voir figure III.3). Dans l'idéal, il doit intercepter la plume le plus tôt possible. En effet, si on prend 500 m/s de vitesse initiale moyenne des composés désorbés comme estimation [A.Verentchikov/1999], pour un temps de retard de 180 ns (temps de retard de l'électronique seule), la plume aura parcouru en moyenne 90 μm et 500 μm pour un temps de retard de 1000 ns. Dans ces conditions, il est crucial que le faisceau passe au plus près de la surface.

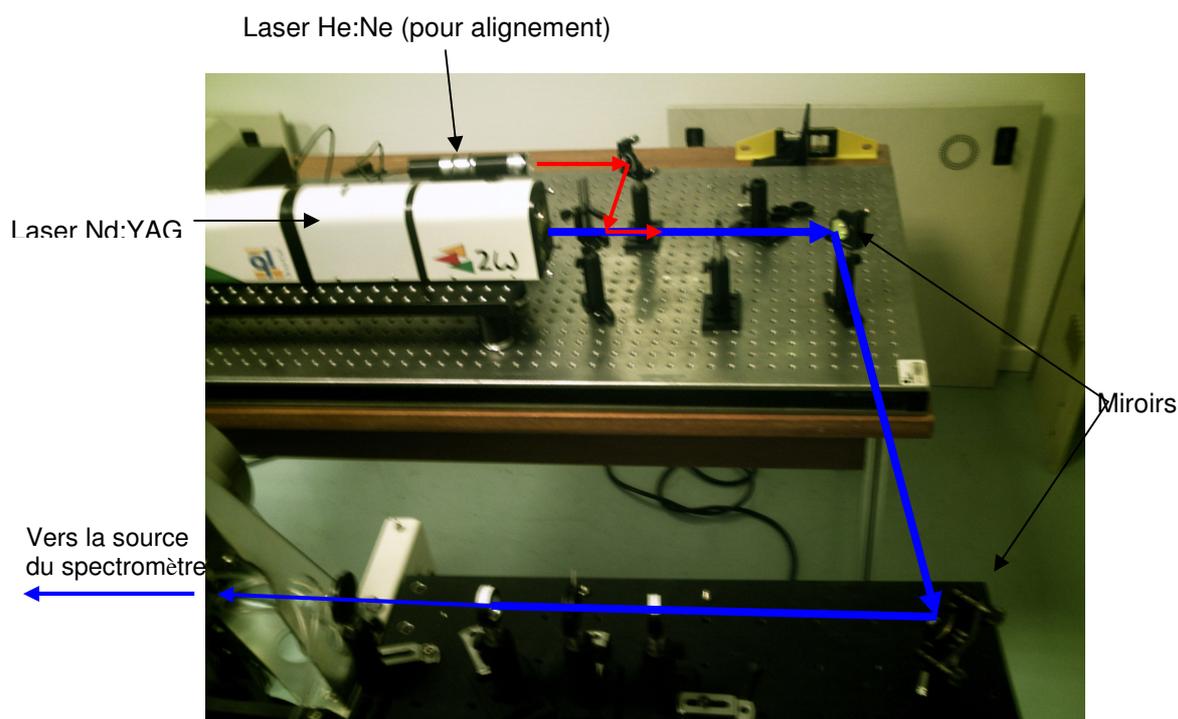


Figure III.2 : Photographie d'un modèle de chemin optique pour les expériences de double laser avec le laser impulsionnel.

Cependant, la géométrie de notre spectromètre commercial, en particulier l'existence d'un décalage entre la fenêtre d'entrée du second laser et la plaque d'échantillonnage, ainsi que la faible dimension de la première zone d'accélération (2.8 mm) impose au faisceau laser d'être légèrement incliné par rapport à la surface de l'échantillon (Voir figure III.3). En raison de ces difficultés de nature géométrique, il ne nous a pas été possible de mesurer précisément à quelle distance de l'échantillon passait ce second laser.

Ceci rend très délicat l'obtention d'un faisceau parfaitement rasant par rapport à l'échantillon. Il pourra arriver que le second faisceau laser irradie une partie du dépôt cristallin ce qui produira des signaux parasites dans les spectres de masse. Cependant, ces signaux sont facilement identifiables – ils apparaissent même en l'absence de plume, et pourront être éliminés lors du traitement des données.

Dans le cas du laser YLR, l'alignement du faisceau est réalisé directement sur une fenêtre d'entrée latérale de la source (Voir figure III.4).

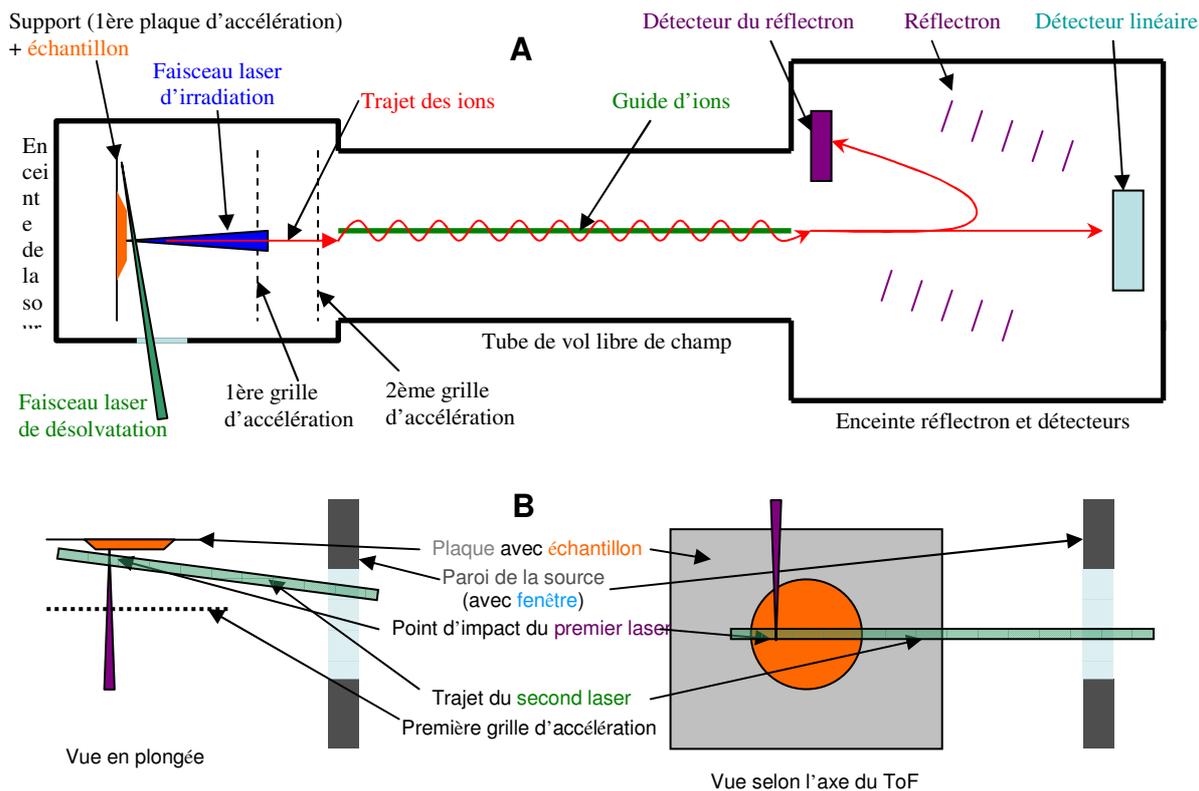


Figure III.3 : Mise en évidence des trajets des deux lasers dans le spectromètre (A) et au niveau de l'échantillon (B).

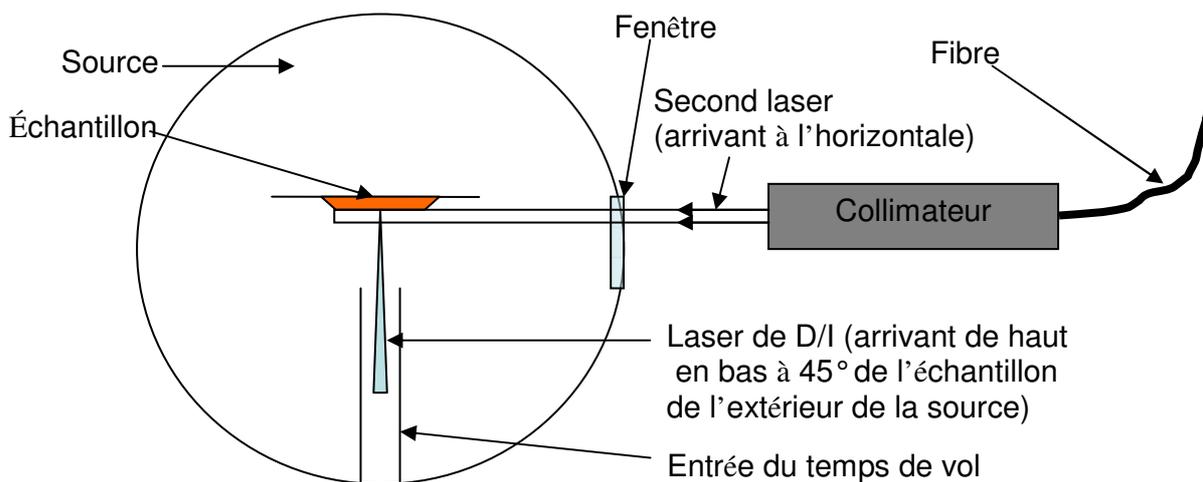


Figure III.4 : Description du montage de double laser dans le cas du laser continu.

Dans le cas du laser Nd:YAG, l'alignement du faisceau est assuré par deux miroirs (Voir figure III.5). Ce faisceau traverse également un télescope qui a pour but de réduire le diamètre du faisceau laser (passage d'environ 5 mm de diamètre de faisceau à 1-2 mm), puis la fenêtre d'entrée latérale de la source.

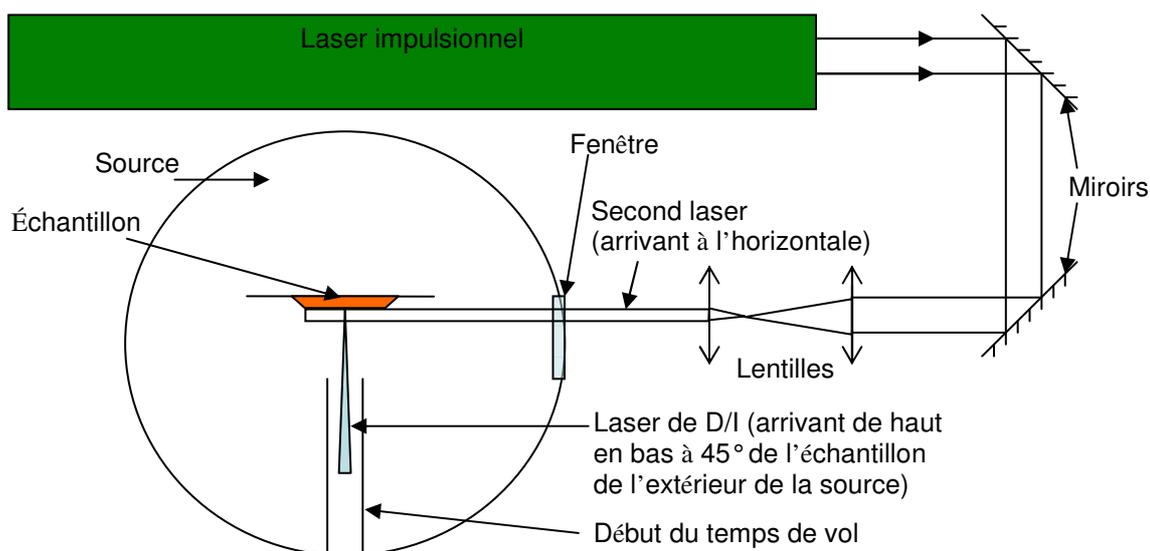


Figure III.5 : Description du montage de double laser dans le cas du laser impulsionnel.

III.2.c La synchronisation des lasers

Si aucune synchronisation n'est nécessaire dans les expériences de désolvatation avec le laser continu, cette étape s'avère indispensable avec le laser impulsionnel. Il s'agit de s'assurer qu'en dépit d'un taux de répétition différent pour le laser et le spectromètre, de la vitesse importante des particules ablatées et de la faible durée des impulsions, le laser de désolvatation interagit efficacement avec la plume. De plus, les données de la littérature concernant la distribution de vitesse initiale sont dispersées et pas nécessairement transposables à nos conditions d'expériences. Il est impératif de trouver un système suffisamment souple pour s'adapter à une dynamique de plume mal caractérisée dans les conditions d'analyses MALDI conventionnelles.

Le principe de la synchronisation que nous avons développé est présenté dans les figures III.6 et III.7. Elle est réalisée grâce à un générateur de délais 4 voies (Stanford

Research System DG 535) qui contrôle le déclenchement du laser azote, de la lampe flash et du Q-switch du laser Nd:YAG. Un diviseur de fréquence est également employé pour diminuer la cadence du laser à azote et la faire correspondre à la fréquence de travail du spectromètre de masse.

Lors des manipulations, nous avons fait varier le temps de retard entre le tir laser et la mise en place du champ électrique d'accélération de 10 à 1500 ns. Le délai mis en place entre les deux lasers doit donc être inférieur à ce temps de retard auquel on ajoute le temps de mise en place du champ électrique (environ 180 ns). Un temps de retard de 280 ns a été sélectionné pour laisser à la plume le temps de se développer et interagir efficacement avec le faisceau laser.

D'après [A.Verentchikov/1999], la vitesse initiale moyenne de la plume est d'environ 500 m/s et dans notre cas, la largeur du second faisceau laser est de l'ordre du millimètre, on peut donc estimer que la durée moyenne de l'interaction faisceau-plume est de l'ordre de la durée de l'impulsion laser (quelques nanosecondes) et que la tranche de plume interceptée par le laser de désolvatation a une largeur de quelques millimètres. Cette valeur importante (liée évidemment au diamètre du faisceau) interdit toute analyse fine d'un effet du laser de désolvatation en fonction de la portion de plume irradiée.

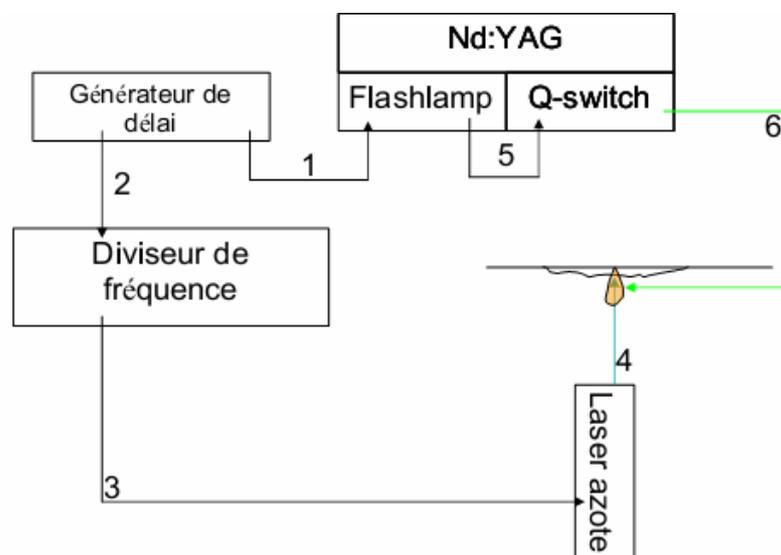


Figure III.6 : Schéma des étapes de déclenchement des différents éléments du système avec le second laser impulsionnel.

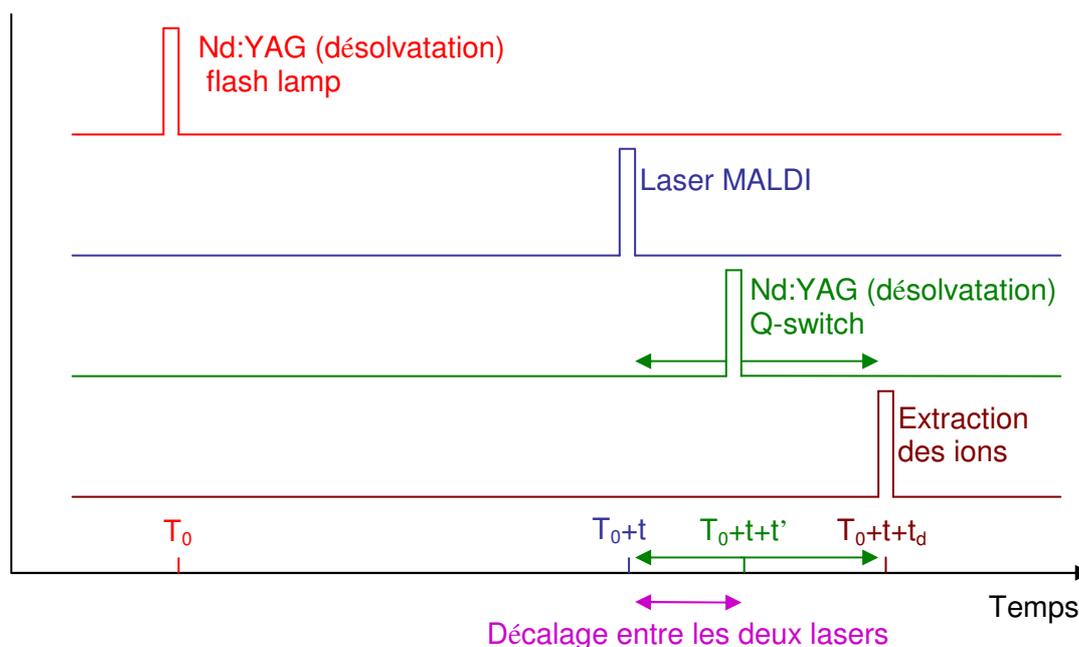


Figure III.7 : Représentation des différentes étapes de déclenchement des deux lasers.

III.3 Résultats

Pour chacun des montages réalisés (laser continu puis impulsionnel), nous avons étudié le comportement des signaux à travers la variation de différents paramètres tels que l'énergie du second laser ou le délai entre le déclenchement des deux tirs laser dans des conditions d'analyses MALDI classiques réalisées en mode linéaire. Nous avons travaillé avec des standards peptidiques en tant qu'analytes de référence préparés de manière conventionnelle avec la matrice HCCA par la méthode des dépôts classiques (Voir § II.2.b.β.1). Nous nous sommes, plus particulièrement intéressés aux signaux de l'analyte et aux signaux du monomère et du dimère protonés de la matrice. Nous avons attaché une attention toute particulière à l'évolution de l'intensité des signaux, paramètre sur lequel nous attendons un effet plus important sans toutefois négliger d'observer les autres caractéristiques spectrales telles que la résolution.

III.3.a Expériences de désolvatation par laser continu

Le laser continu intercepte la plume générée en MALDI durant toutes les étapes de son évolution. L'effet de désolvatation devrait être ainsi plus facilement observé avec ce montage que pour le laser impulsionnel.

Nous avons fait varier la puissance du second laser d'environ 10 à 60 W afin d'observer la tendance globale d'évolution en fonction de l'énergie. La figure III.8 présente l'évolution des spectres de masses avec l'augmentation de la puissance du laser continu. L'étude des spectres montre que leur profil évolue lorsque la puissance du second laser augmente. L'évolution des signaux est minime lorsque l'énergie du second laser est faible mais clairement observée à partir de 50 W. Il faut en particulier noter une diminution de l'ensemble des signaux intacts de la matrice et de l'analyte. Si l'intensité du signal protoné de la bradykinine diminue, la diminution de ce signal est cependant très nettement inférieure à celle des ions de matrice et ne semble pas s'accompagner d'un élargissement du signal. On peut aussi remarquer dans les spectres l'accroissement de signaux de basse masse dans la gamme de m/z 50-60, qui pourraient être des signaux résiduels des processus de fragmentations.

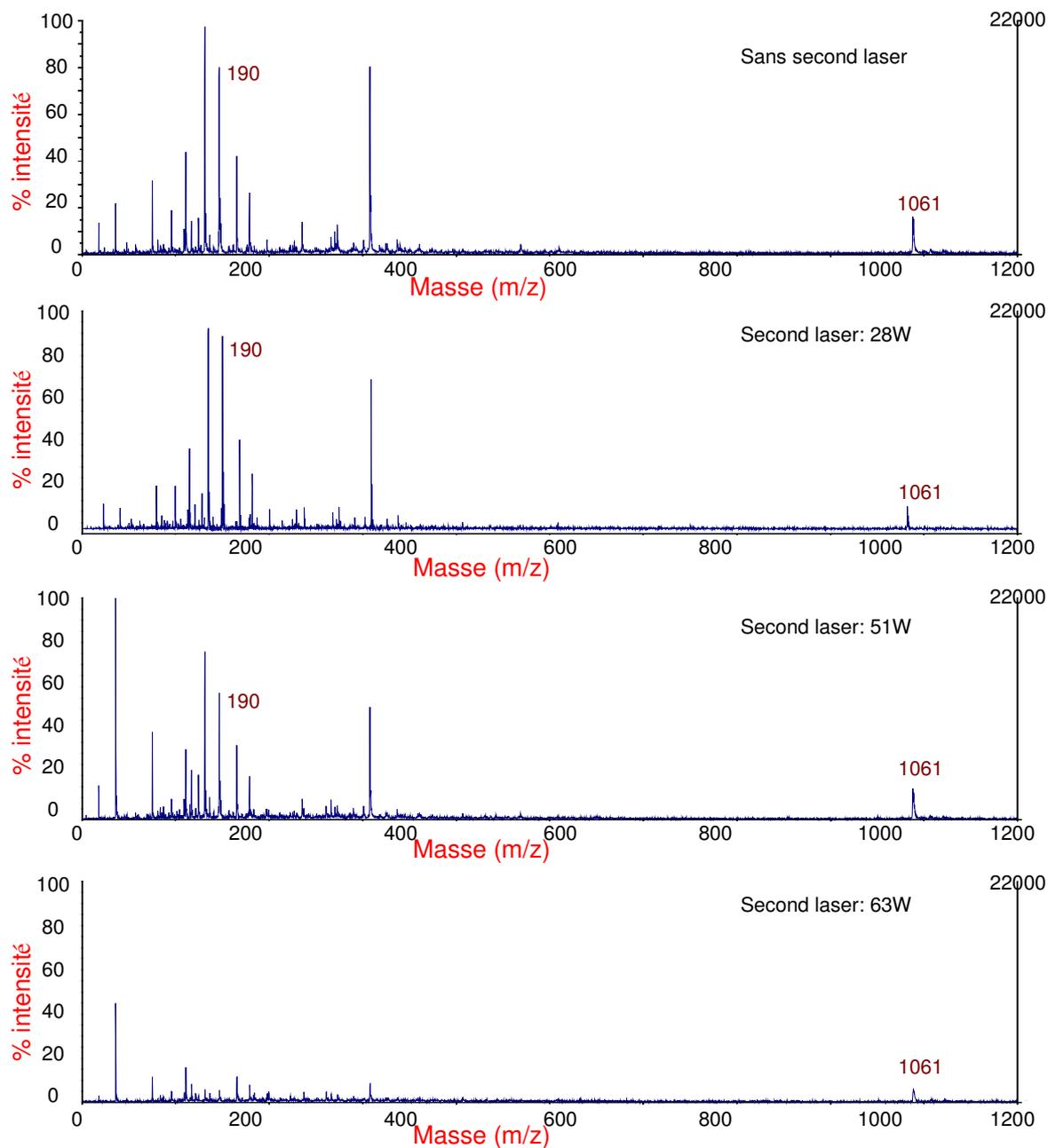


Figure III.8 : Spectres de masse obtenus en mode linéaire pour une puissance du premier laser de $2,3 \mu\text{J/pulse}$ et différentes puissances du second laser.

La figure III.9 reporte l'évolution de l'intensité des signaux de la matrice à m/z 190 et 379 (ions $[\text{HCCA}+\text{H}]^+$ et $[2\text{HCCA}+\text{H}]^+$) ainsi que celle de l'ion protoné de l'analyte à m/z 1061 ($(\text{M}+\text{H})^+$) en fonction de la puissance du second laser. Sur ce graphe, les intensités des signaux relevés sur les spectres ont été normalisées par rapport à l'intensité du signal le plus intense.

Développement et caractérisation de techniques pour l'amélioration de la sensibilité et de la résolution spatiale des sources MALDI : Désolvatation laser et masques.

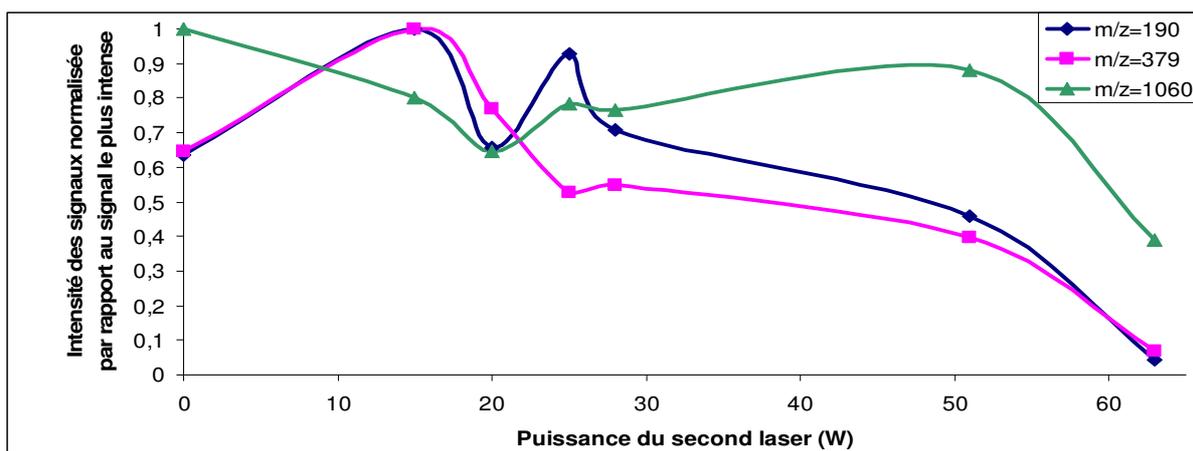


Figure III.9 : Évolution de l'intensité relative des signaux des ions de la matrice à m/z 190 et 379 et de l'analyte à m/z 1061 normalisée par rapport au signal le plus intense en fonction de la puissance du second laser (Laser fibré continu YLR).

Ces mesures confirment la tendance générale observée sur les spectres. Une diminution brutale et similaire de l'intensité des signaux du monomère et du dimère de la matrice est observée, jusqu'à 70% entre les analyses sans second laser et celles réalisées avec la plus haute puissance testée. Si contrairement à l'effet recherché, l'intensité de l'analyte diminue également, la tendance est beaucoup moins marquée que pour les autres signaux (jusqu'à 30% seulement de diminution à la puissance la plus élevée).

Ainsi, la matrice, toujours largement majoritaire dans la plume (sous forme moléculaire ou regroupée en agrégat), continue à jouer un rôle tampon qui limite la fragmentation des autres composés, mais à ce stade, aucun accroissement en intensité du signal d'analyte n'est constaté ici : dans l'hypothèse où un effet de désolvatation est initié, il est partiellement occulté par les processus de fragmentation massivement déclenchés lors de l'interaction avec le laser continu.

Ni le bruit de fond, ni la largeur des signaux ne varient de manière marquée dans les spectres de masses à mesure que la puissance du second laser augmente. Ceci semble montrer une absence d'augmentation des fragmentations métastables pendant nos analyses, mais pose aussi la question du devenir des charges qui contribuent aux signaux. En effets, l'absence d'apparition massive de signaux de fragments aux basses masses ou de variation du bruit de fond en présence du second laser semblent indiquer que ces composés ne sont plus pris en compte lors de l'analyse. Des manipulations supplémentaires seront nécessaires pour comprendre ce phénomène.

III.3.b Expériences de désolvatation par laser impulsionnel

La plume de désorption générée par MALDI évolue dans l'espace et le temps. Sa composition pouvant a priori évoluer également, l'effet du second laser sur l'analyse peut être différent s'il est déclenché à un moment ou à un autre de l'évolution de la plume. Cependant le diamètre du faisceau laser de désolvatation est de l'ordre du millimètre, ceci ne permet pas de sonder spatialement la plume avec une résolution suffisante. Nous nous sommes donc limités à l'observation de l'influence du second laser à différents instants de son développement et pour différentes énergies de ce second laser dans des conditions d'analyse MALDI classiques réalisées en mode linéaire.

III.3.b.a Effet du délai de synchronisation entre le laser MALDI et le laser de désolvatation

La figure III.10 présente l'évolution de l'intensité du signal $[M+H]^+$ de la bradykinine en fonction du délai entre le déclenchement des deux lasers.

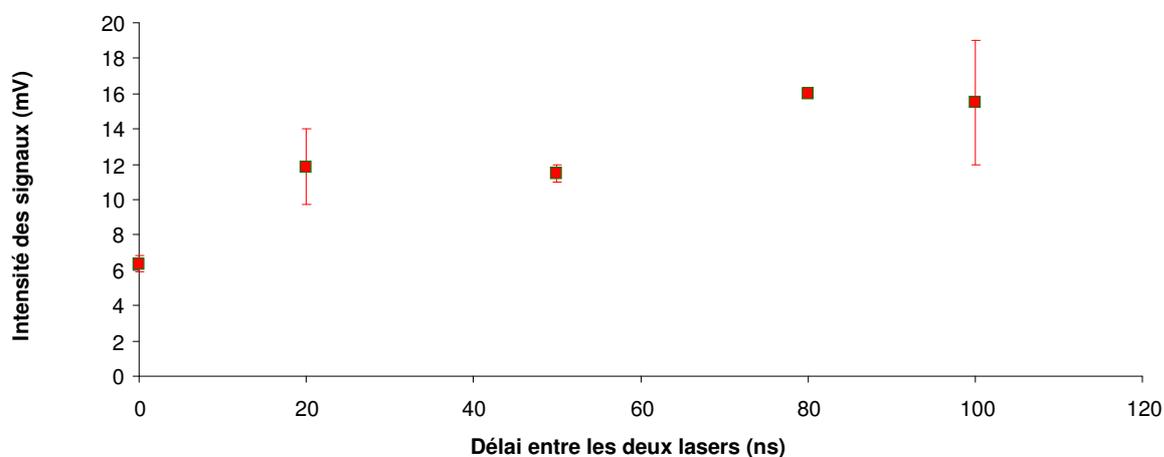


Figure III.10 : Évolution de l'intensité du signal d'analyte en fonction du délai fixé entre les deux lasers. L'énergie du faisceau laser de désolvatation est fixée à 10 mJ/pulse.

Une augmentation nette de l'intensité de l'ion d'analyte est mise en évidence à partir de 20 ns. Cette évolution semble démontrer l'existence d'une interaction entre le faisceau du second laser et la plume en expansion avec un effet bénéfique sur l'évolution du signal d'analyte. Cependant, compte-tenu de la difficulté liée à la réalisation du montage expérimental sur l'instrument utilisé (faisceau laser non parallèle au porte échantillon) il est

difficile d'apprécier dans quelle partie de la plume en expansion l'interaction se réalise. Si on reprend pour base de calcul une vitesse initiale d'environ 500 m/s et sans tenir compte du temps nécessaire pour que la vitesse initiale soit établie, à 20 ns il est possible d'estimer que la partie la plus dense de la plume se situera seulement à 20 μm de la surface. Ainsi, il semblerait que l'interaction se fasse plus à l'avant de la plume. On pourrait donc s'attendre à ce que les signaux d'analyte augmentent encore pour des temps plus longs, ce qui est effectivement observé dans les spectres enregistrés à des délais de 80 et 100 ns. Cependant, l'effet n'est pas suffisamment prononcé pour aller plus avant dans ces hypothèses.

L'évolution des signaux $[m+H]^+$ et $[2m+H]^+$ de la matrice tranche nettement avec celui de la bradykinine (Voir figure III.11). En effet, dans le cas de la matrice l'intensité du signal ne semble fluctuer que légèrement sur la plage de délais étudiée (ou en l'absence de tir du second laser), et les faibles variations observées ne permettent pas dans ce cas de conclure à un quelconque effet. Il faut remarquer un comportement très similaire pour les deux ions liés à la matrice.

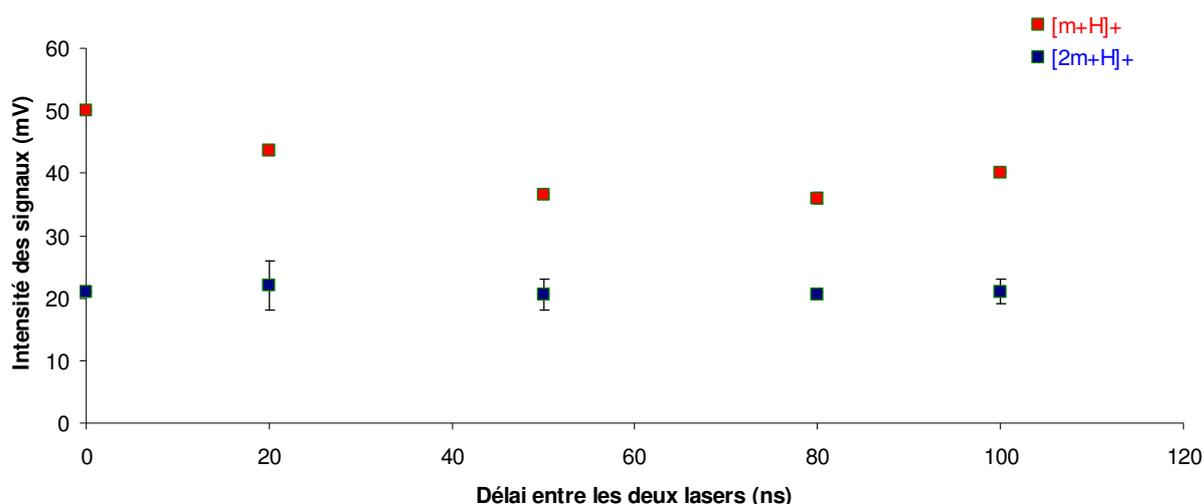


Figure III.11: Évolution de l'intensité des signaux $[m+H]^+$ (m/z 190) et $[2m+H]^+$ (m/z 379) de la matrice HCCA en fonction du délai fixé entre les deux lasers. L'énergie du faisceau laser de désolvatation est fixée à 10 mJ/pulse.

La comparaison de ces deux études permet donc de vérifier simultanément que la plume se développe suffisamment sur la gamme de temps choisie pour interagir efficacement avec le second laser et que cette interaction n'affecte pas l'analyte et la matrice de la même façon : gain en sensibilité pour le premier, aucun effet global pour le second.

III.3.b.β Effet de l'énergie du second faisceau laser

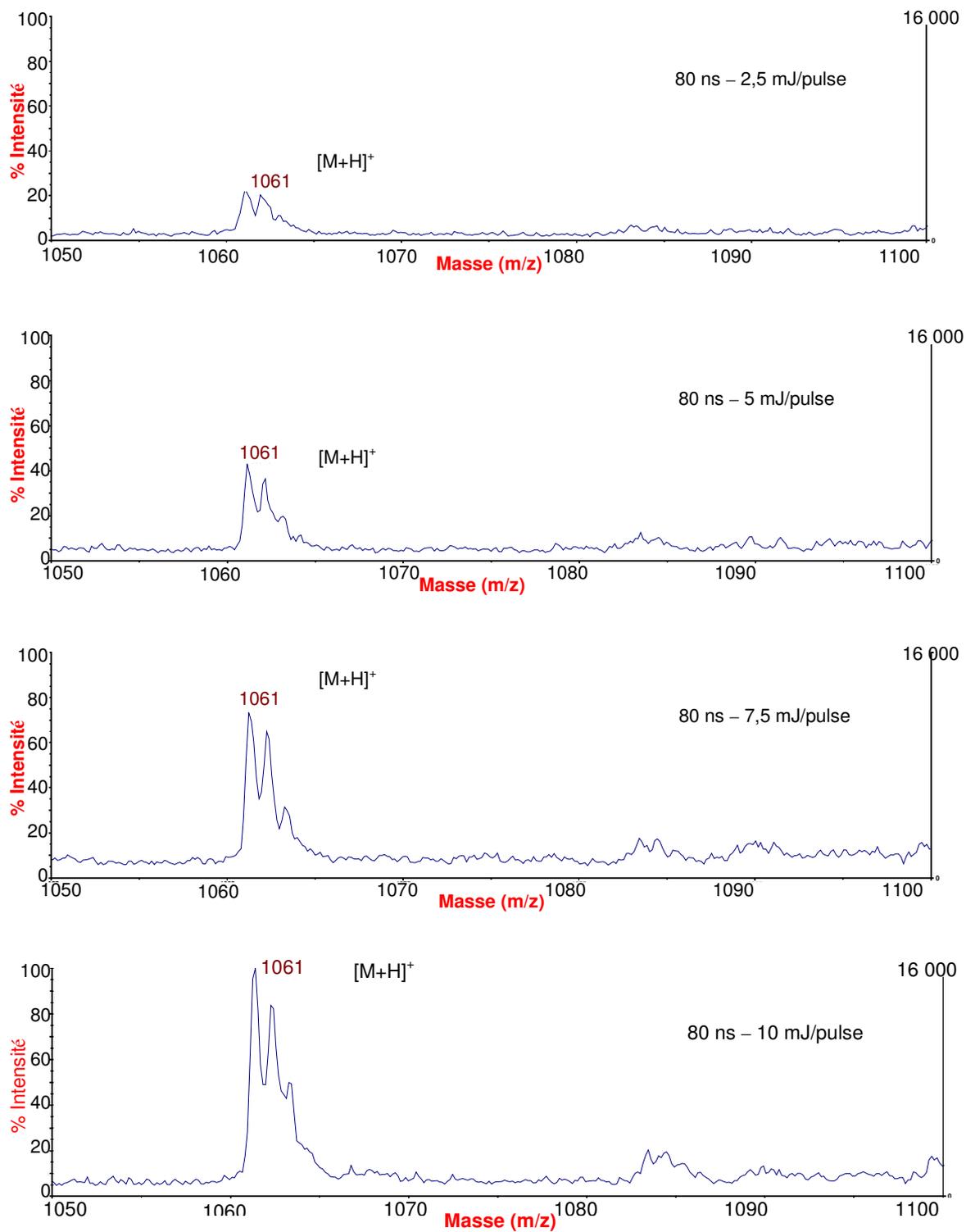


Figure III.12 : Spectres de masse obtenus pour un délai de 80 ns entre les deux lasers et pour plusieurs énergies du second laser.

Développement et caractérisation de techniques pour l'amélioration de la sensibilité et de la résolution spatiale des sources MALDI : Désolvatation laser et masques.

Pour aller plus avant dans la compréhension des phénomènes observés, l'effet de l'énergie du second laser a été étudié pour différents délais entre les deux lasers.

La figure III.12 présente l'évolution du signal $[M+H]^+$ de la bradykinine dans les spectres de masse pour quatre énergies lasers et pour un délai de 80 ns entre les deux lasers. Ces spectres mettent en évidence une augmentation régulière de l'intensité de cet ion jusqu'à 10 mJ/pulse, énergie la plus élevée utilisée dans cette étude. Il faut noter que l'augmentation de l'intensité des signaux ne s'accompagne pas d'une détérioration de la résolution, ce qui tendrait à démontrer l'absence de fragmentations métastables dans la zone libre de champ de ces ions, comme observé avec le laser continu.

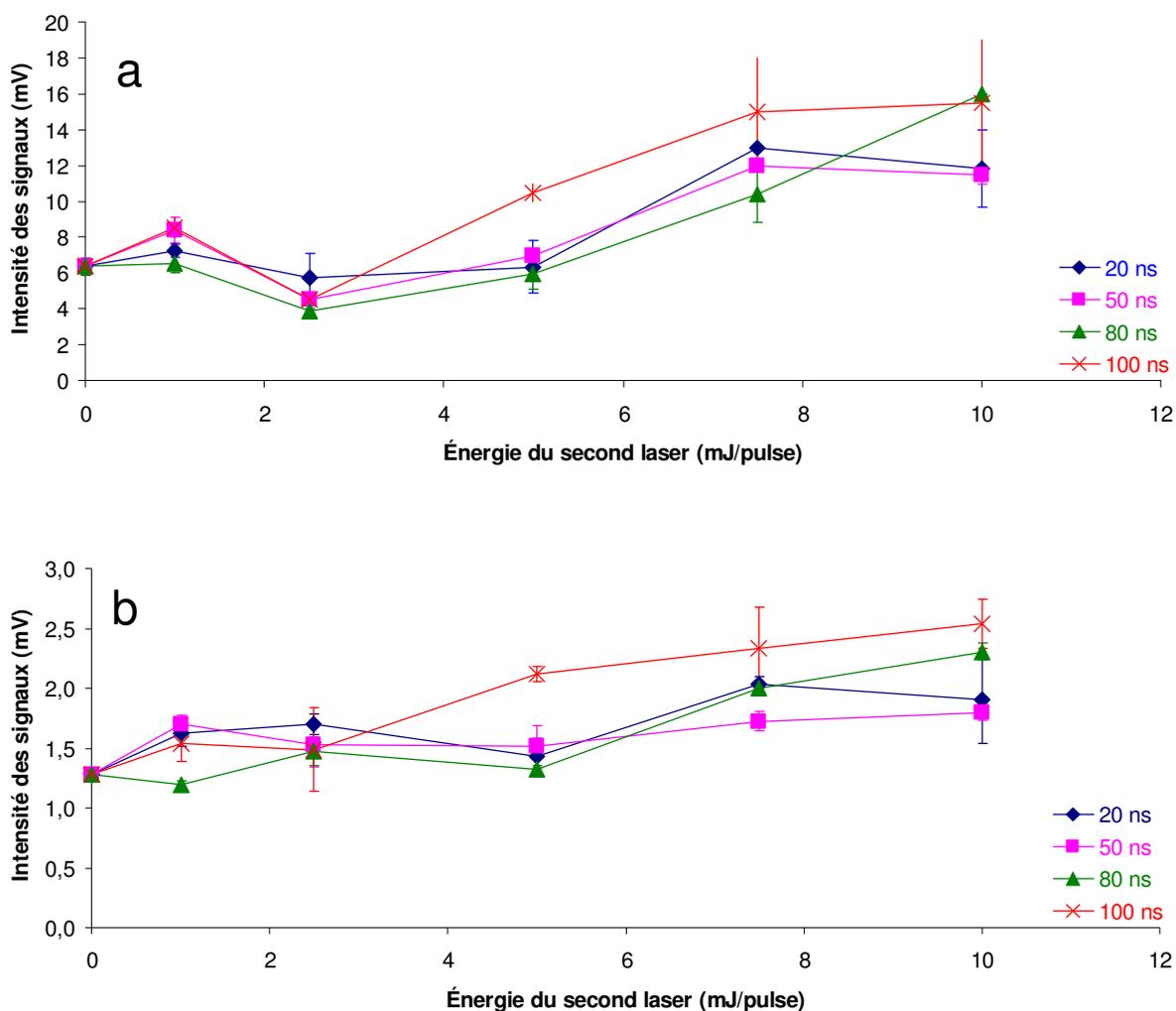


Figure III.13 : Évolution de l'intensité des signaux d'analytes (a : bradykinine protonée à m/z 1061 ; b : ACTH 18-39 à m/z 2466) en fonction de l'énergie du second laser et pour plusieurs délais entre les deux lasers.

Les intensités moyennes du signal d'analyte à différentes énergies et délais sont reportées sur la figure III.13. Si une dépendance en délais est toujours difficile à mettre en évidence (les courbes se superposent approximativement), le gain en sensibilité est confirmé puisque l'intensité augmente régulièrement jusqu'à être multipliée par un facteur 2-3 à 10 mJ/pulse par rapport au pic obtenu à énergie nulle, c'est-à-dire en l'absence de la seconde impulsion laser.

Une tendance similaire est observée pour l'évolution de l'ion $[M+H]^+$ d'un peptide standard de poids moléculaire plus élevé, l'ACTH 18-39 (Mw ~2466) comme le montre la figure III.13.b. Tout comme pour la bradykinine l'augmentation d'intensité est maximale pour un délai de 80 ns entre les deux lasers à 10 mJ/pulse avec un facteur d'augmentation d'intensité d'environ 2.

A l'opposé, aucune tendance nette ne semble à nouveau se dégager dans le cas de la matrice comme montré pour l'évolution de l'ion $[m+H]^+$ (Voir figure III.14). Il convient néanmoins de souligner qu'en dépit du faible nombre d'énergies testées et des fluctuations dans l'intensité des pics en fonction de l'énergie, les signaux de matrice obtenus sans le second laser restent toujours plus intenses que lors de son utilisation et il semble qu'un minimum soit observé avant une ré-augmentation des signaux..

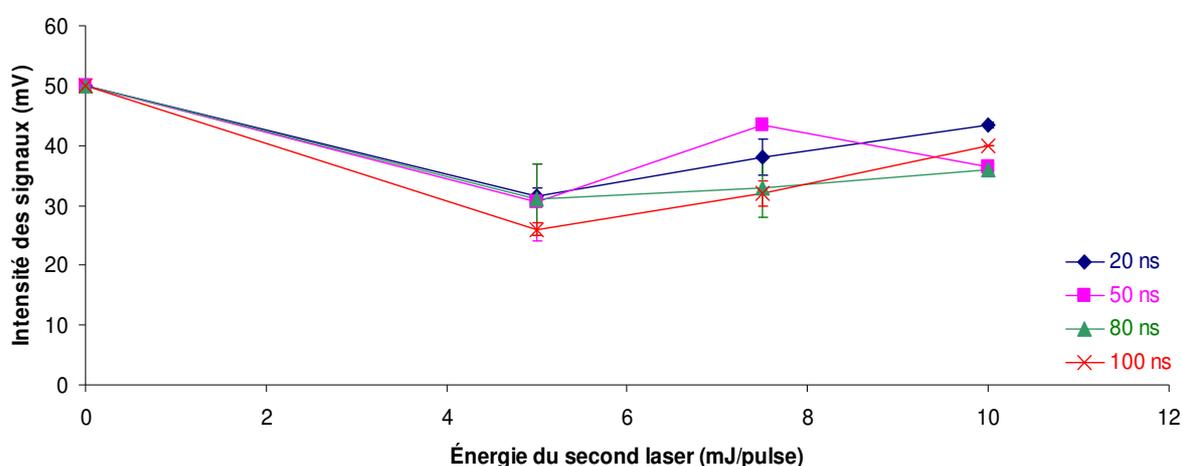


Figure III.14 : Évolution de l'intensité des signaux de matrice protonée (m/z 190) en fonction de l'énergie du second laser et pour plusieurs délais entre les deux lasers.

La plupart des observations réalisées dans les expériences avec le laser pulsé sont compatibles avec le processus de désolvatation des agrégats que nous cherchons à provoquer

avant leur passage dans la zone d'accélération. L'effet augmenterait pour des énergies au-dessus de 5 mJ/pulse avec un effet plus prononcé à 10 mJ/pulse, valeur la plus importante testée dans cette série de mesures. Une augmentation d'un facteur 2 à 3 est systématiquement observée pour l'intensité des signaux d'analytes étudiés à cette énergie. Contrairement aux expériences réalisées avec le laser continu, les processus de fragmentation semblent faibles pour les analytes. Ainsi la largeur des signaux relevés n'augmente pas lors de l'utilisation du second laser jusqu'à 10 mJ/pulse ce qui pourrait signifier l'absence de fragmentation métastable. D'autre part aucune augmentation importante de l'intensité d'ion(s) de masse inférieure à l'analyte ni d'apparition de nouveaux ions fragments ne sont observés dans les spectres ce qui semble également exclure des processus importants de fragmentations rapides se produisant pendant la période de temps de retard. Concernant l'évolution avec l'énergie du second laser du signal correspondant à l'ion $[m+H]^+$ de la matrice, nous avons systématiquement observé une légère diminution à faible énergie. Celle-ci pourrait être associée à des processus de fragmentation d'une petite proportion des ions de matrice. En revanche, à des énergies plus élevées et pour lesquelles une augmentation du signal d'analyte est observée, le signal de matrice augmente également légèrement. Cette évolution (qui demande à être confirmée au vu de la faiblesse de l'effet) s'inscrit aussi dans un modèle de désolvatation qui libère des analytes libres mais également des ions de matrice. Ainsi, la désolvatation compenserait progressivement la diminution du signal liée à la fragmentation de la matrice.

Les différents effets de ce second laser sur la matrice et l'analyte observé lors de ces analyses pourraient aussi s'expliquer pour partie par la position de ces composés à l'intérieur de la plume. En effet, alors qu'il semblerait que la plume se compose essentiellement de matrice en périphérie, les analytes se situeraient plus à l'intérieur [A.A.Puretzky/1999], ce qui pourrait entraîner une action différente du second laser sur ces composés. Ainsi, alors que la matrice reçoit le faisceau laser brut, ce qui pourrait, selon l'énergie du laser, favoriser sa fragmentation, l'analyte reçoit seulement une partie de cette énergie initiale, de plus en plus absorbée à mesure que le faisceau pénètre dans la plume. Ceci pourrait permettre de limiter dans une certaine mesure les processus de fragmentation au profit de ceux de désolvatation.

Dernière hypothèse possible, liée au plus grand nombre de degrés de liberté des molécules d'analytes par rapport aux molécules de matrice. Ceci favoriserait la relaxation énergétique pour ces premières, ce qui les rendrait moins sensibles aux phénomènes de fragmentation.

Dans ce même modèle de désolvatation, nous nous attendions à observer une diminution du bruit de fond. Les mesures réalisées sur les spectres dans la gamme m/z 500-4000 ne démontrent pas d'évolution particulière de ce bruit de fond. Cependant, si le processus de désolvatation augmente dans nos expériences, il est probable que ce processus soit loin d'être total pour tous les agrégats. On peut supposer que certains donnent naissance à des agrégats de taille plus faible mais non à des molécules libres. Ainsi les variations de bruit de fond pourraient être observables sur une gamme de m/z plus élevée que celle enregistrée dans nos spectres.

III.4 Conclusions et perspectives

Les résultats de ces manipulations (entamées sans a priori sur les caractéristiques du laser à utiliser en terme de longueur d'onde, de puissance ou de durée de pulse) ont permis de montrer que l'utilisation d'un second laser qui irradie la plume de désorption générée par MALDI avait bien un effet sur l'intensité des signaux d'analyte présents dans les spectres de masse. La comparaison entre l'évolution des pics d'analyte et de matrice semble indiquer un phénomène de compétition entre les mécanismes de désolvatation des agrégats et de fragmentation de ses composants dont le contrôle pourrait être assuré par l'énergie amenée par le second laser : la désolvatation compenserait la fragmentation des analytes, ce qui donnerait lieu à un gain en terme de sensibilité de la technique dans une certaine gamme d'énergie accessible avec le laser pulsé. En revanche, en dehors de cette plage, la fragmentation des analytes prendrait le dessus sur les mécanismes de désolvatation et conduirait à une diminution de l'intensité des signaux de ces composés dans les spectres de masse.

Ce scénario ne pourra être confirmé qu'en augmentant la gamme d'énergie testée, aussi bien avec le laser impulsionnel qu'avec le laser continu. Il conviendra également de tester l'effet de désolvatation sur des analytes plus lourds tels que des protéines (Par exemple la Bovine Serum Albumin (BSA)) pour lesquels il faut s'attendre à des effets plus importants. L'observation de l'effet de la variation de certains paramètres d'analyse tels que l'énergie d'ablation ou le temps de retard pourra aussi nous permettre de vérifier l'action du second

laser sur des plumes plus ou moins denses ou développées et donc d'agir plus ou moins efficacement sur la désolvation des agrégats.

Ces résultats préliminaires n'en demeurent pas moins très encourageants et semblent démontrer la possibilité d'utiliser de tels processus pour augmenter la sensibilité en MALDI.

Outre l'augmentation de la gamme d'énergie testée et l'utilisation d'analytes plus lourds, d'autres manipulations pourraient être réalisées afin d'amplifier les phénomènes observés ou d'en améliorer la compréhension. Ces manipulations sont listées dans les paragraphes suivants.

III.4.a Utilisation de longueurs d'ondes spécifiques

III.4.a.a Lasers résonnants avec des fonctions chimiques spécifiques

De manière générale, la désolvation nécessite un transfert d'énergie du laser vers les agrégats irradiés. Ce transfert est d'autant plus efficace que les agrégats (ou la matrice) possèdent une bande d'absorption qui coïncide avec la longueur d'onde du laser employé. Les expériences décrites aux paragraphes précédents ont été menées avec des lasers qui ne répondent pas à ce critère. La désolvation est alors réalisée via des processus purement thermiques dont le rendement est directement lié aux énergies des lasers utilisés.

Un prolongement naturel de ces travaux consisterait à reproduire ces expériences avec des lasers plus adaptés grâce à certaines sources disponibles au laboratoire. C'est le cas des OPO accordables dans la région des $3\mu\text{m}$ qui permettent d'accéder à des bandes de vibration intenses - le stretching N-H (autour de $2.9\mu\text{m}$), O-H (autour de $3\mu\text{m}$) et C-H ($3,3\mu\text{m}$) et qui ont permis de démontrer la possibilité de réaliser la désorption résonnante d'échantillons organiques [M.Ziskind/2004]. L'excitation d'autres modes pourrait également présenter un intérêt certain (C-C et C=O par exemple). Enfin, une excitation de transitions électroniques $\pi \rightarrow \pi^*$ et $\sigma \rightarrow \sigma^*$, rendu possible grâce aux lasers UV également disponibles au laboratoire est envisagée.

III.4.a.β Désolvation d'agrégats métastables analyte-eau

D'autres types de matrice pourraient se prêter plus aisément à l'étude du phénomène de désolvation. C'est notamment le cas de la glace qui possède précisément une bande d'absorption intense en coïncidence avec le mode de vibration O-H à $3\mu\text{m}$. Cette même longueur d'onde s'avère d'ailleurs particulièrement adaptée pour générer des agrégats hydratés de molécules d'intérêt biologique lors de l'irradiation d'échantillons gelés selon une technique proche de la MALDI-IR (Voir figure III.15) [M.Ziskind/2004]. Le même type de source laser serait alors utilisée à la fois pour générer les agrégats et les désolventer. D'autre part, ces agrégats métastables donnent lieu à des signaux bien définis dans les spectres de masse. L'étude de leur désolvation en serait plus aisée puisqu'on pourrait suivre directement leur évolution dans les spectres, puis la corrélérer avec celles des signaux d'analytes et de l'eau. Cependant ces expériences nécessitent de disposer d'une source qui est refroidie et ne pourront être réalisées sur le spectromètre commercial utilisé dans ces études. Par contre, la modification du dispositif expérimental monté au sein de l'équipe ANATRAC pourrait permettre de réaliser ces expériences.

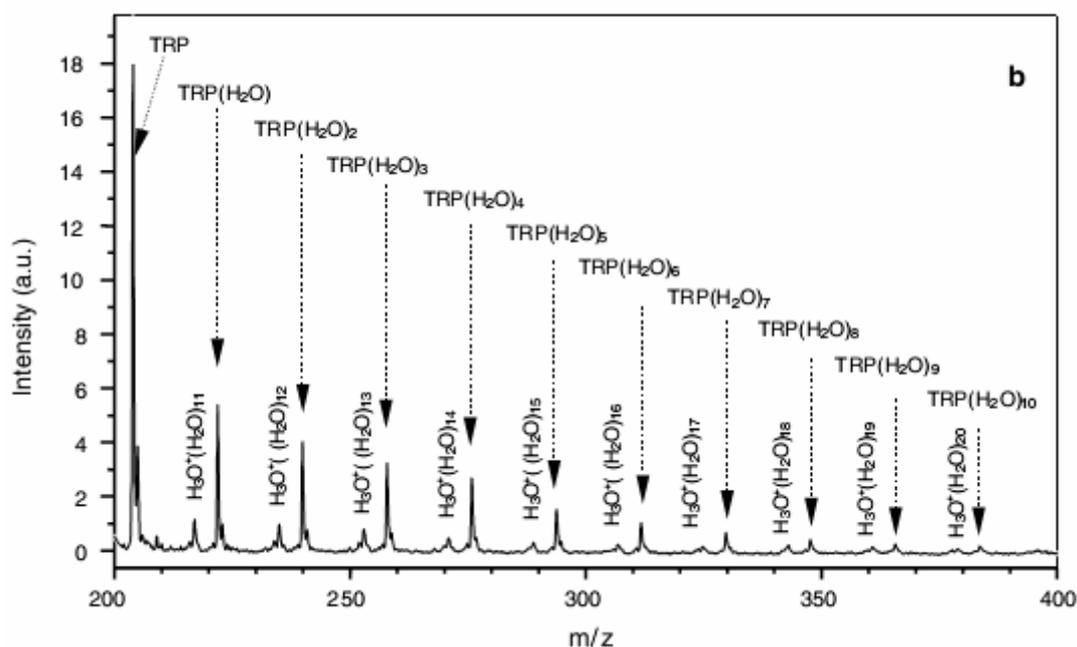


Figure III.15 : Mise en évidence d'agrégats de tryptophane hydraté obtenus par désorption résonnante (IR-OPO) d'une solution de tryptophane-eau gelée [M.Ziskind/2004].

III.4.b

Irradiation résolue spatialement de la plume

Suite à l'irradiation laser, la plume de désorption évolue spatialement et temporellement et l'étude de la dynamique de la plume serait d'un grand apport pour ces expériences en permettant de déterminer le temps et la position a priori optimum du second faisceau laser. En effet, selon la nature de l'échantillon et certains paramètres d'irradiation, la dynamique de plume est différente et peut impacter sur l'efficacité de son interception par le laser de désolvation. Ainsi, comme nous l'avons vu dans le paragraphe III.3.b.α, la variation du délai va avoir une influence sur la sensibilité de l'analyse. Cependant, si différents travaux ont présenté des images de la plume en expansion par imagerie L.I. F. (Voir figure III.16) [A.A.Puretzky/1999] ou par imagerie résolue en temps [A.Leisner/2005] les conditions pour lesquelles sont réalisées ces expériences sont éloignées des conditions habituelles d'expérimentations MALDI en analyses conventionnelles que ce soit en terme de longueur d'onde, de durée de pulse laser ou de fluence voir de matrice utilisée. Il apparaît donc intéressant de pouvoir réaliser des images L.I.F. de la plume dans nos conditions d'expériences.

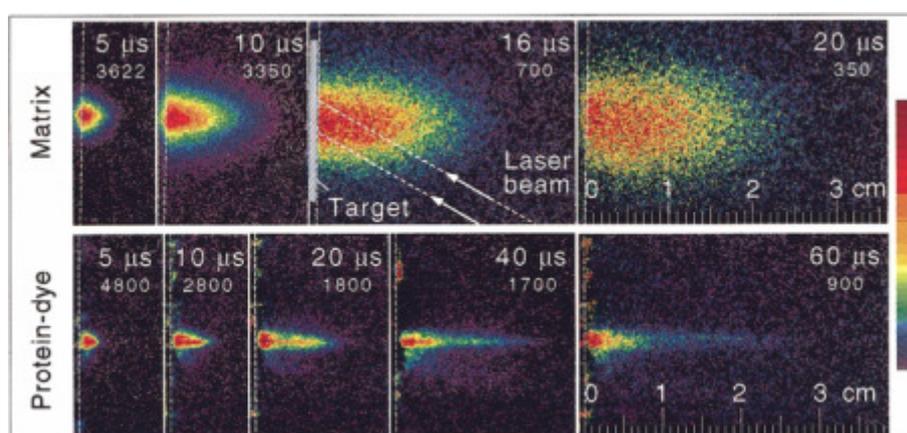


Figure III.16 : Imagerie LIF d'une plume de désorption obtenue à partir d'un échantillon de matrice 3-HPA et d'analyte Dnase I marqué au tétraméthylrhodamine [A.A.Puretzky/1999].

Ainsi, dans le cadre de nos expériences de désolvation, l'irradiation de certaines zones spécifiques de la plume par le second laser sous forme d'une nappe laser de très faible épaisseur pourrait nous permettre d'optimiser l'efficacité de nos analyses. De plus, leur réalisation pourrait nous renseigner sur la composition de la plume au niveau des zones irradiées à travers l'observation des variations des signaux présents sur les spectres.

Chapitre IV :

Utilisation de masques de silicium en spectrométrie de masse MALDI

La résolution spatiale d'analyse des spectromètres de masse MALDI classiques est actuellement limitée à quelques dizaines de micromètres de diamètre. Le moyen le plus direct pour améliorer cette résolution est de réduire la zone irradiée en focalisant le faisceau laser sur la cible. Ceci s'accompagne néanmoins d'une diminution du rendement d'ions, beaucoup plus importante que prévue [K.Dreisewerd/1995 ; S.Guenther/2010]. Cet effet dont l'origine est encore mal comprise devient prépondérant dès que le diamètre du faisceau laser incident est inférieur à 30 μm , ce qui correspond à la fois aux dimensions typiques des cellules biologiques et à la résolution spatiale des meilleures sources MALDI, à l'exception de certaines nécessitant un appareillage spécifique et extrêmement coûteux [B.Spengler/2002 ; T.H.Mize/2004].

L'objectif premier des masques est de réduire la surface d'analyse selon un principe différent de la focalisation du faisceau laser, sans entraîner de modifications matérielles importantes pour le spectromètre. Le terme de masque renvoie à de fines lames de silicium (appelées communément « wafers ») dans lesquelles ont été gravées de nombreuses ouvertures de dimensions et de formes identiques et régulièrement espacées. Le silicium utilisé pour les wafers n'étant pas transparent à la longueur d'onde du laser employé, seule la partie de l'échantillon située en face de l'ouverture sera efficacement irradiée. La réduction de la zone de l'échantillon analysée sera donc obtenue en coupant une partie du faisceau laser.

Les ouvertures réalisées dans les masques de nos expériences sont de forme carrée, de 60 μm d'épaisseur et de quelques dizaines à quelques centaines de micromètres de côté. La figure IV.1 montre ces ouvertures vues à travers un microscope électronique :

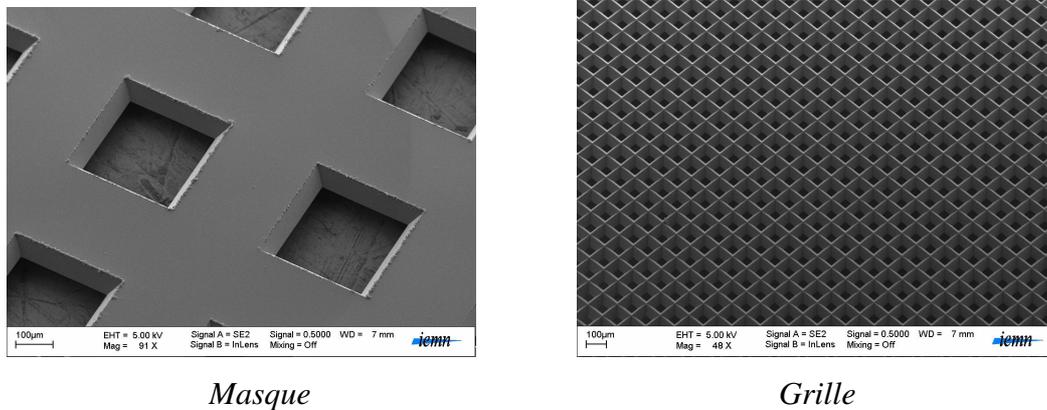


Figure IV.1 : Images d'ouvertures observées au microscope électronique à balayage.

On distinguera par la suite les masques pour lesquels les ouvertures seront suffisamment espacées les unes des autres pour supposer que chacune soit irradiée individuellement, des grilles pour lesquelles plusieurs ouvertures seront irradiées simultanément. Nous désignerons les masques et les grilles par les lettres « M » et « G » respectivement suivies d'un nombre désignant les dimensions du côté de l'ouverture en micromètre. Par exemple, « M50 » désignera un masque muni d'ouvertures de 50 micromètres de côté.

Comme il sera montré par la suite, les masques permettront non seulement de réduire les dimensions de la zone irradiée, mais aussi pour certaines configurations d'améliorer la sensibilité. Dans le cas des grilles, le gain en résolution spatiale sera nul mais l'effet sur la sensibilité sera en principe démultiplié.

IV.1 Réalisation et intégration des masques dans le spectromètre

Pour développer ce système de masques, nous avons dû faire appel à des techniques de gravure nécessitant une précision de fabrication de l'ordre du micromètre. Pour ce faire, une collaboration locale a été initiée avec le Dr. Anthony TREIZEBRE de l'équipe de recherche du Pr. Bertrand BOCQUET à l'I.E.M.N. (Institut d'Electronique, de Microélectronique et de

Nanotechnologie, UMR CNRS 8520, Université Lille 1) qui possède le savoir-faire nécessaire à la gravure de wafer de silicium.

IV.1.a Fabrication des masques

Deux techniques ont été utilisées: les gravures chimique et plasma. Leur utilisation va permettre d'obtenir des ouvertures avec des inclinaisons de flancs différentes. Ainsi, la gravure plasma nous permettra de réaliser des ouvertures à flancs droits, tandis que la gravure chimique sera adaptée à la réalisation d'ouvertures à flancs inclinés. Dans les deux cas, la limite de résistance mécanique du silicium est de l'ordre de quelques dizaines de micromètres, ainsi, les masques utilisés dans les manipulations présentées dans ce chapitre ont une épaisseur de 60 μm .

IV.1.a.a Gravure plasma

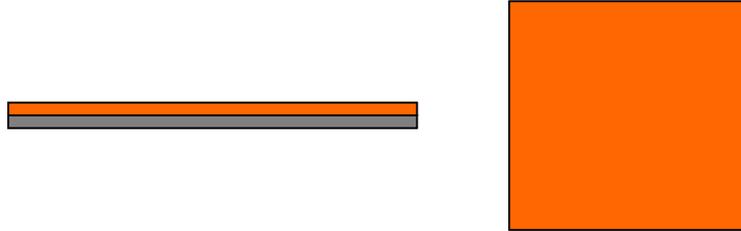
Cette technique consiste à graver une surface (ici le wafer de silicium) grâce à un flux de gaz ionisé à haute température.

Six étapes sont nécessaires pour réaliser la gravure plasma d'un masque (Voir figure IV.2) :

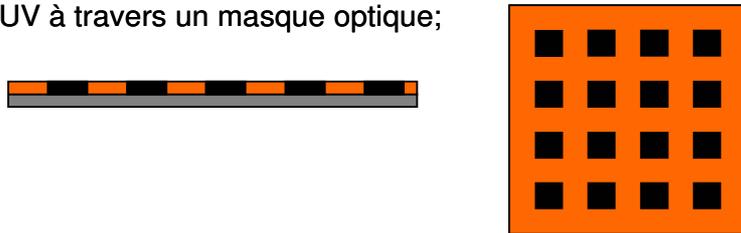
1. le wafer de silicium de 240 μm d'épaisseur est tout d'abord recouvert d'une couche de résine photosensible dont une certaine quantité est déposée au centre du wafer puis uniformisée par centrifugation ;
2. la face du wafer de silicium recouvert de résine est exposée à un rayonnement UV au travers d'un masque optique laissant passer ce rayonnement jusqu'au wafer grâce à des ouvertures fixes réalisées préalablement ;
3. l'application d'une solution de développement à l'ensemble afin de solubiliser les zones de résine précédemment insolée et nous permettre d'avoir accès au wafer de silicium à travers celles-ci ;
4. la gravure ICP-DRIE (Inductively Coupled Plasma-Deep Reactive Ion Etching) par procédé Bosch des zones du wafer de silicium non protégées par la résine, conduit à l'apparition des ouvertures dans le wafer de silicium ;

5. la gravure de l'autre face par ce même procédé permet de donner l'épaisseur souhaitée (pour une valeur limite de quelques dizaines de micromètres) aux ouvertures réalisées à l'étape précédente ;
6. le retrait de la couche de résine grâce à l'acétone.

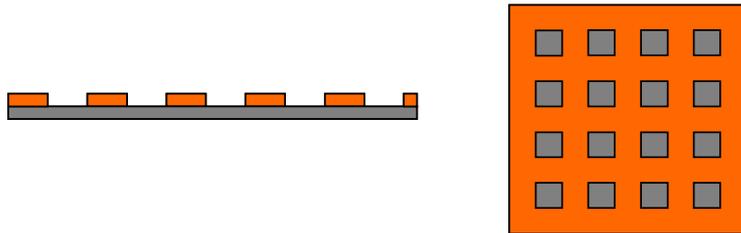
1 – Dépôt d'une couche de résine sur le wafer de silicium;



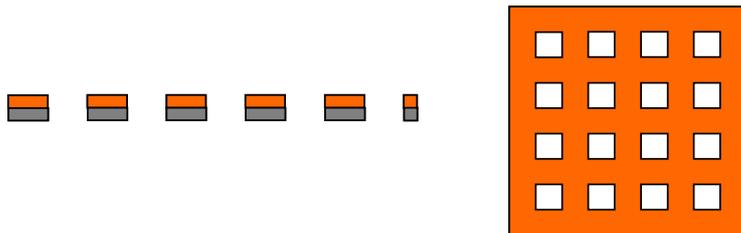
2 – Exposition de la couche de résine à un rayonnement UV à travers un masque optique;



3 – Développement;



4-5 – Gravure ICP-DRIE du wafer de silicium;



6 –Retrait de la résine avec l'acétone.

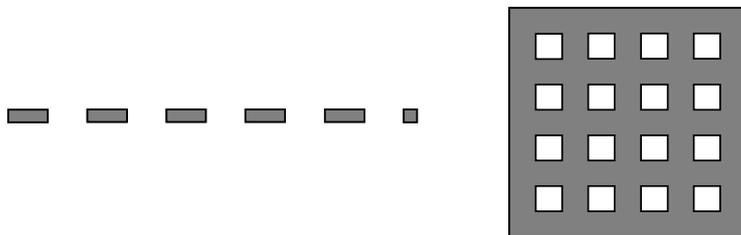


Figure IV.2 : Étapes de la fabrication des masques par gravure plasma.

Les wafers ainsi usinés sont porteurs de 9 masques encore solidaires les uns des autres, il ne reste donc plus qu'à découper délicatement au coupe-verre les différents masques de grande fragilité due à leur faible épaisseur.

IV.1.a.β Gravure chimique

Cette méthode de gravure consiste en une attaque chimique de la surface du wafer de silicium afin d'obtenir des flancs inclinés, puis d'une gravure plasma pour fixer son épaisseur. Les différentes étapes de réalisation de masques par gravure chimique sont les suivantes (Voir figure IV.3) :

1. l'attaque au fluorure d'hydrogène (HF) (1% de concentration) du wafer de silicium pour enlever l'oxyde natif ;
2. le dépôt de nitrure (Si_3N_4) sur les deux faces du wafer, sur l'une pour définir les motifs du masque via la couche de résine, sur l'autre pour protéger la face arrière lors de l'attaque chimique du silicium ;
3. le dépôt d'une couche de résine par centrifugation suivi de la recuite du wafer à 120°C pendant 60s ;
4. l'insolation de la face du wafer portant la résine à travers un masque portant des motifs circulaires réalisés préalablement afin de marquer les zones du wafer qui seront gravées, cette étape est suivie d'une recuite du wafer à 120°C pendant 60s ;
5. l'insolation pleine plaque (sans cache) du wafer pendant 60s, la résine étant réversible (elle passe de positive à négative), les zones du wafer précédemment insolées deviennent révélables par un révélateur basique, le MIF ;
6. la révélation au MIF pur pendant 20s puis un rinçage à l'eau pour le marquage des positions des futures ouvertures;
7. la gravure par ICP-DRIE du nitrure sur les zones du wafer ne portant plus de résine après l'insolation et la révélation ;
8. l'attaque dite « piranha » ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$) du wafer pour éliminer la résine ;
9. l'attaque humide de l'ensemble à l'hydroxyde de tétraméthylammonium (TMAH) est réalisée pour diminuer l'épaisseur de l'ensemble et pour réaliser les ouvertures dans le wafer ;

10. la gravure ICP-DRIE par procédé Bosch des deux faces du wafer pour éliminer la couche de nitrure restante puis pour obtenir l'épaisseur désirée du masque et l'obtention des ouvertures dans le wafer.

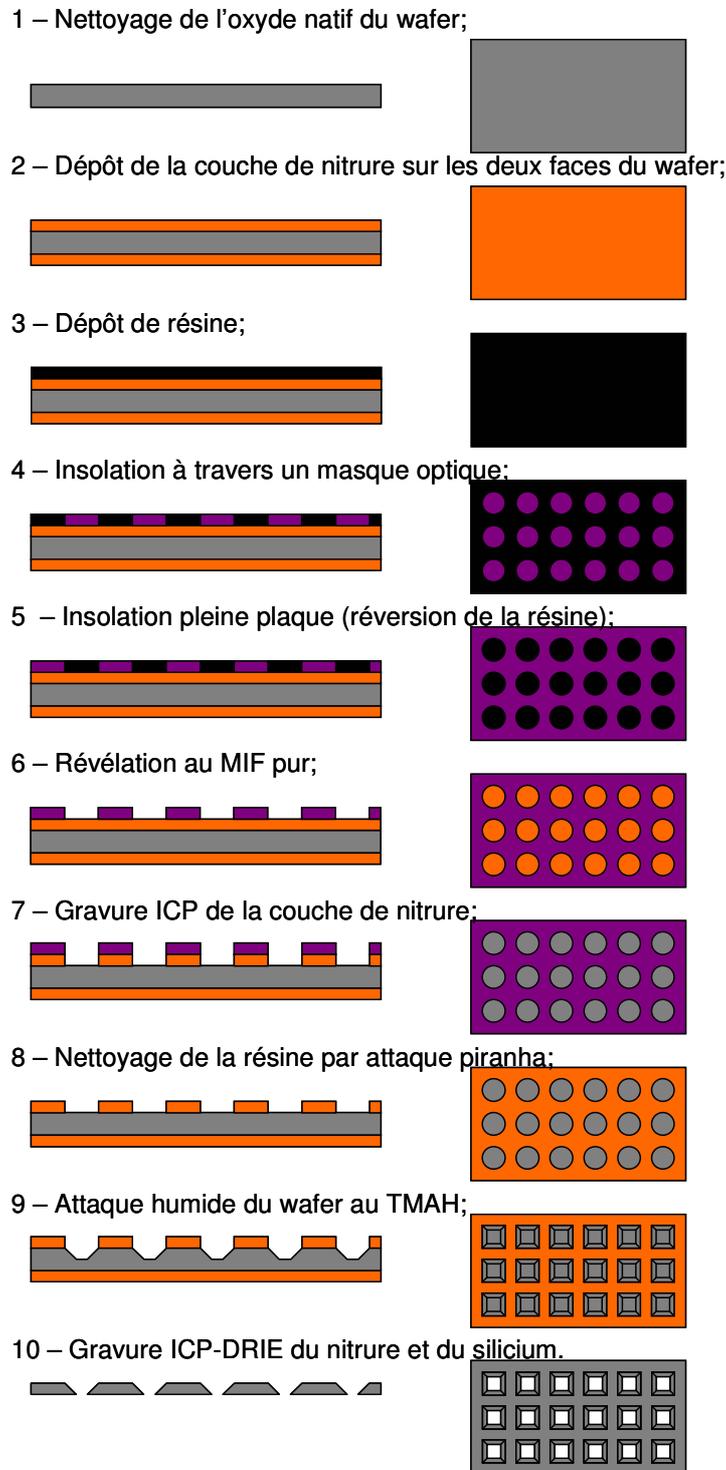


Figure IV.3 : Étape de fabrication des masques par gravure chimique.

La dernière étape de cette fabrication sera ici aussi la découpe des masques dans le wafer de silicium à l'aide d'un coupe-verre.

Les masques obtenus par cette technique ont des parois inclinées de 50° par rapport à la face inférieure du masque.

Lors des analyses faites pour comparer les effets de ces deux types de forme d'ouverture, seules celles à flancs droits ont montré un effet positif sur la sensibilité de la technique tandis que les ouvertures à flancs inclinés n'ont que rarement permis d'obtenir des signaux assez intenses pour être exploitables. Les manipulations se sont donc limitées à l'étude des analyses faites avec des masques munis d'ouvertures à flancs droits. Cette importante différence dans le comportement de ces deux types de masques sera mise à profit pour étudier les mécanismes à l'origine des effets sur la sensibilité des analyses que nous rencontrerons dans la suite.

IV.1.b Utilisation des masques pour l'analyse MS

IV.1.b.a Maintien sur la plaque d'échantillonnage

La question de la fixation des masques sur la plaque d'échantillonnage s'est posée très tôt. Il s'agissait de trouver un système permettant de maintenir le masque en place sans qu'il ait la possibilité de bouger ni de perturber l'analyse de l'échantillon.

Nous avons opté pour un système de pression. Le masque est préalablement posé sur l'échantillon (dépôt MALDI conventionnel ou coupe de tissu biologique). Il est alors pris en tenaille entre le support d'échantillonnage (lame de verre-ITO) et une lame de laiton, rendus solidaires à l'aide de bandes de scotch conducteur double-face adapté au vide poussé, (Voir figure IV.4).

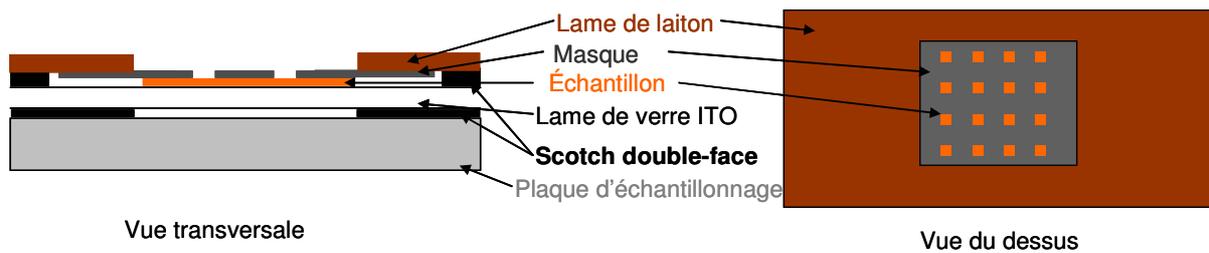


Figure IV.4 : Disposition des masques pour l'analyse MALDI MS.

L'ensemble est positionné à la verticale à l'intérieur de la source du spectromètre de masse. Une troisième bande de scotch conducteur est finalement placée en dessous du masque, entre la lame de laiton et la lame de verre, afin d'éviter la chute du masque dans la source.

Ce système de maintien bien que rudimentaire peut s'appliquer à n'importe quelle plaque d'échantillonnage ce qui permet de généraliser l'utilisation des masques à la plupart des types de source MALDI.

IV.1.b.β Ciblage et analyse de l'échantillon

Le masque étant placé sur le support d'analyse de façon à ce que les échantillons soient en face des ouvertures, l'irradiation de l'échantillon peut se faire aisément en ciblant ces ouvertures avec le spot laser. Cependant, il est parfois (voire souvent) nécessaire de repérer la position des dépôts au préalable.

En effet, les masques ayant une épaisseur non négligeable et l'observation de l'échantillon via la caméra du spectromètre étant réalisée à 45° de la surface de la plaque d'échantillonnage, il n'est plus possible de cibler visuellement les parties éclairées et irradiées de l'échantillon en dessous d'une certaine taille d'ouverture D du masque (Voir figure IV.5).

L'épaisseur du masque ne permet pas non plus de visualiser systématiquement la fluorescence de la matrice, notamment pour les ouvertures les plus petites.

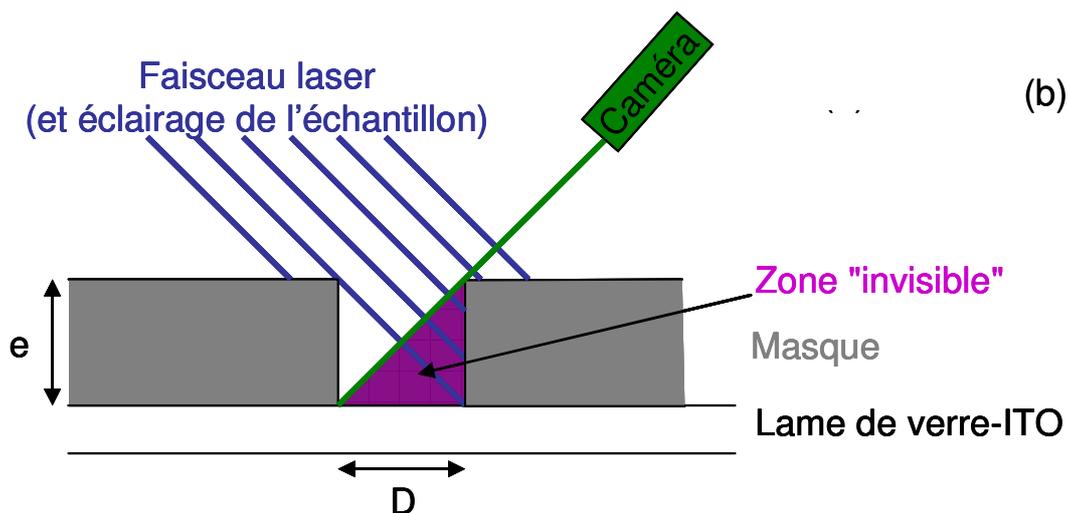


Figure IV.5 : Mise en évidence de la limite de visualisation de l'échantillon à travers une ouverture.

Le moyen le plus simple pour vérifier que l'échantillon est irradié par le laser à travers le masque est de suivre directement sur l'oscilloscope l'apparition (ou l'absence...) des signaux. Ceci permet de sélectionner les zones les plus propices à l'analyse. Notons que la plupart des ouvertures testées nécessitent de déplacer légèrement l'échantillon pour avoir un signal tout au long de l'acquisition, l'échantillon étant peu à peu consommé et le profil hétérogène du faisceau ne permettant pas l'obtention de signaux si l'ouverture n'est pas correctement ciblée.

Quand le ciblage d'une zone particulière d'analyse est souhaité (dans une coupe de tissu biologique par exemple), l'absence de visibilité de l'échantillon au travers des ouvertures du masque peut être contournée par le repérage des coordonnées de ciblage fournies par le logiciel d'acquisition du spectromètre de masse. Ces coordonnées varient très peu entre le retrait et l'introduction d'une même plaque d'échantillonnage.

IV.1.b.γ Paramètres d'acquisition

Les paramètres d'acquisition de spectre ont été choisis pour optimiser les signaux d'analytes en l'absence de masque et n'ont pas été modifiés lors de leur utilisation.

Les différentes configurations d'analyses utilisées pendant ces manipulations sont regroupées dans le tableau IV.1, chaque spectre résulte de l'irradiation de l'échantillon par 25 tirs laser.

Échantillon	Configuration					
	Énergie d'irradiation (µJ/pulse)	Gamme de masse (m/z)	Accélération (A) (V)	Grille (%A)	Guide d'ion (%A)	Temps de retard (ns)
Bradykinine	1,75	10 à 2 000	25 000	93	0,1	100
Insuline	3	10 à 6 500	25 000	87,5	0,2	100
Coupes	5	500 à 10 000	25 000	93	0,1	100

Tableau IV.1 : Paramètres d'analyse MALDI-TOF MS en mode linéaire avec extraction retardée.

IV.1.b.δ Phénomène de diffraction

Comme l'utilisation des masques en analyse consiste à faire passer un faisceau laser à travers une ouverture de taille réduite, il faut s'assurer que l'apparition d'un inévitable phénomène de diffraction ne modifie pas trop la forme du faisceau laser, ce qui compliquerait grandement l'analyse des données.

L'importance du phénomène de diffraction peut être estimée par le calcul du nombre de Fresnel N_F :

$$N_F = D^2 / \lambda \cdot e$$

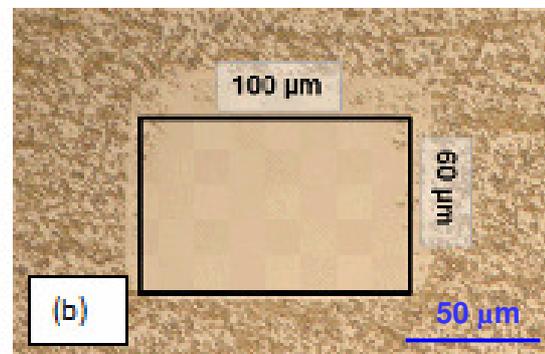
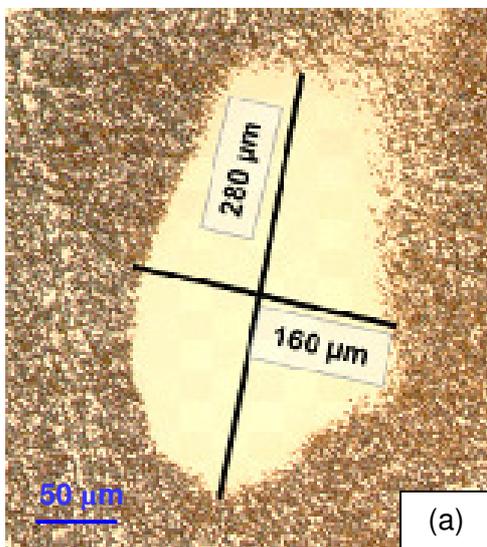
où D est une dimension typique de l'ouverture (ici le côté), λ la longueur d'onde du faisceau laser (337 nm), e la distance entre l'ouverture et la position où le faisceau est matérialisé (ici la surface de l'échantillon, e correspond alors à l'épaisseur du masque puisque celui-ci est en contact direct avec l'échantillon).

On considère habituellement que le phénomène de diffraction ne peut être négligé lorsque $N_F < 10$ (le cas où $N_F \ll 1$ correspondant à la diffraction de Fraunhofer, en champs lointain). Dans notre cas, N_F est toujours très supérieur à 10. Par conséquent, le faisceau laser pourra toujours être approximé par un faisceau quasiment homogène sur toute la section irradiée (profil top-hat).

IV.2 Effets des masques sur l'analyse MALDI

IV.2.a Résolution spatiale

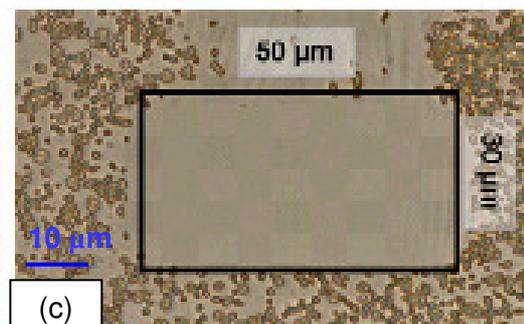
La figure IV.6 présente des clichés d'échantillons après leur irradiation à haute énergie en l'absence de masque (a) puis à travers des masques d'ouverture 100 (b), 50 (c) et 25 μm (d). Les zones ablatées sont respectivement environ 3, 20 et 100 fois plus petites que celle obtenue sans masque ($\sim 30\,000\ \mu\text{m}^2$). Toutefois, leurs formes sont rectangulaires plutôt que carrées, la largeur étant inférieure à celle attendue. Par exemple, le masque M50 conduit à une surface nettoyée d'environ $50 \times 30\ \mu\text{m}^2$.



Dimensions théoriques de la zone irradiée:
 $60 \times 100\ \mu\text{m}$



Dimensions théoriques de la zone irradiée:
 $0 \times 0\ \mu\text{m}$



Dimensions théoriques:
 $0 \times 0\ \mu\text{m}$

Figure IV.6 : Zones désorbées observées sur des échantillons sans masque (a) et à travers des masques de dimensions $e = 60\ \mu\text{m}$ et $D = 100\ \mu\text{m}$ (b), $50\ \mu\text{m}$ (c) et $25\ \mu\text{m}$ (d) de côté), le laser arrivant à 45° par rapport à la normale.

Cette différence est évidemment due à l'inclinaison du laser avec l'ensemble masque+cible, induisant l'émergence d'une zone d'ombre, région que le laser ne peut en principe pas irradier. Le laser qui équipe le spectromètre de masse arrivant avec un angle de 45° sur l'échantillon, la zone d'ombre projetée peut être aisément estimée en fonction des dimensions du masque par des considérations géométriques simples : 60 % pour M100, 100 % pour M50 et M25. Dans ces deux cas, la zone d'ombre est en principe aussi grande que les ouvertures.

Cependant, les zones d'ombre mesurées ne reflètent que rarement ces estimations, notamment aux fortes densités d'énergie auxquelles ont été obtenues les clichés présentés sur la figure IV.6. Ces écarts peuvent être expliqués par :

- l'irrégularité de l'épaisseur du masque de certaines ouvertures ;
- la réflexion du faisceau laser sur les parois des ouvertures.

La première hypothèse est peu vraisemblable. En effet, la technique de fabrication des masques est précise (à quelques micromètres près), et l'épaisseur des masques est systématiquement contrôlée à la suite de leur fabrication. Qui plus est, les écarts entre les estimations théoriques et les mesures sont identiques pour toutes les ouvertures du même masque.

L'hypothèse d'un écart dû à la réflexion sur les parois semble très vraisemblable puisqu'en prenant en compte cet effet, les dimensions des zones d'ombres mesurées deviennent comparables aux estimations numériques après une simple réflexion pour les masques M50 et M100, et après une double réflexion pour M25. Il peut être mesuré sur des wafers que le coefficient de réflexion du silicium à 337 nm est d'environ 50 %. Notons une nouvelle fois que l'importante densité d'énergie utilisée dans ce paragraphe assure l'ablation complète de la surface effectivement irradiée, même après réflexion multiple. Le contrôle fin des paramètres (fluence, épaisseur et largeur des ouvertures) gouvernant la dimension de la zone d'ombre pourrait en principe réduire encore les dimensions des zones irradiées, donc améliorer la résolution spatiale. Cependant, les surfaces les plus petites obtenues jusqu'à présent ($25 \times 10 \mu\text{m}^2$ avec les ouvertures de $25 \mu\text{m}$ de côté) sont d'ores et déjà proches de celles d'une cellule biologique de taille raisonnable.

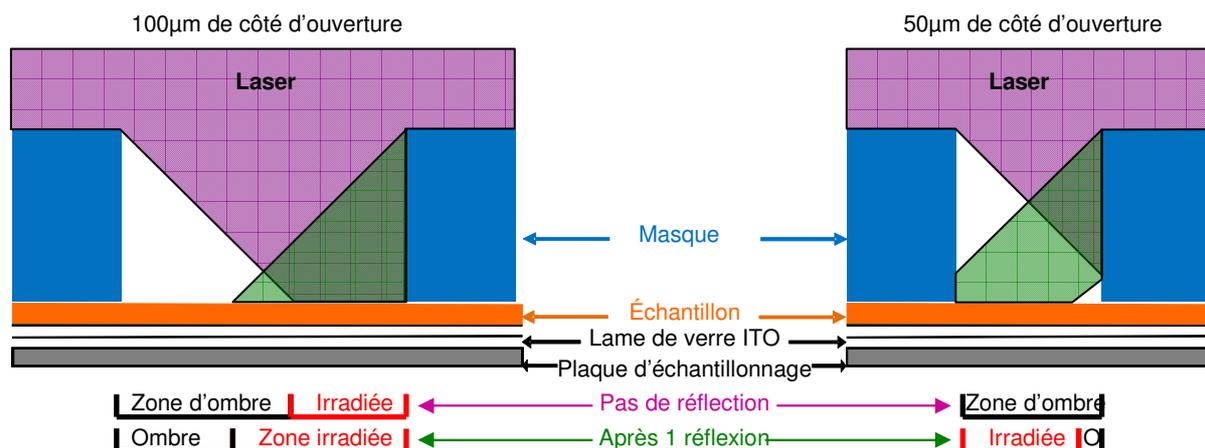


Figure IV.7 : Mise en évidence du phénomène de réflexion sur les parois des ouvertures.

IV.2.b Intensité des signaux

IV.2.b.α Mise en évidence d'une augmentation de l'intensité

La figure IV.8 montre l'évolution de l'intensité des signaux correspondant aux ions $[M+H]^+$ de la bradykinine en fonction de la fluence du faisceau (ou densité d'énergie par unité de surface) laser lors de l'analyse MALDI d'un échantillon de bradykinine avec la matrice HCCA obtenue par la méthode des doubles dépôts (Voir § II.2.b), en l'absence puis en présence de masques de 60 μm d'épaisseur et d'ouvertures 50 et 100 μm respectivement. Toutes les valeurs reportées dans cette figure sont le résultat d'une moyenne faite à partir de 10 spectres obtenus à différentes positions de l'échantillon.

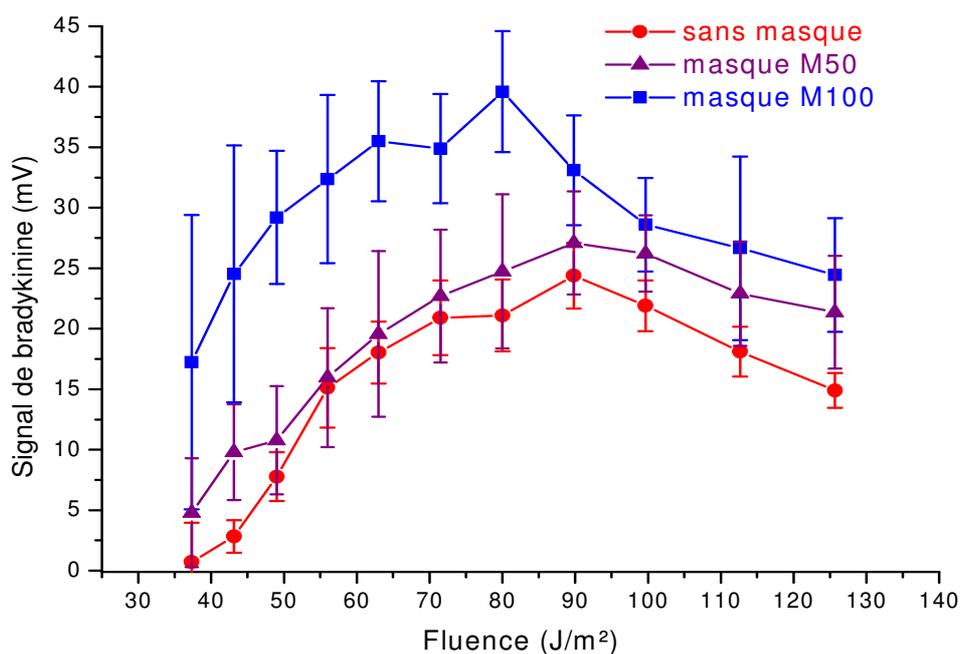


Figure IV.8 : Évolution de l'intensité du signal d'analyte ($[M+H]^+$, bradykinine, $m/z \sim 1061$ Da) avec ou sans masque en fonction de la fluence du faisceau laser (les barres d'erreurs représentent les écarts types).

La gamme de fluence choisie encadre celle utilisée classiquement dans le cadre d'analyses MALDI. Notons que la fluence est indépendante du type de masque utilisé (ou de sa non-utilisation) puisque l'énergie du laser et les dimensions de la section irradiée diminuent de la même façon avec la surface des ouvertures (C'est-à-dire la densité surfacique des photons est conservée). Cependant, la réflexion simple sur les parois des masques devrait mécaniquement diminuer de 50 % l'énergie de la portion du laser réfléchi vers l'échantillon, ce qui devrait décaler vers les hautes fluences les distributions obtenues à travers les masques. Ce décalage ne semble pas se retrouver dans la figure IV.8 (puisque les distributions se superposent approximativement). L'origine de cet effet sera discutée au §-IV.2.b.β.

Plus étonnant encore (et plus intéressant pour nos travaux), l'utilisation de ces masques ne dégrade généralement pas la sensibilité de l'analyse, c'est-à-dire l'intensité du signal d'analyte. Ainsi, lors d'une analyse menée avec un masque muni d'ouvertures de 50 μm de côté, l'intensité du signal $[M+H]^+$ de la bradykinine observé dans le spectre est du même ordre de grandeur que lors d'une analyse menée en l'absence de masque sur toute la gamme de fluence, alors que la zone irradiée est environ 20 fois plus petite. L'utilisation d'ouvertures de 100 μm l'augmente d'environ 50% par rapport à la meilleure valeur obtenue sans masque.

Enfin l'utilisation d'ouvertures de 25 μm (non présentée ici) réduit typiquement l'intensité des pics par un facteur 3 à 5. Cependant cette dégradation doit être mise en parallèle de l'amélioration de la résolution spatiale qui est d'un facteur ~ 100 .

Notons que les distributions en fluence des adduits $[\text{Bradykinine}+\text{Na}]^+$, $[\text{Bradykinine}+\text{K}]^+$ et $[\text{Bradykinine}+\text{Si}]^+$ (Voir figure IV.9) montrent un comportement similaire à celui de la bradykinine protonée, ce qui suggère un ou des mécanismes communs à l'origine de l'augmentation des signaux correspondant aux espèces protonées et cationées.

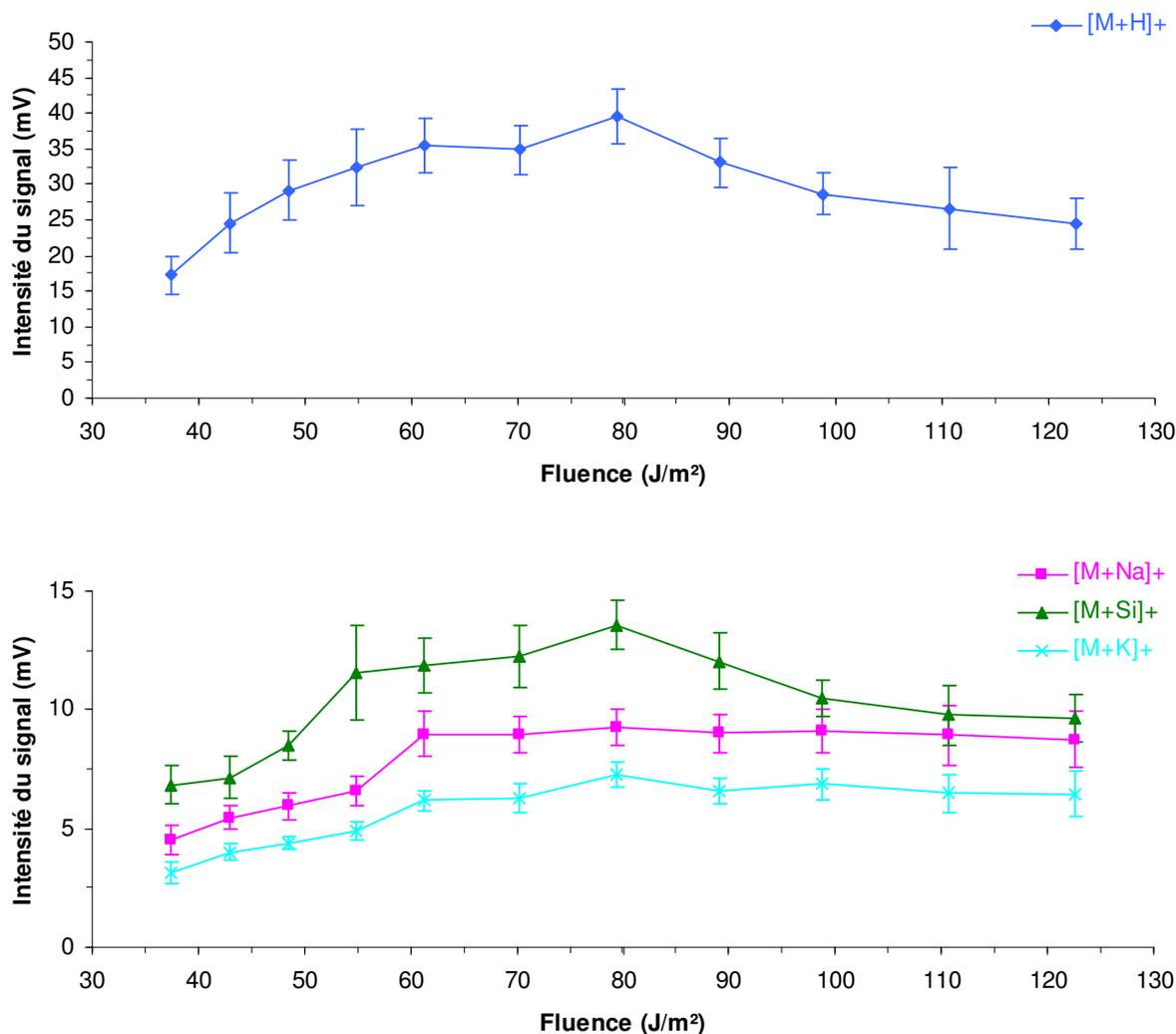


Figure IV.9 : Évolution comparée des intensités des signaux de bradykinine protonée et cationée ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 1061 Da ; $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1083 Da ; $[\text{M}+\text{Si}]^+$, 1088 Da ; $[\text{M}+\text{K}]^+$, 1099 Da) avec M100 en fonction de l'énergie du faisceau laser (les barres d'erreurs représentent les écarts types).

Si les adduits Na^+ et K^+ sont généralement présents en tant qu'impuretés dans les échantillons et sont couramment observés dans les spectres MALDI, les adduits Si^+ proviennent vraisemblablement de la paroi des masques. On peut aussi remarquer que contrairement à Na^+ et K^+ , Si^+ ne semble pouvoir être observé que sous forme d'adduits à l'analyte dans nos expériences. De plus, l'intensité plus importante des signaux d'adduits silicium observés sur les spectres semble indiquer une ablation assez importante de ce composé à partir des masques, cependant, qu'aucune modification de la surface des masques n'ait pu être mise en évidence. Ces observations permettront de renforcer les hypothèses sur l'origine des effets en sensibilité proposées au paragraphe suivant.

Globalement, toutes les tendances rencontrées sur des échantillons de bradykinine/HCCA obtenus par double dépôt se retrouvent dans le cas de l'insuline ou de mélange de bradykinine et d'insuline. En revanche, l'importante hétérogénéité des échantillons obtenus par dépôt acétone prévient toute mise en évidence directe d'une amélioration significative de la sensibilité.

Pour des raisons similaires, une comparaison directe est impossible entre des spectres obtenus avec et sans masque à partir de coupes de cerveaux de rats co-cristallisées à partir d'une solution d'HCCA (20 mg/mL). Ici, le problème d'inhomogénéité est bien sûr lié au tissu lui-même plutôt qu'au protocole d'élaboration de l'échantillon MALDI. Comme chaque point d'un échantillon biologique est potentiellement différent de son voisin en terme de composition, cette hétérogénéité se reflète dans le fait que malgré nos efforts, l'analyse d'une coupe de tissu en l'absence et en présence d'un masque se fera en des points proches, mais tout de même différents, ce qui entraînera des différences dans les spectres. Il faut néanmoins remarquer que par rapport à une analyse sans masque, les signaux correspondant à des composés présents dans les tissus sont (quand ils sont détectés) approximativement du même ordre de grandeur pour les masques de 100 μm d'ouverture (Voir figure IV.10), et généralement plus petits d'un ordre de grandeur pour les masques de 50 μm d'ouverture. Ainsi, la variation de l'intensité des signaux ne reflète toujours pas la réduction de la surface irradiée, ce qui montrerait encore une fois que l'utilisation de masques durant une analyse entraîne une production accrue d'ions analysés par unité de surface de l'échantillon.

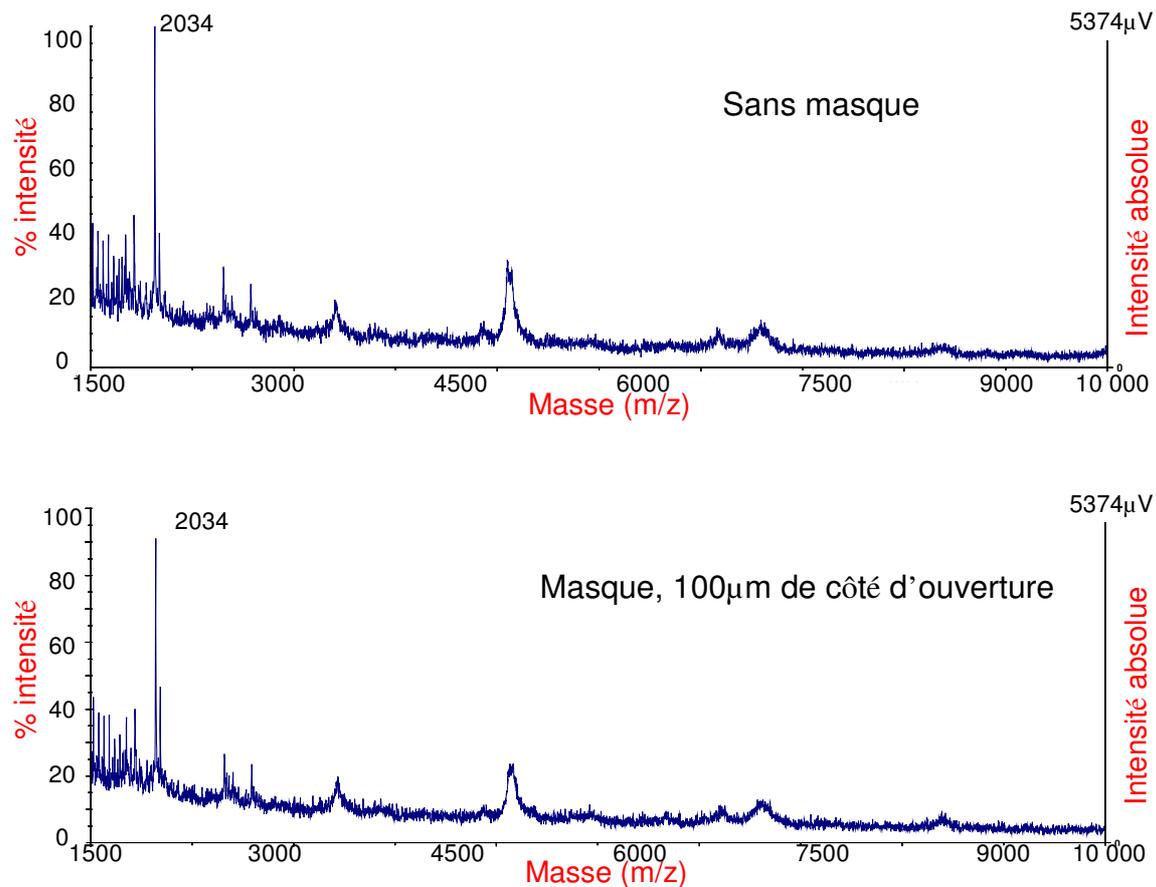


Figure IV.10 : Spectres de masse obtenus à partir d'une coupe de cerveau de rat sans et avec un masque d'ouverture 100 μ m.

Le gain en résolution spatiale étant toujours le même que celui observé dans des échantillons d'analytes purs, ces premières observations semblent donc démontrer le potentiel d'application en biologie de la technique de masque. Des analyses statistiques devront cependant être entreprises pour confirmer ces observations.

IV.2.b.β Origine de l'amélioration en sensibilité

IV.2.b.β.1 Lien avec les processus MALDI

Plusieurs indices permettent d'élucider partiellement la cause de cet effet inattendu. En premier lieu, l'absence de signal lors de l'irradiation d'un échantillon de bradykinine pure (sans matrice) exclut tout mécanisme lié aux techniques de désorption/ionisation laser sans

matrice comme le DIOS (Desorption/Ionization On Silicon), basée sur le dépôt d'analytes sur une surface poreuse de silicium (pores de dimension submicrométrique) [J.Wei/1999 ; Y.Chen/2006 ; Q.Zhang/2001 ; R.Nayak/2007]. L'augmentation de sensibilité doit donc être expliquée dans le cadre des processus MALDI, c'est-à-dire à travers l'augmentation du rendement de la matrice ionique ou des interactions entre l'analyte et la matrice (Voir § I.2.b). Le principal enjeu est de relier cette augmentation aux mécanismes d'ionisation primaires ou secondaires (ou les deux puisque l'augmentation du rendement d'ions de matrice au cours de l'interaction laser-matière peut aussi mener à l'augmentation des réactions entre analytes et ions de matrice dans la plume d'ablation). Certaines observations semblent renforcer le rôle de l'ionisation primaire. En particulier, le gain relatif en sensibilité est clairement plus élevé à basse fluence, dans une gamme où la libération de matière est trop faible pour initier des processus d'ionisation secondaire très efficaces. Cette observation doit être reliée à la remarquable décroissance du seuil d'apparition des ions pour les études avec masques, légère pour M50 et prononcée pour M100. Ce résultat contraste fortement avec ceux obtenus en focalisant le spot laser dans [K.Dreisewerd/1995 ; A.Ingendoh/1994] qui met en évidence une dépendance en $1/r^3$ du seuil d'apparition des ions avec le diamètre r du spot laser.

IV.2.b.β.2 Rôle du matériau : effet photoélectrique

Un mécanisme d'ionisation primaire en adéquation avec nos études pourrait être lié à l'existence d'un effet photoélectrique sur la partie de l'échantillon en contact avec les bords en silicium du masque. D'après le modèle d'augmentation de la photoionisation de la matrice par effet de surface (surface-enhancement matrix photoionization model) proposé dans [G.McCombie/2006] pour décrire le rendement ionique de film déposé sur des substrats métalliques, la présence de matrice en contact avec le métal (ou le semi-conducteur dans notre cas) mène au couplage par effet tunnel des orbitales moléculaires de la matrice et du substrat. Ceci déplace la plus haute orbitale moléculaire occupée et la plus basse inoccupée (HOMO et LUMO). Si l'orbitale LUMO résultante se situe en dessous du niveau de Fermi du substrat, elle est susceptible d'être occupée, menant à une diminution de l'écart au potentiel d'ionisation de la matrice jusqu'à une valeur de l'ordre du travail de sortie (Voir figure I.8). Au regard de la longueur d'onde du laser (337 nm, 3,7 eV), du potentiel d'ionisation de la matrice HCCA testée (8,5 eV) et du niveau de Fermi du silicium pur (4,6 eV) [R.Knochenmuss/2006b], deux photons peuvent ioniser efficacement la couche de matrice en

contact avec les parois du masque alors que trois photons sont nécessaires pour ioniser la matrice dans le cœur de l'échantillon. L'augmentation du rendement d'ionisation primaire ne concernerait donc que cette seule couche de matrice.

Deux causes pourraient expliquer la présence d'une couche de matrice en contact avec le silicium. La première serait liée au confinement de la plume naissante à l'intérieur du masque. Les espèces présentes sur les bords de la plume interagiraient alors simultanément avec le silicium et le laser pendant la durée de l'impulsion. La vitesse de la plume étant typiquement de quelque 500 m/s [A.Verentchikov/1999] et la durée de l'impulsion laser de 3 ns, la hauteur de la couche affectée serait de l'ordre de quelques micromètres, sa section égale à celle de l'ouverture des masques. Une autre possibilité serait la formation d'un dépôt sur les parois verticales du masque après chaque tir laser, le(s) tir(s) suivant(s) irradiant ce dépôt.

Certaines observations appuient cette hypothèse. En premier lieu, seuls des signaux d'intensité très faible ont pu être mis en évidence lors de l'utilisation de masques à bords inclinés. La distribution angulaire piquée de la plume associée à l'inclinaison des parois réduirait en effet grandement la possibilité de contact entre le silicium et la matrice, que ce soit directement au niveau de la plume ou par dépôt (Voir figure IV.11).

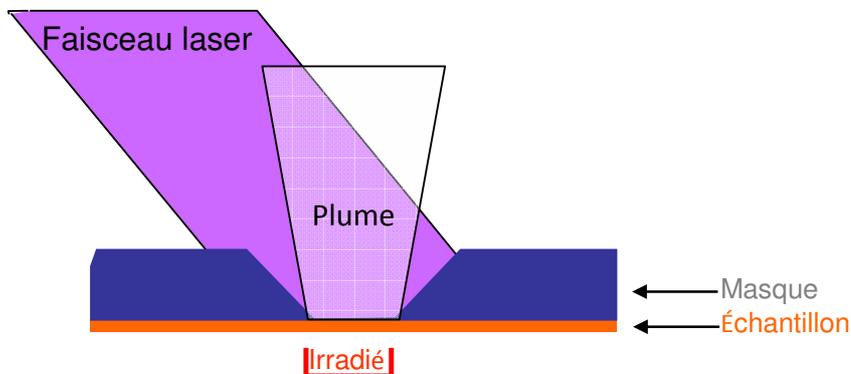


Figure IV.11 : Irradiation d'une ouverture à flancs inclinés. Aucune réflexion spéculaire du laser vers l'échantillon n'est possible pour cette géométrie d'ouverture.

D'autre part, si le gain en sensibilité est maximal pour le masque muni d'ouvertures de 100 μ m de côté, il y a toujours un effet bénéfique pour les ouvertures de 250 μ m de côté, alors que cette dimension est comparable au diamètre du spot laser. Ceci tendrait à valider l'existence d'un effet de bord. Parallèlement, les spectres acquis avec les plus petites ouvertures (25 μ m de côté) montrent des signaux d'analytes d'intensité généralement moins intense d'un facteur trois à cinq par rapport à ceux enregistrés sans masque. La diminution

modérée de la sensibilité au regard de l'amélioration de la résolution spatiale (x100) démontre également l'importance de cet effet de bord pour contrebalancer le rôle négatif de la diminution de la surface irradiée sur la sensibilité. Enfin, la présence de cations [Bradykinine+Si]⁺ (Voir figure IV. 12) dans les spectres renforce encore l'hypothèse d'une interaction entre le silicium des parois et l'échantillon.

L'existence d'une couche en contact avec les parois pourrait également limiter l'importance du phénomène de réflexion du laser introduit au §-IV.2.a et ainsi expliquer pourquoi les distributions de la figure IV.8 ont le même comportement vis-à-vis de l'énergie malgré un coefficient de réflexion de 50 % pour le silicium à la longueur d'onde du laser. Notons que ce décalage peut être observé pour la distribution correspondant au masque de 25 µm de côté. Ceci reste compatible avec nos hypothèses puisque plusieurs réflexions sont nécessaires au faisceau laser pour atteindre le fond d'une ouverture.

IV.2.b.β.3 Rôle de la géométrie des masques

Des simulations numériques réalisées sur des capillaires et basées sur un modèle quantitatif de MALDI-UV spécifiquement adapté aux surfaces structurées développé par R. Knochenmuss [R.knochenmuss/2009] suggèrent également l'impact de la géométrie du masque sur le rendement d'ions MALDI. Elles mettent notamment en évidence un accroissement de la vitesse d'expansion de la plume qui diminue le taux de collisions en son sein. Ceci favoriserait la libération des ions primaires de matrices en limitant les recombinaisons. Cependant, cette réduction du taux de collisions diminuerait aussi les réactions secondaires entre ions de matrice et analytes neutres ce qui conduirait finalement à une diminution de la production d'analyte protoné. Cette contradiction avec nos travaux pourrait être liée aux différences dans les dimensions des systèmes étudiés : de l'ordre de la dizaine de micromètres pour les masques, sub-micrométrique pour les capillaires. Si les effets obtenus par ces simulations deviennent dominants pour des ouvertures de cette dimension, ils pourraient donner une limite inférieure à la taille des masques permettant un gain en résolution spatiale tout en assurant une sensibilité suffisante. Ici, au contraire, le confinement de la plume à l'intérieur des parois pourrait accroître la densité des espèces éjectées, conduisant à une amplification des collisions entre ions et molécules neutres et en conséquence à une protonation plus efficace des analytes par la matrice. Au final, le gain en sensibilité pourrait au moins être partiellement dû à une amplification des mécanismes

d'ionisation secondaire liée à la géométrie des masques. Notons que cette hypothèse est compatible avec l'essentiel des observations évoquées jusqu'à présent (l'absence d'effet avec des masques à parois inclinées et l'effet de bord notamment) à l'exception de celles faites à des énergies laser proches du seuil de production des ions.

IV.2.c Résolution Spectrale

IV.2.c.α Mise en évidence d'une augmentation de la résolution spectrale

La figure IV.12 montre un agrandissement du spectre de masse centré sur les signaux de bradykinine protonée et cationée obtenus avec et sans masque. Ces spectres montrent clairement que l'utilisation de masques peut également augmenter la résolution spectrale. Ceci donne par exemple la possibilité de dissocier complètement les signaux correspondant aux trois adduits de la bradykinine : $[\text{Bradykinine}+\text{Na}]^+$, $[\text{Bradykinine}+\text{K}]^+$ et $[\text{Bradykinine}+\text{Si}]^+$. Notons que les paramètres expérimentaux utilisés pour améliorer la résolution spectrale (le temps de retard, la tension d'accélération, la tension sur le guide d'ion,...) sont optimisés pour l'acquisition de spectres en l'absence de masque. Une configuration optimisant les signaux obtenus à travers les masques pourrait permettre de l'améliorer encore.

Dans notre étude, cet effet est plus marqué pour les petites ouvertures et les hautes fluences. Plus précisément, l'élargissement du signal d'analyte avec la fluence est moins prononcé avec un masque. De plus, l'augmentation de la résolution en masse ne coïncide pas exactement avec l'augmentation de la sensibilité, ce qui suggère des origines différentes pour les deux effets.

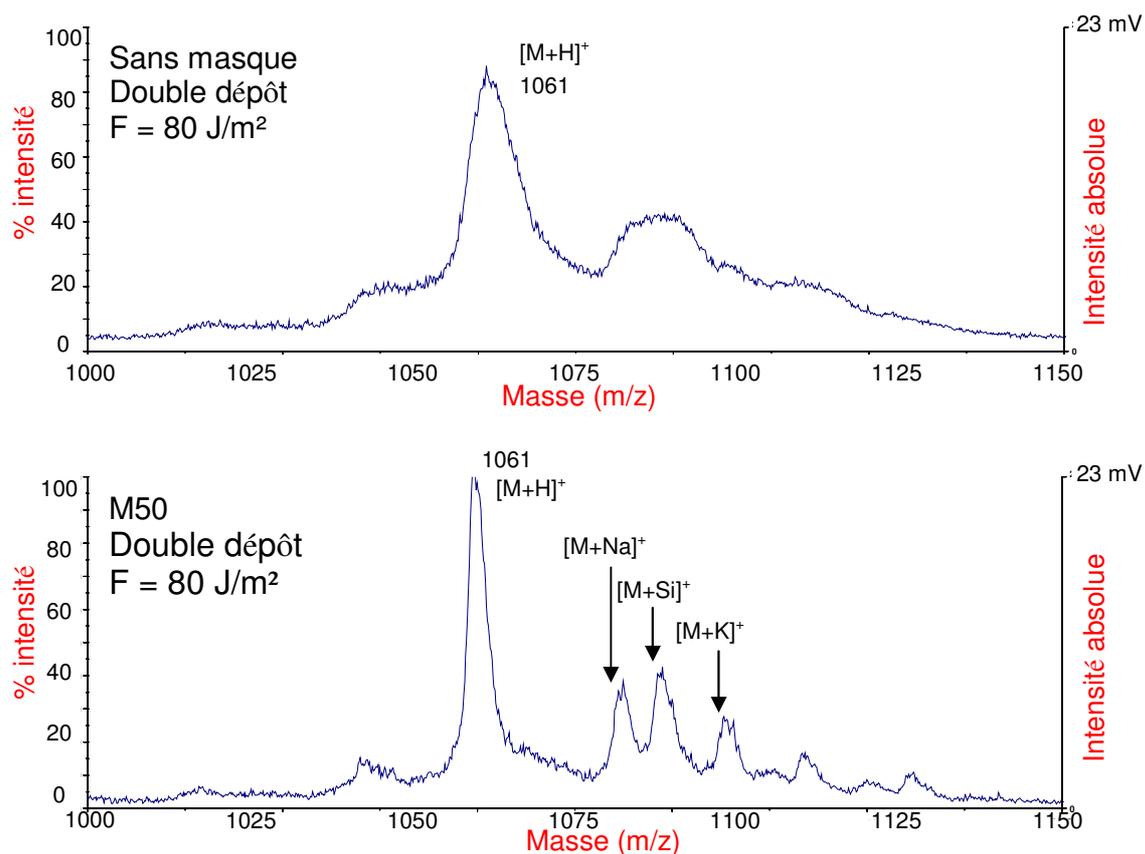


Figure IV.12 : Agrandissement du signal $[M+H]^+$ de la bradykinine en l'absence et en présence de masque.

IV.2.c.β Origine de l'amélioration en résolution spectrale

La largeur des pics observés dans les spectres obtenus par TOF est donnée par la dispersion temporelle des ions de même masse (plus généralement de même rapport masse-sur-charge) arrivant sur les détecteurs après avoir traversé la zone libre de champ. Pour les spectromètres de masse linéaires comme celui que nous utilisons dans ces études, cette dispersion est liée aux distributions en énergie cinétique et à la distance au détecteur des ions au moment de leur accélération. Cependant, en MALDI, on considère que la formation des ions se produit suffisamment près de la surface de l'échantillon irradié pour ne prendre en compte que l'aspect énergétique. Aux vues de ces considérations, une explication possible de l'amélioration de la résolution en masse pourrait être due au profil top-hat du faisceau laser au travers du masque. Toutes les espèces de l'échantillon seraient alors soumises à une énergie laser bien plus homogène qu'en l'absence de masque (le faisceau étant alors de profil

Gaussien), ce qui conférerait une distribution d'énergie cinétique moins dispersée aux ions formés. Cette utilisation des masques est à rapprocher de celle des lasers à profil spatialement structuré qui permettent également d'augmenter les performances de la technique MALDI en termes de sensibilité et de résolution en masse [A.Holle/2006]. Notons que dans ces travaux, l'amélioration de la résolution en masse a un effet direct sur l'intensité des pics, alors que ces deux phénomènes sont découplés dans nos travaux.

IV.2.d Cas des grilles

IV.2.d.α Comparaison avec les masques

Dans le cas des grilles, le laser irradie simultanément différentes ouvertures. Comme une plus grande surface est affectée, il faut s'attendre à ce que la résolution spatiale diminue mais qu'à l'inverse le réseau d'ouvertures entraîne une augmentation de la sensibilité par comparaison avec une simple ouverture. Les observations expérimentales réalisées coïncident avec ce schéma général comme le démontre les distributions en fluence obtenues pour un masque et une grille dont les ouvertures sont de 50 μm de côté (Voir figure IV.13)..

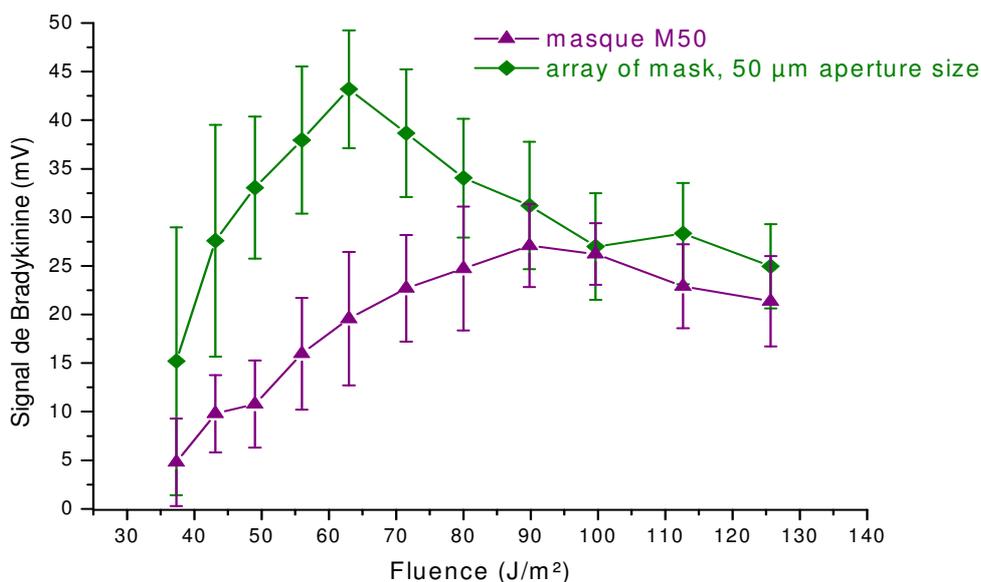


Figure IV.13 : Évolution de l'intensité du signal d'analyte ($[\text{M}+\text{H}]^+$ de la bradykinine, $m/z \sim 1061$ Da) avec un masque et une grille en fonction de la fluence du faisceau laser.

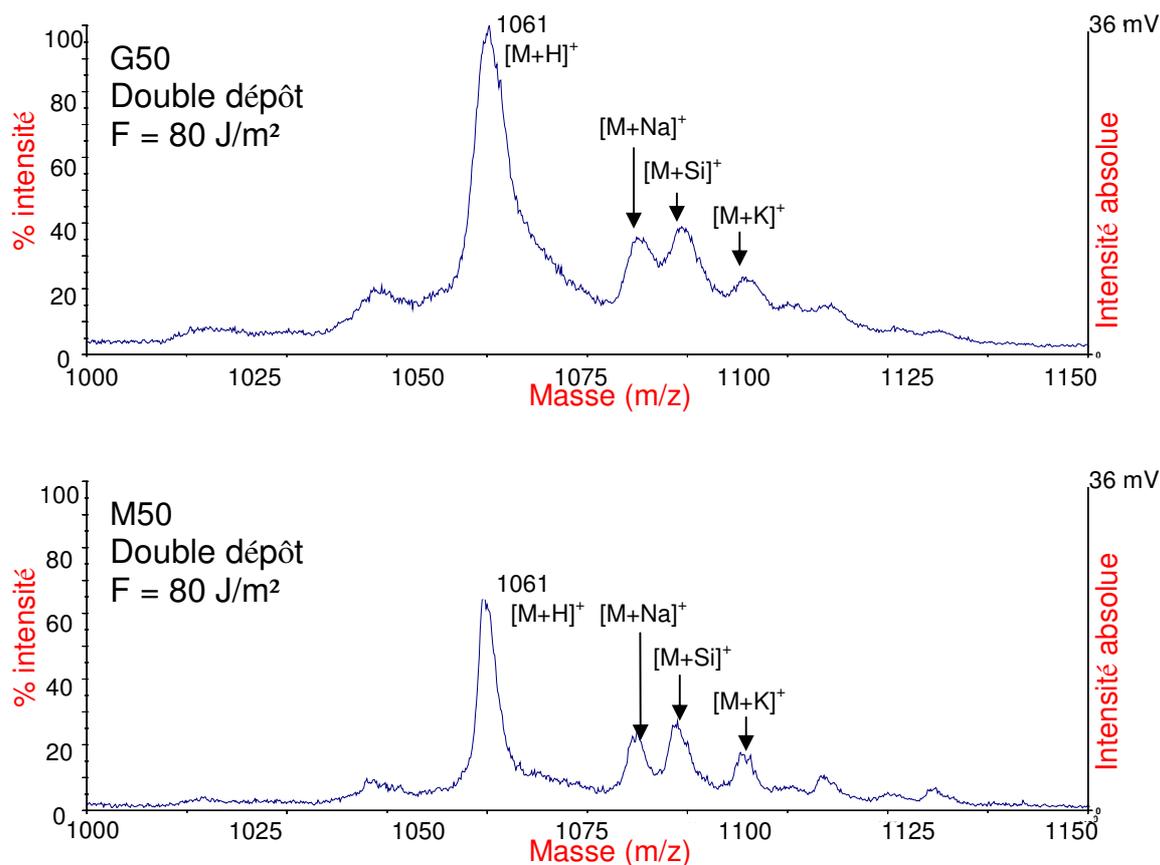


Figure IV.14 : Agrandissements du signal d'analyte pour un masque et une grille.

Cependant, l'effet est moins spectaculaire qu'attendu. En effet, alors que 9 ouvertures sont irradiées simultanément, l'intensité du signal de bradykinine n'augmente que d'un facteur 4 au maximum. D'autre part, il faut noter que la résolution spectrale est dégradée par rapport au masque correspondant, même si elle reste meilleure qu'en l'absence de masque (Voir figure IV.14).

IV.2.d.β Origine des écarts mis en évidence

L'interprétation de ces résultats peut être faite dans la continuité des conclusions précédentes. Chaque zone de l'échantillon en face d'une ouverture est irradiée par un faisceau laser de profil quasi flat-top mais avec une fluence différente à cause du profil gaussien du faisceau laser avant le réseau : une haute fluence pour l'ouverture centrale et une fluence plus basse pour celles en périphérie (Voir figure IV.15).

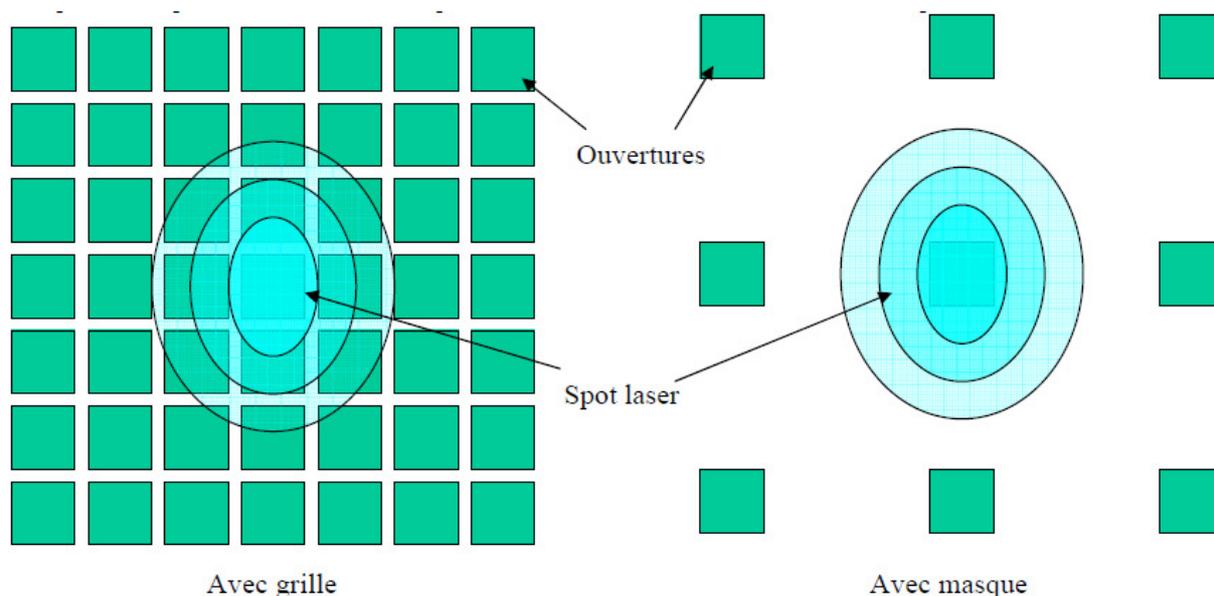


Figure IV.15 : Mise en évidence du nombre d'ouvertures irradiées par un spot laser de profil gaussien lors du ciblage d'une ouverture sur une grille ou un masque.

La distribution en fluence résulterait alors d'une convolution complexe de neuf distributions décalées l'une de l'autre. Ceci pourrait également expliquer la détérioration de la résolution en masse. Une autre origine de ces effets pourrait être liée aux possibles collisions entre les différentes plumes, ce qui aurait un effet contre-productif sur la production des ions d'analyte. Ceci expliquerait en particulier la chute soudaine de la sensibilité pour une haute fluence laser. Des études d'imagerie de plume seront nécessaires pour déterminer la divergence des plumes et vérifier cette hypothèse. Notons pour conclure qu'aucune dépendance du rendement d'ions vis-à-vis de la polarisation mis en évidence dans les travaux du groupe de A.Vertes sur des réseaux de pointes dans [B.N.Walker/2010] n'est attendue ici de par la dimension micrométrique de nos réseaux, plus grandes que celles de A.Vertes (nanométrique) et que la longueur d'onde du laser utilisé.

IV.3 Conclusions et perspectives

Les expériences décrites dans ce chapitre démontrent sans ambiguïté l'intérêt des masques pour améliorer la résolution spatiale de la technique MALDI sans dégrader sa

sensibilité pour des applications dans le domaine de l'imagerie MALDI. Selon les dimensions de l'ouverture testée, le gain de résolution spatiale peut varier de 3 à 100, pour s'approcher de la résolution nécessaire pour étudier les cellules biologiques. Une amélioration de la résolution spectrale et de la sensibilité a également été mise en évidence. Un certain nombre d'hypothèses ont été émises pour expliquer l'impact des masques sur la sensibilité de la technique. La plus probable est liée à un effet d'amplification photoélectrique sur la partie de l'échantillon en contact avec les bords en silicium du masque. Cependant, la possibilité que le confinement de la plume entre les parois du masque conduise à une augmentation des collisions entre ions et analytes et finalement à un meilleur rendement d'analyte protoné n'est pas exclue à ce stade.

Des expériences complémentaires utilisant d'autres matériaux (notamment des métaux et des isolants), différentes épaisseurs et formes de masques, d'autres paramètres d'analyse (variation du temps de retard,...) et des études sur la dynamique de la plume par imagerie rapide (Voir annexe 1) seront nécessaires pour privilégier l'un de ces différents scénarios. D'autre part, des analyses statistiques sur des tissus devront être entreprises pour surpasser les problèmes liés à l'inhomogénéité des échantillons et valider le potentiel d'application en biologie de la technique.

Conclusions et perspectives

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une collaboration interdisciplinaire nouée à partir de 2009 entre les laboratoires partenaires PhLAM et LSMBFA au sein de l'Université Lille 1 pour développer des systèmes d'imagerie moléculaire d'intérêt biologique innovants. Cette collaboration, favorablement expertisée par l'AERES tant en physique qu'en biologie a bénéficiée d'une allocation de thèse président au titre du soutien au projet interdisciplinaire entre les Ecoles Doctorales Biologie-Santé et SMRE, et par l'acquisition d'un instrument MALDI-TOF commercial qui a permis le développement et l'étude de deux systèmes destinés à pallier les limitations en termes de sensibilité et de résolution spatiale des sources MALDI.

Le premier de ces dispositifs a pour objectif l'augmentation de la quantité d'ions nus analysables, par désolvatation des agrégats formés lors de leur désorption. Ce montage, réalisé en modifiant la source commerciale, fait intervenir un second laser qui vient raser l'échantillon à analyser pour irradier la plume de désorption entre le tir du laser MALDI et la mise en place du champ électrique d'accélération. Ce second laser a pour rôle de stimuler les agrégats présents dans la plume, afin de dissocier ces structures et libérer des ions nus analysables. Deux types de laser ont été utilisés pour ces expériences : un laser continu et un laser impulsionnel nanoseconde, tous deux émettant dans le proche infrarouge (1070 et 1064 nm) et donnant lieu à une excitation purement thermique des échantillons.

Dans les deux cas, un effet important sur les spectres est mis en évidence. Pour le laser continu, une diminution de l'intensité de tous les signaux présents dans les spectres est observée à mesure que la puissance de ce laser augmente. Cependant l'intensité des signaux de matrice diminue beaucoup plus rapidement que celles associées aux analytes.

A l'opposée, l'utilisation du laser impulsionnel conduit à une augmentation significative des signaux d'analytes avec l'énergie du laser, jusqu'à un facteur 2 à 3 pour la

Développement et caractérisation de techniques pour l'amélioration de la sensibilité et de la résolution spatiale des sources MALDI : Désolvatation laser et masques.

plus grande énergie testée. Parallèlement, les signaux de matrice évoluent de manière beaucoup moins marquée.

L'ensemble de ces observations peuvent être interprétées dans le cadre d'une compétition entre processus de désolvatation - qui libèrent des ions d'analytes et de matrices - et de fragmentation de ces mêmes espèces. Ainsi le contrôle de l'énergie amenée par le laser pourrait favoriser les processus de désolvatation des analytes et donnerait lieu à un gain en termes de sensibilité de la technique MALDI. Il conviendra de confirmer ces études préliminaires et très encourageantes en testant une gamme d'énergie plus large. L'impact de la durée de l'impulsion et de la tranche de la plume irradiée devra également être étudié plus finement. Enfin, de nouvelles matrices et des longueurs d'onde a priori plus favorables au processus de désolvatation (résonnante avec des fonctions chimiques spécifiques de la matrice et des agrégats) devront être testées. De plus, l'utilisation de ce système dans des conditions moins classiques d'analyses MALDI, telle que l'AP MALDI ou en l'absence de champs électriques appliqués au niveau de l'échantillon pourrait aussi permettre de vérifier la versatilité de cette technique.

Le second système développé est constitué de masques, des ouvertures carrés de différentes dimensions (de 50 à 250 μm de côté) creusées par gravure plasma dans des galettes de silicium pur et à apposer directement sur l'échantillon à analyser. Des études systématiques réalisées sur des peptides modèles et à différentes énergies laser ont pu mettre en évidence un effet bénéfique de ce système sur la résolution spatiale de la source MALDI, jusqu'à une dizaine de micromètres avec les masques testés, en profitant de la zone d'ombre créée grâce à l'épaisseur des ouvertures et à l'inclinaison du laser. Des expériences réalisées sur tissus confirment également ces observations.

Contrairement à ce qu'on peut observer en focalisant un laser sur l'échantillon, l'augmentation de la résolution spatiale n'est pas nécessairement accompagnée d'une dégradation de la sensibilité. Mieux, certaines configurations améliorent la sensibilité jusqu'à un ordre de grandeur par rapport aux analyses MALDI classiques. Cet effet inattendu peut être interprété dans le cadre des processus MALDI, c'est-à-dire à travers l'augmentation du rendement de la matrice ionique (ionisation primaire) ou des interactions entre l'analyte et la matrice (ionisation secondaire). Nos observations semblent plutôt suggérer un effet d'amplification photoélectrique de la matrice sur la partie de l'échantillon en contact avec les bords du masque en silicium. Cependant, la possibilité que le confinement de la plume entre les parois du masque conduise à une augmentation de l'ionisation secondaire ne peut être

exclue. Des études complémentaires avec de nouveaux matériaux, de nouvelles formes d'ouvertures et épaisseurs seront nécessaires pour confirmer ces hypothèses.

L'utilisation de masque a également un effet bénéfique sur la résolution spectrale, permettant par exemple de dissocier complètement les signaux correspondants aux formes cationisées des analytes. L'origine de cet effet pourrait être liée à la modification du profil laser, rendu bien plus homogène lors de son passage à travers les masques et qui conférerait une distribution d'énergie cinétique bien moins dispersée aux ions produits.

Des réseaux de masques ont également été testés. Puisque une surface plus grande, correspondant à la section du faisceau laser est irradiée, ces réseaux (ou grilles) n'améliorent évidemment pas la résolution spatiale mais uniquement la sensibilité. L'effet n'est toutefois pas aussi spectaculaire qu'attendu. De nouveau la modification du profil du laser à travers la grille pourrait expliquer ce phénomène.

Finalement, l'ensemble de ces expériences démontrent que ce système de masque, bon marché et conçu pour être utilisable sur la majorité des sources commerciales sans modification de l'instrument, peut aisément permettre une amélioration de la résolution spatiale jusqu'à des valeurs compatibles avec l'analyse de cellule, sans dégradation de la sensibilité ni de la résolution spectrale.

Annexe :

Complément aux manipulations sur les masques.

A.I Réalisation de masques par gravure laser

A.I.1 Montage

Les masques utilisés pour nos travaux ont été obtenus par gravure chimique ou par gravure plasma. Ces techniques décrites dans la partie IV.1 sont très précises, mais nous rendent dépendants de dispositifs extérieurs à notre laboratoire.

Nous avons donc cherché à développer une technique alternative pour obtenir de nouveaux masques rapidement avec nos moyens et notre savoir-faire : la gravure par ablation laser (Voir figure A.1).

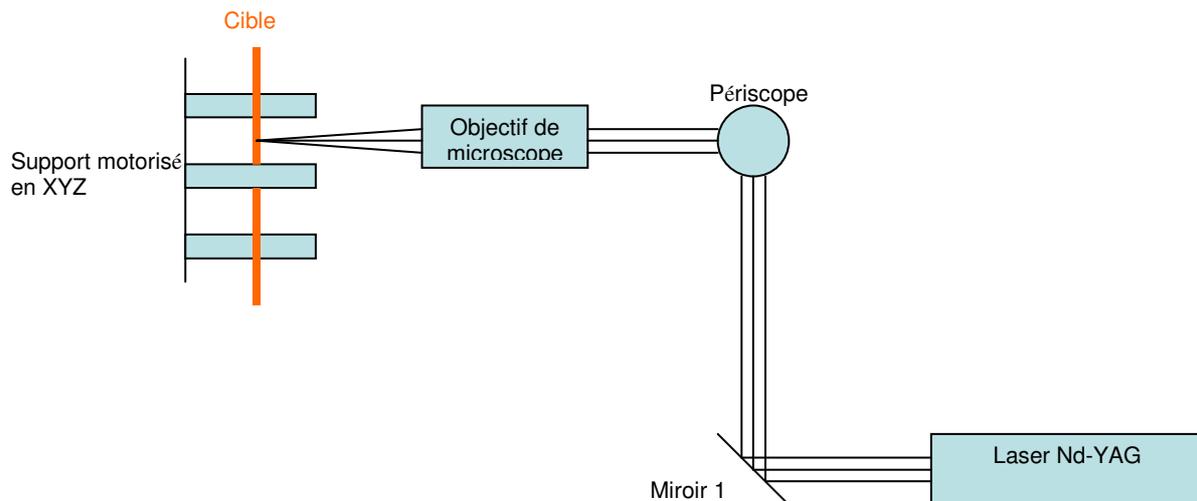


Figure A.1 : Schéma du montage de gravure laser.

Les gravures ont été réalisées à l'aide d'un laser Nd-YAG à 532 nm (Brilliant EaZy), cependant le montage permet d'y adapter d'autres types de laser, comme par exemple le laser fibré continu haute puissance utilisé lors de nos expériences de désolvatation. Le trajet optique du faisceau laser est contrôlé par trois miroirs dont deux formant un périscope de façon à ce que le faisceau laser arrive perpendiculairement à la cible. La focalisation de ce faisceau sur la cible est assurée par un objectif de microscope qui nous permet d'obtenir un spot d'environ 250 μm .

La cible est fixée sur un support motorisé permettant un déplacement de la cible dans les 3 dimensions de l'espace. Cette cible est maintenue par serrage au niveau de ses bords afin de la maintenir à la verticale pendant la phase de gravure, elle est située à quelques centimètres du support motorisé afin de ne pas l'endommager et de pouvoir repérer visuellement le perçage de la cible.

Les masques utilisés lors des analyses doivent pouvoir être maintenus à la surface de l'échantillon. Les matériaux choisis pour ces gravures doivent donc être à la fois de faible épaisseur (moins d'un millimètre) et rigides. Deux types de matériaux ont été testés : une plaque de cuivre et des wafers de silicium identiques à ceux utilisés pour la gravure des masques présentés au chapitre IV, tous deux d'environ 200 μm d'épaisseur. Notons que la plaque de cuivre provient d'une chute d'un élément déjà usiné. Elle n'est donc pas parfaitement régulière, ce qui peut expliquer les dimensions parfois inégales des ouvertures réalisées dans des conditions identiques.

A.I.2 Résultats

Grâce à ce montage, nous avons donc pu réaliser des ouvertures de dimensions équivalentes à celles obtenues par les techniques de gravure chimique et plasma (Voir figure A.2).

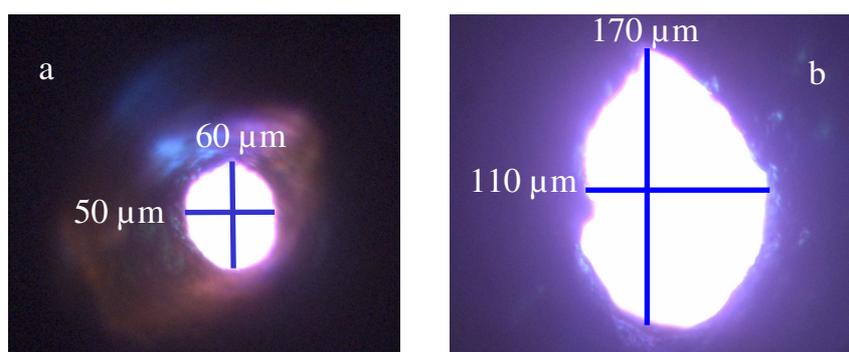


Figure A.2 : Photographies d'ouvertures obtenues par gravure laser dans une plaque de cuivre (a) et un wafer de silicium (b).

La forme de ces ouvertures est directement liée à celle du faisceau laser. Dans les expériences réalisées ici avec un faisceau gaussien, les ouvertures sont circulaires mais

l'emploi d'iris et/ou de lentilles cylindriques pourrait permettre d'obtenir des formes plus complexes.

L'énergie déposée et la durée d'irradiation constituent les principaux paramètres du montage qui nous permettent de jouer sur les dimensions des ouvertures. Le positionnement de la cible hors focale ne nous ayant pas permis de percer la cible, nous n'avons pas déplacé celle-ci de cette position particulière lors des manipulations.

L'influence du temps de perçage est mise en évidence sur la figure A.3 :

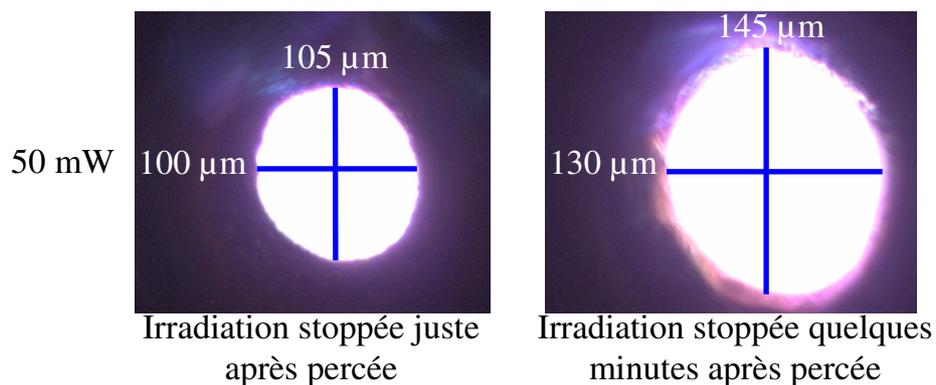


Figure A.3 : Photographies d'ouvertures obtenues par gravure laser pour différents temps de perçage de la plaque de cuivre.

On peut clairement voir que les dimensions de l'ouverture sont grandement dépendantes de la durée d'irradiation de la cible. Ainsi, plus le temps d'irradiation de la surface est grand, plus l'ouverture est de dimensions importantes, jusqu'à un diamètre proche de celui du spot laser (250 μm). Cet effet est bien sûr lié à la nature Gaussienne du faisceau ainsi qu'à la diffusion thermique des matériaux employés (métaux et semi-conducteur).

L'effet de la puissance du faisceau laser sur les dimensions des ouvertures est présenté sur la figure A.4. Après la phase de perçage, qui peut durer de quelques dizaines de secondes à quelques minutes suivant la puissance, le diamètre des ouvertures varie de 50 à 150 μm . Ces valeurs sont comparables à celles obtenues par gravure plasma.

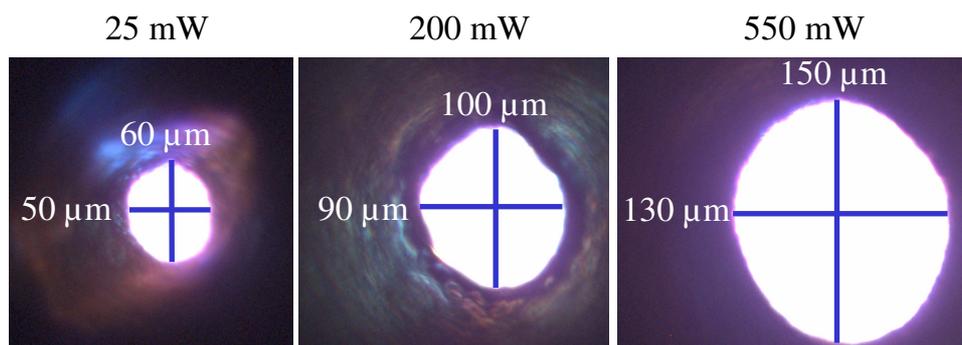


Figure A.4 : Photographies d'ouvertures obtenues par gravure laser sur plaque de cuivre pour différentes énergies d'irradiation (l'irradiation laser a été stoppée juste après la percée).

La fabrication d'ouvertures simples est donc aisément réalisable. En revanche, la gravure de réseaux d'ouvertures est plus problématique (Voir figure A.5). La grande conductivité thermique du cuivre interdit en effet de graver deux ouvertures séparées par moins d'une centaine de μm . Il conviendrait de reprendre ces expériences avec des matériaux plus isolants.

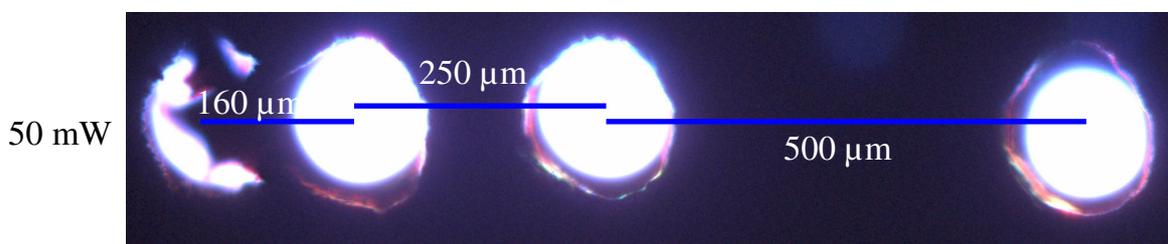


Figure A.5 : Photographies d'ouvertures obtenues par gravure laser de la plaque de cuivre pour plusieurs distances séparant les positions d'irradiation, (l'irradiation laser a été stoppée juste après la percée).

A.II Imagerie de la plume de désorption

Afin d'observer le comportement de la plume de désorption lors de nos expériences de désolvatation et de masques, des études d'imagerie seront nécessaires.

Ces manipulations pourront être menées sur une installation déjà présente dans le laboratoire (Voir figure A.7) mais qui devra être adaptée au dispositif MALDI existant. Elle

Développement et caractérisation de techniques pour l'amélioration de la sensibilité et de la résolution spatiale des sources MALDI : Désolvatation laser et masques.

repose sur la technique LIF (fluorescence induite par laser), technique de diagnostic laser basée sur l'absorption par certaines espèces de la plume d'un rayonnement laser accordé sur une de leur transition électroniques et placé transversalement par rapport à la plume. Ces espèces réémettront alors des photons (le signal de fluorescence) qu'il sera possible de récolter sur une caméra ICCD rapide. L'ensemble de ces signaux permettra de construire une cartographie 2D de ces espèces dans la plume.

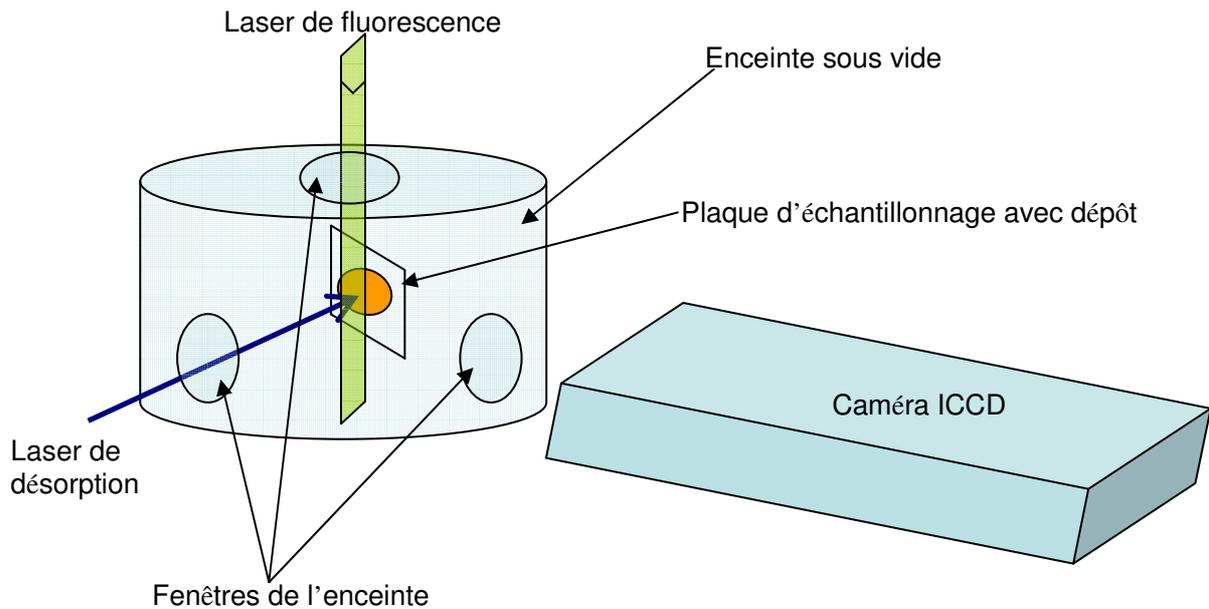


Figure A.7 : Représentation schématique du montage d'imagerie de plume.

Parmi les composés présents dans un échantillon MALDI, seule la matrice peut fluorescer de manière efficace en réponse à l'irradiation laser, mais ce n'est pas le cas de la plupart des analytes. Idéalement, un marquage de l'analyte avec un fluorophore émettant à une longueur d'onde spécifique permet de distinguer la distribution des molécules de matrice de celle de l'analyte dans la plume. De telles expériences ont été réalisées avec succès par A.A.Puretzky et D.B.Geohegan [A.A.Puretzky/1999] (Voir figure III.16), mais dans des conditions très différentes des conditions conventionnelles d'expériences MALDI telles que celles utilisées dans nos études, et en particulier en termes de longueur d'onde, de fluence, de préparations d'échantillon et de dimensions spatio-temporelles.

Références

S.Alves

- 2006 Sandra Alves, Françoise Fournier, Carlo Afonso, Franck Wind, Jean-Claude Tabet
Journal of Near Infrared Spectroscopy, 2006, 12(6), 369-383
Gas-phase ionization/desolvation processes and their effect on protein charge state distribution under matrix-assisted laser desorption/ionization conditions

D.W.Armstrong

- 2001 Daniel W. Armstrong, Li-Kang Zhang, Lingfeng He, Michael L. Gross
Analytical Chemistry, 2001, 73(15), 3679-3686
Ionic Liquids as Matrixes for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry

J.Axelsson

- 1997 J. Axelsson, A.-M. Hoberg, C. Waterson, P. Myatt, G.L. Shield, J. Varney, D.M. Haddleton, P.J. Derrick
Rapid communication in mass spectrometry, 1997, 11, 209-213
Improved reproducibility and increased signal intensity in MALDI as a result of electrospray sample preparation

M.A.Baldwin

- 2002 M.A.Baldwin, V.L.Talroze, A.L.Burlingame, I.O.Leipunsky
50th ASMS conference on mass spectrometry and allied topics 2002
AP-MALDI and gas release in the MALDI process

J.Barthel

- 1994 J.Barthel, R.Neuder, P.Schröder
Dechema, Frankfurt, 1994
Chemistry data series

S.Baumgart

- 2004 Sabine Baumgart, Yvonne Lindner, Ronald Kühne, Axel Oberemm, Holger Wenschuh, Eberhard Krause
Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2004, 18(8), 863-868
The contributions of specific amino acid side chains to signal intensities of peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry

R.C.Beavis

- 1989 Ronald C. Beavis, Brain T. Chait, H. M. Fales
Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1989, 3(12), 432-435
Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins
- 1992 a R. C. Beavis, T. Chaudhary, B. T. Chait
Journal of Mass Spectrometry, 1992, 27(2), 156-158
 α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix assisted laser desorption mass spectrometry
- b Ronald C. Beavis
Journal of Mass Spectrometry, 1992, 27(2), 864-868
Phenomenological models for matrix-assisted laser desorption ion yields near the threshold fluence

S.Berkenkamp

- 1996 S. Berkenkamp, M. Karas, F. Hillenkamp
Proceeding of the national academy of sciences, 1996, 93(14), 7003-7007
Ice as a matrix for IR-MALDI: mass spectra from a protein single crystal

V.Bökelmann

- 1995 Volker Bökelmann, Bernhard Spengler, Raimund Kaufmann
European Mass Spectrometry, 1995, 1(1)
Dynamical parameters of ion ejection and ion formation in matrix-assisted laser desorption/ionization

S.Bourcier

- 2001 Sophie Bourcier, Stéphane Bouchonnet, Yannik Hoppilliard
International Journal of Mass Spectrometry, 2001, 210, 59-69
Ionization of 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) matrix-assisted laser desorption ionization experiments and theoretical study 1 1 Dedicated to Professor Nico Nibbering, one of the best mass spectrometrists in the world and certainly the most friendly
- 2002 Sophie Bourcier, Yannik Hoppilliard
International Journal of Mass Spectrometry, 2002, 217(1), 231-244
B3LYP DFT molecular orbital approach, an efficient method to evaluate the thermochemical properties of MALDI matrices

P.C.Burgers

- 1998 P.C.Burgers, J.K.Terlouw
Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1998, 12, 801-804
Monoisotopic $^{65}\text{Cu}^+$ attachment to polystyrene

W.I.Burkitt

- 2003 William I. Burkitt, Anastassios E. Giannakopoulos, Foteini Sideridou, Sajid Bashir, Peter J. Derrick
Australian Journal of Chemistry, 2003, 56(5), 369-377
Discrimination Effects in MALDI-MS of Mixtures of Peptides—Analysis of the Proteome

R.M.Caprioli

- 1997 R.M. Caprioli, T.B. Farmer, J. Gile
Analytical chemistry, 1997, 69(23), 4751-4760
Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOS MS

S.R.Carr

Développement et caractérisation de techniques pour l'amélioration de la sensibilité et de la résolution spatiale des sources MALDI : Désolvatation laser et masques.

- 1996 Scott R. Carr, Carolyn J. Cassady
Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 1996, 7(12), 1203-1210
Gas-phase basicities of histidine and lysine and their selected di- and tripeptides
- 1997 Scott R. Carr, Carolyn J. Cassady
Journal of Mass Spectrometry, 1997, 32(9), 959-967
Reactivity and gas - phase acidity determinations of small peptide ions consisting of 11 to 14 amino acid residues

X.Chen

- 1998 X.Chen, J.A.Carroll, R.C.Beavis
Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1998, 9, 885-891
Near ultraviolet induced MALDI as a function of wavelength

Y.Chen

- 2006 Y.Chen, A.Vertes
Analytical chemistry, 2006, 78, 5835-5844
Adjustable fragmentation in laser desorption/ionization from laser-induced silicon microcolumn arrays

A.A.Chernoy

- 1989 A. A. Chernov
Contemporary Physics - CONTEMP PHYS , vol. 30, no. 4, pp. 251-276, 1989
Formation of crystals in solution

M.R.Chevrier

- 1991 M.R.Chevrier, R.J.Cotter
Rapid communications in mass spectrometry, 1991, 5, 611-617
A MALD TOF MS based on a 600 ps, 1,2 mJ nitrogen laser

M.P.Chiarelli

1993 M.P.Chiarelli, A.G.Sharkey, D.M.Hercules

Analytical chemistry, 1993, 65, 307-311

Excited-state proton transfer in laser MS

C.W.Chou

1999 Chau-Wen Chou, Peter Williams, Patrick A. Limbach

International Journal of Mass Spectrometry, 1999, 193(1), 15-27

Matrix influence on the formation of positively charged oligonucleotides in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry

R.Cramer

1997 R.Cramer, R.F.Haglund Jr., F.Hillenkamp

International journal of mass spectrometry, 1997, 169/170, 51-67

Matrix-assisted laser desorption and ionization in the O-H and C=O absorption bands of aliphatic and aromatic matrices: dependence on laser wavelength and temporal beam profile

2013 R.Cramer, A.Pirkel, F.Hillenkamp, K.Dreisewerd

Angewandte Chemie-international Edition, 2013, 52, 2364-2367

Liquid AP-UV-MALDI enables stable ion yields of multiply charged peptide and protein ions for sensitive analysis by mass spectrometry

M.Dashtiev

2007 M.Dashtiev, E.Wäfler, U.Röhling, M.Gorshkov, F.Hillenkamp, R.Zenobi

International journal of mass spectrometry, 2007, 268(2), 122-130

Positive and negative analyte ion yield in matrix-assisted laser desorption/ionization

M.J.Deery

1997 Michael J. Deery, Keith R. Jennings, Christina B. Jasieczek, David M. Haddleton, Anthony T. Jackson, Hilary T. Yates, James H. Scrivens

Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1997, 11(1), 57-62

A Study of Cation Attachment to Polystyrene by Means of Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization and Electrospray Ionization-Mass Spectrometry

Développement et caractérisation de techniques pour l'amélioration de la sensibilité et de la résolution spatiale des sources MALDI : Désolvatation laser et masques.

A.Delcorte

- 2002 A. Delcorte, N. Médard, P. Bertrand
Analytical Chemistry, 2002, 74(19), 4955-4968
Organic Secondary Ion Mass Spectrometry: Sensitivity Enhancement by Gold Deposition

P.Demirev

- 1992 P.Demirev, A.Westman, C.T.Reimann, P.Hakansson, D.Barofsky, B.U.R.Sundqvist, Y.D.Cheng, W.Seibt, K.Siegbahn
Rapid communications in mass spectrometry, 1992, 6, 187-191
MALD with ultra-short laser pulses

D.L.Dexter

- 1965 D. L. Dexter, R. S. Knox, Joseph L. Katz
Physics Today, 1965, 18(10), 62
Excitons

M.Dole

- 1968 M.Dole, L.L.Mack, R.L.Hines, R.C.Mobley, L.D.Ferguson, M.B.Alice
Chemical Physics, 1968, 49, 2240-2249
Molecular beams of macroions

T.W.Dominic Chan

- 1991 T. W. Dominic Chan, A. W. Colburn, Peter J. Derrick
Journal of Mass Spectrometry, 1991, 26(4), 342-344
Matrix-assisted UV laser desorption. Suppression of the matrix peaks
- 1992 T. W. Dominic Chan, A. W. Colburn, Peter J. Derrick
Journal of Mass Spectrometry, 1992, 27(1), 53-56
Matrix-assisted laser desorption/ionization using a liquid matrix: Formation of high-mass cluster ions from proteins

T.Donovan

- 1998 Tracy Donovan McCarley, Robin L. McCarley, Patrick A. Limbach

Analytical Chemistry, 1998, 70(20), 4376-4379

Electron-Transfer Ionization in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry

K.Dreisewerd

1995 Klaus Dreisewerd, Martin Schürenberg, Michael Karas, Franz Hillenkamp
International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1995, 141(2), 127-148
Influence of the laser intensity and spot size on the desorption of molecules and ions in matrix-assisted laser desorption/ionization with a uniform beam profile

1996 K.Dreisewerd, M.Schürenberg, M.Karas, F.Hillenkamp
International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1996, 154, 171-178
MALDI with nitrogen lasers of different pulse widths

H.Ehring

1992 H.Ehring, M.Karas, F.Hillenkamp
Organic mass spectrometry, 1992, 27, 427-480
Role of photoionisation and photochemistry in ionization processes of organic molecules and relevance for MALDI MS

W.J.Erb

2006 William J. Erb, Scott D. Hanton, Kevin G. Owens
Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2006, 20(14), 2165-2169
A study of gas-phase cationization in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

I.Fournier

2002 a I.Fournier, A.Brunot, J.C.Tabet, G.Bolbach
International journal of mass spectrometry, 2002, 213, 203-215
Delayed extraction experiments using a repulsive potential before ion extraction: evidence of clusters as ion precursors in UV-MALDI. Part 1: dynamical effects with the matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid

b I.Fournier, J.C.Tabet, G.Bolbach
International journal of mass spectrometry, 2002, 219, 515-523

Développement et caractérisation de techniques pour l'amélioration de la sensibilité et de la résolution spatiale des sources MALDI : Désolvatation laser et masques.

Irradiation effect in MALDI and surface modifications. Part I: sinapinic acid monocrystals

- 2003 I.Fournier, C.Marinach, J.C.Tabet, G.Bolbach
Journal of American society for mass spectrometry, 2003, 14, 893-899
Irradiation effects in MALDI, ablation, ion production, and surface modifications. Part II: 2,5-dihydroxybenzoic acid monocrystals
- 2005 I. Fournier, A. Brunot, J.C. Tabet, G. Bolbach
Journal of mass spectrometry, 2005, 40, 50-59
Delayed extraction experiments using a repulsing potential before ion extraction: evidence of non-covalent clusters as ion precursor in UV matrix-assisted laser desorption/ionization. Part II – dynamic effects with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix

D.B. Geohegan

- 1996 D.B.Geohegan, A.A.Puretzky
Applied surface science, 1996, 96/98, 131-138
Laser ablation plume thermalization dynamics in background gases: combined imaging, optical absorption and emission spectroscopy, and ion probe measurements

M.E.Gimon

- 1992 M.E.Gimon, L.M.Preston, T.Solouki, M.A.White, D.H.Russel
Organic mass spectrometry, 1992, 27, 827-830
Are proton transfer reactions of excited states involved in UV LDI?

M.Glückmann

- 1999 Matthias Glückmann, Michael Karas
Journal of Mass Spectrometry, 1999, 34(5), 467-477
The initial ion velocity and its dependence on matrix, analyte and preparation method in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization

G.Grigorean

- 1996 G. Grigorean, R.I. Carey, I.J. Amster
European mass spectrometry, 1996, 2, 139-143

Studies of exchangeable protons in the matrix-assisted laser desorption/ionization process

S.Guenther

- 2010 S.Guenther, M.Koestler, O.Schulz, B.Spengler
International journal of mass spectrometry, 2010, 294, 7-15
Laser spot size and laser power dependence of ion formation in high resolution MALDI imaging

S.D.Hanton

- 2004 Scott D. Hanton, Ingrid Z. Hyder, James R. Stets, Kevin G. Owens, William R. Blair, Charles M. Guttman, Anthony A. Giuseppetti
Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 2004, 15(2), 168-179
Investigations of electrospray sample deposition for polymer MALDI mass spectrometry

A.G.Harrison

- 1997 Alex. G. Harrison
Mass Spectrometry Reviews, 1997, 16(4), 201-217
The gas-phase basicities and proton affinities of amino acids and peptides

A.M.Hoberg

- 1997 A.-M. Hoberg, D.M. Haddleton, P.M.Derrick
European mass spectrometry, 1997, 3, 471-473
Evidence for cationization of polymers in the gas phase during MALDI

A.Holle

- 2006 Armin Holle, Andreas Haase, Markus Kayser, Jens Höhndorf
Journal of Mass Spectrometry, 2006, 41(6), 705-716
Optimizing UV laser focus profiles for improved MALDI performance

V.Horneffer

- 1999 V. Horneffer, K. Dreisewerd, H.-C. Lüdemann, F. Hillenkamp, M. Läge, K. Strupat
Développement et caractérisation de techniques pour l'amélioration de la sensibilité et de la résolution spatiale des sources MALDI : Désolvatation laser et masques.

International journal of mass spectrometry, 1999, 185(3), 859-870

Is the incorporation of analytes into matrix crystals a prerequisite for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry? A study of five positional isomers of dihydroxybenzoic acid 2 2 Dedicated to Professor Michael T. Bowers on the occasion of his 60th birthday

2001 Verena Horneffer, Andre Forsmann, Kerstin Strupat, Franz Hillenkamp, Ulrich Kubitscheck

Analytical Chemistry, 2001, 73(5), 1016-1022

Localization of Analyte Molecules in MALDI Preparations by Confocal Laser Scanning Microscopy

2003 V.Horneffer, R.Reichelt, K.Strupat

International journal of mass spectrometry, 2003, 226, 117-131

Protein incorporation into MALDI-matrix crystals investigated by high resolution field emission scanning electron microscopy

A.J.Hoteling

2005 A.J.Hoteling, K.G.Owens

53rd ASMS conference on mass spectrometry and allied topics, 2005

Cationization of polymers in MALDI/ToFMF investigations of salt-to-analyte ratio

2006 Andrew J. Hoteling, William F. Nichols, David J. Giesen, Jerome R. Lenhard, Richard Knochenmuss

European journal of mass spectrometry, 2006, 12, 345-358

Electron transfer reactions in laser desorption/ionization and matrix-assisted laser desorption/ionization: factors influencing matrix and analyte ion intensities

A.Ingendoh

1994 A.Ingendoh, M.Karas, F.Hillenkamp, U.Giessmann

International journal of mass spectrometry, 1994, 131, 345-354

Factors affecting the resolution in matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry

E.D.Inutan

2011 E.D.Inutan, B.Wang, S.Trimpin

Analytical chemistry, 2011, 83, 678-684

Commercial intermediate pressure MALDI ion mobility spectrometry mass spectrometer capable of producing highly charged laserspray ionization ions

J.V.Iribarne

1976 J.V.Iribarne, B.A.Thomson
Chemical Physics, 1976, 64, 2287-2294
On the evaporation of small ions from charged droplets

T.W.Jaskolla

2008 Thorsten W. Jaskolla, Wolf-Dieter Lehmann, Michael Karas
Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105, 12200-12205
4-Chloro- α -cyanocinnamic acid is an advanced, rationally designed MALDI matrix

P.Juhasz

1993 Peter Juhasz, Catherine E. Costello
Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1993, 7(5), 343-351
Generation of large radical ions from oligometallocenes by matrix-assisted laser desorption ionization

J.C.Jurchen

2005 John C. Jurchen, Stanislav S. Rubakhin, Jonathan V. Sweedler
Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 2005, 16(10), 1654-1659
MALDI-MS imaging of features smaller than the size of the laser beam

J.Kampmeier

1997 Jurgen Kampmeier, Klaus Dreisewerd, Martin Schürenberg, Kerstin Strupat
International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1997, 169, 31-41
Investigations of 2,5-DHB and succinic acid as matrices for IR and UV MALDI. Part: I UV and IR laser ablation in the MALDI process

M.Karas

1987 M.Karas, D.Bachmann, U.Bahr, F.Hillenkamp
International journal of mass spectrometry, 1987, 78, 53-68

Développement et caractérisation de techniques pour l'amélioration de la sensibilité et de la résolution spatiale des sources MALDI : Désolvatation laser et masques.

MA-UV-LD of non-volatile compounds

- 1988 M. Karas, F. Hillenkamp
Analytical chemistry, 1988, 60, 2299
Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 daltons
- 1991 M. Karas, U. Bahr, U. Gießmann
Mass spectrometry review, 1991, 10 (5), 335-357
Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry
- 2000 M.Karas, M.Glückmann, J.Schäfer
Journal of mass spectrometry, 2000, 35, 1-12
Ionization in MALDI, singly charged molecular ions are the lucky survivors

V.I.Karataev

- 1972 V. I. Karataev, B. A. Mamyrin, D. V. Shmikk
Soviet physics, 1972, 16, 1177
New Method for Focusing Ion Bunches in Time-of-Flight Mass Spectrometers

V.Karbach

- 1998 Volker Karbach, Richard Knochenmuss
Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1998, 12(14), 968-974
Do single matrix molecules generate primary ions in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization

G.R.Kinsel

- 2002 Gary R. Kinsel, Richard Knochenmuss, Patrick Setz, C. Mark Land, Sor-Koon Goh, Edet F. Archibong, Jon H. Hardesty, Dennis S. Marynick
Journal of Mass Spectrometry, 2002, 37(11), 1131-1140
Ionization energy reductions in small 2,5-dihydroxybenzoic acid-proline clusters
- 2004 Gary R. Kinsel, Qingchun Zhao, Jayakumar Narayanasamy, Faten Yassin, H. V. Rasika Dias, Bradley Niesner, Katherine Prater, Chris St. Marie, Le Ly, Dennis S. Marynick
Journal of Physical Chemistry A, 2004, 108(15), 3153-3161
Arginine/2,5-Dihydroxybenzoic Acid Clusters: An Experimental and Computational Study of the Gas-Phase and Solid-State Systems

R.Knochenmuss

- 1996 R.Knochenmuss, F.Dubois, M.J.Dale, R.Zenobi
Rapid communication of mass spectrometry, 1996, 10, 871-877
The matrix suppression effect and ionization mechanisms in matrix-assisted laser desorption/ionization
- 1998 a Richard Knochenmuss, Edda Lehmann, Renato Zenobi
European Mass Spectrometry, 1998, 4(6), 421-426
Polymer cationization in matrix-assisted laser desorption/ionization
- b Richard Knochenmuss, Volker Karbach, Ursula Wiesli, Kathrin Breuker, Renato Zenobi
Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1998, 12(9), 529-534
The matrix suppression effect in matrix-assisted laser desorption/ionization: application to negative ions and further characteristics
- 2000 R. Knochenmuss, A. Stortelder, K. Breuker, R. Zenobi
Journal of Mass Spectrometry, 2000, 35(11), 1237-1245
Secondary ion-molecule reactions in matrix-assisted laser desorption/ionization
- 2002 R.Knochenmuss
Journal of mass spectrometry, 2002, 37, 867-877
A quantitative model of UV-MALDI
- 2004 R.Knochenmuss
Analytical chemistry, 2004, 76, 3179-3184
Photoionization pathways and free electrons in UV-MALDI
- 2005 R.knochenmuss, L.V.Zhigilei
Journal of physical chemistry B, 2005, 109, 22947-22957
Molecular dynamics model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization including ionization processes
- 2006 a R.Knochenmuss
Analyst, 2006, 131, 966-986
Ion formation mechanisms in UV-MALDI
- b R. Knochenmuss, G. McCombie, M. Faderl
Journal of Physical Chemistry A, 2006, 110(47), 12728-12733

Développement et caractérisation de techniques pour l'amélioration de la sensibilité et de la résolution spatiale des sources MALDI : Désolvatation laser et masques.

Ion Yields of Thin MALDI Samples: Dependence on Matrix and Metal Substrate and Implications for Models

2009 R.Knochenmuss

European journal of mass spectrometry, 2009, 15, 189-198

Laser desorption/ablation plumes from capillary-like restricted volumes

2010 R.Knochenmuss, L.V.Zhigilei

Journal of mass spectrometry, 2010, 45, 333-346

Molecular dynamics simulations of MALDI: laser fluence and pulse width dependence of plume characteristics and consequences for matrix and analyte ionization

2012 R.Knochenmuss, L.V.Zhigilei

Analytical and bioanalytical chemistry, 2012, 402, 2511-2519

What determines MALDI ion yields? A molecular dynamics study of ion loss mechanisms

J.Krause

1996 J. Krause, M.Stoeckli, U.P. Schlunegger

Rapid communications in mass spectrometry, 1996, 10, 1927-1933

Studies on the selection of new matrices for UV-MALDI-ToF MS

R.Krüger

2001 Ralf Krüger, Anja Pfenninger, Isabelle Fournier, Matthias Glückmann, Michael Karas

Analytical Chemistry, 2001, 5873(24), 5812-5821

Analyte Incorporation and Ionization in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Visualized by pH Indicator Molecular Probes

A.N.Krutchinsky

2002 A.N. Krutchinsky, B.T. Chait

Journal of American society for mass spectrometry, 2002, 13, 129-134

On the nature of the chemical noise in MALDI mass spectra

M.Kussmann

- 1997 M. Kussmann, E. Nordhoff, H. Rahbek-Nielsen, S. Haebel, M. Rossel-Larsen, L. Jakobsen, J. Gobom, E. Mirgorodskaya, A. Kroll-Kristensen, L. Palm, P. Roepstorff
Journal of mass spectrometry, 1997, 32, 593-601
MALDI MS sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes

C.M.Land

- 1998 C. M. Land, G. R. Kinsel
Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 1998, 9(10), 1060-1067
Investigation of the mechanism of intracluster proton transfer from sinapinic acid to biomolecular analytes
- 2001 C. Mark Land, Gary R. Kinsel
Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2001, 12(6), 726-731
The mechanism of matrix to analyte proton transfer in clusters of 2,5-dihydroxybenzoic acid and the tripeptide VPL

P.Lecchi

- 2005 Paolo Lecchi, Matthew Olson, Francesco L. Brancia
Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 2005, 16(8), 1269-1274
The role of esterification on detection of protonated and deprotonated peptide ions in matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry (MS)

E.Lehmann

- 1997 Edda Lehmann, Richard Knochenmuss, Renato Zenobi
Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1997, 11(14), 1483-1492
Ionization mechanisms in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: contribution of pre-formed ions

A.Leisner

- 2005 A.Leisner, A.Rohlfing, U.Röhling, K.Dreisewerd, F.Hillenkamp
Journal of physical chemistry, 2005, 109, 11661-11666
Time-resolved imaging of the plume dynamics in infrared matrix-assisted laser desorption/ionization with a glycerol matrix

Développement et caractérisation de techniques pour l'amélioration de la sensibilité et de la résolution spatiale des sources MALDI : Désolvatation laser et masques.

L.Li

1996 L.Li, R.E.Golding, R.M.Whittal

Journal of American chemical society, 1996, 118, 11662

Analysis of single mammalian cell lysates by mass spectrometry

P.C.Liao

1995 Pao-Chi Liao, John Allison

Journal of Mass Spectrometry, 1995, 30(3), 408-423

Ionization processes in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: Matrix-dependent formation of $[M + H]^+$ vs $[M + Na]^+$ ions of small peptides and some mechanistic comments

R.Lidgard

1995 Ray Lidgard, Mark W. Duncan

Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1995, 9(2), 128-132

Utility of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the analysis of low molecular weight compounds

Q.Lin

2001 Qiong Lin, Richard Knochenmuss

Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2001, 15(16), 1422-1426

Two-photon ionization thresholds of matrix-assisted laser desorption/ionization matrix clusters

H.C.Lüdemann

2000 H.-C.Lüdemann, F.Hillenkamp, R.Redmond

Journal of physical chemistry A, 2000, 104, 3884-3893

Photoinduced hydrogen atom transfer in salicylate acid derivatives used as MALDI matrices

2002 H.-C.Lüdemann, R.W.Redmond, F.Hillenkamp

Rapid communications in mass spectrometry, 2002, 16, 1287-1294

Singlet-singlet annihilation in UV-MALDI studied by fluorescence spectroscopy

A.F.Maarten Altelaar

- 2006 A. F. Maarten Altelaar, Ivo Klinkert, Kees Jalink, Robert P. J. de Lange, Roger A. H. Adan, Ron M. A. Heeren, Sander R. Piersma
Analytical Chemistry, 2006, 78(3), 734-742
Gold-enhanced biomolecular surface imaging of cells and tissue by sims and maldi mass spectrometry
- 2007 A. F. Maarten Altelaar, Ioana M. Taban, Liam A. McDonnell, Peter D. E. M. Verhaert, Robert P. J. de Lange, Roger A. H. Adan, Wolter J. Mooi, Ron M. A. Heeren, Sander R. Piersma
International Journal of Mass Spectrometry, 2007, 260(2), 203-211
High-resolution MALDI imaging mass spectrometry allows localization of peptide distributions at cellular length scales in pituitary tissue sections

S.F.Macha

- 1999 Stephen F. Macha, Tracy D. McCarley, Patrick A. Limbach
Analytica Chimica Acta, 1999, 397(1), 235-245
Influence of ionization energy on charge-transfer ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry

B.A.Mamyrin

- 1973 B. A. Mamyrin, V. I. Karataev, D. V. Shmikk, V. A. Zagulin
Soviet physics - Journal of Experimental and Theoretical Physics, 1973, 37, 45
The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution
- 1979 B. A. Mamyrin, D. V. Shmikk
Soviet physics - Journal of Experimental and Theoretical Physics, 1979, 49, 762
The linear mass reflection

G.McCombie

- 2004 Gregor McCombie, Richard Knochenmuss
Analytical Chemistry, 2004, 76(17), 4990-4997

Développement et caractérisation de techniques pour l'amélioration de la sensibilité et de la résolution spatiale des sources MALDI : Désolvatation laser et masques.

Small-Molecule MALDI Using the Matrix Suppression Effect to Reduce or Eliminate Matrix Background Interferences

2006 Gregor McCombie, Richard Knochenmuss

Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 2006, 17(5), 737-745

Enhanced MALDI ionization efficiency at the metal-matrix interface: Practical and mechanistic consequences of sample thickness and preparation method

C.N.McEwen

2010 C.N.McEwen, B.S.Larsen, S.Trimpin

Analytical chemistry, 2010, 82, 4998-5001

Laserspray ionization on a commercial atmospheric pressure-MALDI mass spectrometer ion source: selecting singly or multiply charges ions

A.Meffert

2001 A.Meffert, J.Grotemeyer

International journal of mass spectrometry, 2001, 210/211, 521-530

Dissociative proton transfer in cluster ions: clusters of aromatic carboxylic acids with amino acids

T.H.Mize

2004 Todd H. Mize, Liam A. McDonnell, Ron M. A. Heeren

Analytical Chemistry, 2004, 76(18), 5339-5344

High-Spatial Resolution Mass Spectrometric Imaging of Peptide and Protein Distributions on a Surface

R.Nayak

2007 R.Nayak, D.R.Knapp

Analytical chemistry, 2007, 79, 4950-4956

Effects of thin-film structural parameters on laser desorption/ionization from porous alumina

R.W.Nelson

1992 Randall W. Nelson, T. William Hutchens

Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1992, 6(1), 4-8

Mass spectrometric analysis of a transition-metal-binding peptide using matrix-assisted laser-desorption time-of-flight mass spectrometry. A demonstration of probe tip chemistry

T.Nishikaze

2006 Takashi Nishikaze, Mitsuo Takayama

Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2006, 20(3), 376-382

Cooperative effect of factors governing molecular ion yields in desorption/ionization mass spectrometry

S.Niu

1998 S.Niu, W.Zhang, B.T.Chait

Journal of American society for mass spectrometry, 1998, 9, 1-7

Direct comparison of IR and UV wavelength MALDI MS of proteins

E.Nordhoff

2007 Eckhard Nordhoff, Hans Lehrach, Johan Gobom

International Journal of Mass Spectrometry, 2007, 268(2), 139-146

Exploring the limits and losses in MALDI sample preparation of attomole amounts of peptide mixtures

Z.Olumeo

1998 Zohra Olumeo, Akos Vertes

Journal of Physical Chemistry B, 1998, 102(31), 6118-6122

Protonation of Gly n Homologues in Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization

G.A.Pallante

2002 Giovanni A Pallante, Carolyn J Cassady

International Journal of Mass Spectrometry, 2002, 219(1), 115-131

Développement et caractérisation de techniques pour l'amélioration de la sensibilité et de la résolution spatiale des sources MALDI : Désolvatation laser et masques.

Effects of peptide chain length on the gas-phase proton transfer properties of doubly-protonated ions from bradykinin and its N-terminal fragment peptides

M.R.Papantonakis

2002 M.R.Papantonakis, J.Kim, W.P.Hess, R.F.Haglund

Journal of mass spectrometry, 2002, 37, 639-647

What do MALDI mass spectra reveal about ionization mechanisms ?

U.Pieles

1993 U.Pieles, W.Zurcher, M.Schar, H.E.Moser

Nucleic acid research, 1993, 21(14), 3191-3196

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides

S.A.Pshenichnyuk

2003 a S.A. Pshenichnyuk, N.L.Asfandiarov, V.S.Fal'ko, V.G.Lukin

International journal of mass spectrometry, 2003, 227(2), 281-288

Temperature dependence of dissociative electron attachment to molecules of gentisic acid, hydroquinone and p-benzoquinone

b S.A. Pshenichnyuk, N.L.Asfandiarov, V.S.Fal'ko, V.G.Lukin

International journal of mass spectrometry, 2003, 272(2), 259-272

Temperature dependencies of negative ions formation by capture of low-energy electrons for some typical MALDI matrices

A.A.Puretzky

1998 a A.A.Puretzky, D.B.Geohegan

Applied surface science, 1998, 127/129, 248-254

LIF imaging and gas-phase diagnostics of laser desorbed MALDI-matrix plumes

b A.A.Puretzky, D.B.Geohegan

Chemical physics letters, 1998, 286, 425-432

Gas-phase diagnostics and LIF-imaging of 3-hydroxypicolinic acid maldi-matrix plumes

1999 A.A.Puretzky, D.B.Geohegan, G.B.Hurst, M.V.Buchanan, R.S.Luk'yanchuk

Physics review letters, 1999, 83(2), 444-447

Imaging of vapour plumes produced by matrix assisted laser desorption: a plume sharpening effect

H.Rashidezadeh

1998 H. Rashidezadeh, Baochuan Guo

Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 1998, 9(7), 724-730

Investigation of metal attachment to polystyrenes in matrix-assisted laser desorption ionization

K.Riahi

1994 Karim Riahi, Gérard Bolbach, Alain Brunot, Francis Breton, Marenglen Spiro, Jean-Claude Blais

Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1994, 8(3), 242-247

Influence of laser focusing in matrix-assisted laser desorption/ionization

E.Sachon

2007 E.Sachon, G.Clodic, T.Blasco, G.Bolbach

Journal of American society for mass spectrometry, 2007, 18, 1880-1890

Protein desolvation in UV matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)

A.Scherl

2005 Alexander Scherl, Catherine G. Zimmermann-Ivol, Joel Di Dio, Ali R. Vaezzadeh, Pierre-Alain Binz, Michel Amez-Droz, Roland Cochard, Jean-Charles Sanchez, Denis F. Hochstrasser

Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005, 19(5), 605-610

Gold coating of non-conductive membranes before matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometric analysis prevents charging effect

P.Setz

Développement et caractérisation de techniques pour l'amélioration de la sensibilité et de la résolution spatiale des sources MALDI : Désolvatation laser et masques.

2005 P.Setz, R.Knochenmuss
Journal of physical chemistry A, 2005, 109, 4030-4037
Exciton mobility and trapping in a UV-MALDI matrix

B.Spengler

1992 B.Spengler, R.Kaufmann
Analysis, 1992, 20, 91-101
Gentle probe for tough molecules: MALDI MS

2002 Bernhard Spengler, Martin Hubert
Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 2002, 13(6), 735-748
Scanning microprobe matrix-assisted laser desorption ionization (SMALDI) mass spectrometry: Instrumentation for sub-micrometer resolved LDI and MALDI surface analysis

W.E.Stephens

1946 W.E.Stephens
Physical review, 1946, 69, 691
A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion

A.V.Streletskii

2005 Alexey V. Streletskii, Ilya N. Ioffe, Sotirios G. Kotsiris, Mark P. Barrow, Thomas Drewello, Steven H. Strauss, Olga V. Boltalina
Journal of Physical Chemistry A, 2005, 109(4), 714-719
In-Plume Thermodynamics of the MALDI Generation of Fluorofullerene Anions

K.Strupat

1991 K.Strupat, M.Karas, F.Hillenkamp
International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1991, 111, 89-102
2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption--ionization mass spectrometry

J.Sunner

- 1995 Jan. Sunner, Edward. Dratz, Yu-Chie. Chen
 Analytical Chemistry, 1995, 67(23), 4335-4342
Graphite surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides and proteins from liquid solutions

V.L.Talroze

- 2000 V.L.Talroze, R.L.Jacob, A.L.Burlingame, M.A.Baldwin
 48th ASMS conference on mass spectrometry and allied topics, 2000
Experimental examination of the thermodynamic basis of MALDI
- 2001 a Talroze, V. L.; Jacob, R. L.; Burlingame, A. L.; Leipunsky, I. O.; Baldwin, M. A.
 49th ASMS conference on mass spectrometry and allied topics 2001
A new theory of MALDI: laser induced soft thermal dissociation of the matrix plays a decisive role in plume formation
- b Talroze, V. L.; Jacob, R. L.; Burlingame, A. L.; Baldwin, M. A.
 Advanced mass spectrometry, 2001, 15, 481-482
Insight into the MALDI mechanism: matrix decomposition and pneumatic assistance in plume formation
- 2003 Talroze, V. L.; Leipunsky, I. O.; Burlingame, A. L.; Baldwin, M. A.
 51 st ASMS conference on mass spectrometry and allied topics 2003
Modeling nanosecond non-activated thermal decay of MALDI matrices containing preformed analyte ions and partially ionized matrix molecules as the origin of pneumatic assistance
- 2004 Talroze, V. L.; Leipunsky, I. O.; Burlingame, A. L.; Baldwin, M. A.
 52nd ASMS conference on mass spectrometry and allied topics 2004
The thermal mechanism of MALDI- a refined quantitative model with experimental validation

K.Tanaka

- 1988 K.Tanaka, H.Waki, Y.Ido, S.Akita, Y.Yoshida, T.Yoshida
 Rapid communications in mass spectrometry, 1988, 2(8), 151-153
Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry

Développement et caractérisation de techniques pour l'amélioration de la sensibilité et de la résolution spatiale des sources MALDI : Désolvatation laser et masques.

S.Trimpin

- 2011 S.Trimpin, Y.Ren, B.Wang, C.B.Lietz, A.L.Richards, D.D.Marshall, E.D.Inutan
Analytical chemistry, 2011, 83, 5469-5475
Extending the laserspray ionization concept to produce highly charged ions at high vacuum on a time-of-flight mass analyzer

L.Ulmer

- 2000 Lars Ulmer, Jochen Mattay, H. Torres-Garcia, Heinrich Luftmann
European Mass Spectrometry, 2000, 6(1)
The use of 2-[(2E)-3-(4-tert-butylphenyl)-2-methylprop-2-enylidene]malononitrile as a matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry

M.-L.Valero

- 1999 Mari-Luz Valero, Ernest Giralt, David Andreu
Letters in peptide science, 1999, 6(2), 109-115
An investigation of residue-specific contributions to peptide desorption in MALDI-TOF mass spectrometry

P.A. Van Veelen

- 1993 P.A. van Veelen, C.R. Jimenez, K.W. Li, W.C. Wildering, W.P.M. Gerearts, U.R. Tjaden
Journal of organic mass spectrometry, 1993, 28, 1542-1546
Direct peptide profiling of single neurons by MALDI MS

F.J.Vastola

- 1970 F.J.Vastola, R.O.Mumma, A.J.Pirone
Journal of mass spectrometry, 1970, 3(1), 101-104
Analysis of inorganic salts by laser ionization

M.L.Vestal

- 1995 M. L. Vestal, P. Juhasz, S. A. Martin
Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1995, 9(11), 1044-1050
Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry

A.Verentchikov

- 1999 A.Verentchikov, I.Smirnov, M.L.Vestal
Proceedings of the 47th ASMS conference on mass spectrometry and allied topics,
Dallas, TX, June 13-17, 1999
*Collisional cooling and ion formation processes in orthogonal MALDI at
intermediate gas pressure*

O.Vorm

- 1994 O.Vorm, P.Roepstorff, M.Mann
Analytical chemistry, 1994, 66, 3281-3287
*Improved resolution and very high sensitivity in MALDI TOF of matrix surfaces made
by fast evaporation*

B.N.Walker

- 2010 B.N.Walker, J.A.Stolee, D.L.Pickel, S.T.Retterer, A.Vertes
Journal of physical chemistry C, 2010, 114, 4835-4840
Tailored silicon nanopost arrays for resonant nanophotonic ion production

B.H.Wang

- 1993 Bing H. Wang, Klaus Dreisewerd, Ute Bahr, Michael Karas, Franz Hillenkamp
Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 1993, 4(5), 393-398
*Gas-Phase cationization and protonation of neutrals generated by matrix-assisted
laser desorption*

J.Wei

- 1999 J.Wei, J.M.Burlak, G.Siuzdak
Nature, 399, 243, 1999
Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon

H.Wenschuh

- 1998 Holger Wenschuh, Petr Halada, Stephanie Lamer, Peter Jungblut, Eberhard Krause
Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1998, 12(3), 115-119
The ease of peptide detection by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: the effect of secondary structure on signal intensity

W.C.Wiley

- 1955 W. C. Wiley, I. H. McLaren
Review of Scientific Instruments, 1955, 26, 1150-1157
Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution
- 1956 W. C. Wiley
Science, 1956, 124, 817-820
Bendix Time-of-Flight Mass Spectrometer

C.K.L.Wong

- 1998 C.K.L. Wong, M.P. So, T.-W.D. Chan
European mass spectrometry, 1998, 4, 223-232
Origins of the proton in the generation of protonated polymers and peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization

A.S.Woods

- 1995 A. S. Woods, J. C. Buchsbaum, T. A. Worrall, J. M. Berg, R. J. Cotter
Analytical Chemistry, 1995, 67(24), 4462-4465
Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization of Noncovalently Bound Compounds

F.Xiang

- 1994 Fan Xiang, Ronald C. Beavis, Werner Ens
Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1994, 8(2), 199-204
A method to increase contaminant tolerance in protein matrix-assisted laser desorption/ionization by the fabrication of thin protein-doped polycrystalline films

T.Yalcin

- 1997 Talat Yalcin, David C. Schriemer, Liang Li
Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 1997, 8(12), 1220-1229
Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the analysis of polydienes

F.H.Yassin

- 2003 Faten H. Yassin, Dennis S. Marynick
Journal of Molecular Structure-theochem, 2003, 629(1), 223-235
Computational estimates of the gas-phase acidities of dihydroxybenzoic acid radical cations and their corresponding neutral species
- 2005 Faten H. Yassin, Dennis S. Marynick
Molecular Physics, 2005, 103(2-3), 183-189
Computational estimates of the gas-phase basicities, proton affinities and ionization potentials of the six isomers of dihydroxybenzoic acid
- 2006 Faten H. Yassin, Dennis S. Marynick
Journal of Physical Chemistry A, 2006, 110(10), 3820-3825
Computational Study of Matrix–Peptide Interactions in MALDI Mass Spectrometry: Interactions of 2,5- and 3,5-Dihydroxybenzoic Acid with the Tripeptide Valine–Proline–Leucine

H.Yong

- 1998 H.Yong
International journal of mass spectrometry, 1998, 175, 187-204
Photochemistry and proton transfer reaction chemistry of selected cinnamic acid derivatives in hydrogen bonded environments

G.G.Z.Zhang

- 1999 G.G.Z. Zhang, D.J.W. Grant
International journal of pharmacology, 1999, 181, 61
Incorporation mechanism of guest molecules in crystals : solid solution or inclusion

J.Zhang

Développement et caractérisation de techniques pour l'amélioration de la sensibilité et de la résolution spatiale des sources MALDI : Désolvatation laser et masques.

- 2003 Juan Zhang, Vladimir Frankevich, Richard Knochenmuss, Sebastian D. Friess, Renato Zenobi
Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 2003, 14(1), 42-50
Reduction of Cu(II) in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry
- 2004 Juan Zhang, Renato Zenobi
Journal of Mass Spectrometry, 2004, 39(7), 808-816
Matrix-dependent cationization in MALDI mass spectrometry

Q.Zhang

- 2001 Q.Zhang, H.Zou, Z.Guo, Q.Zhang, X.Chen, J.Ni
Rapid communications in mass spectrometry, 2001, 15, 217-223
Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using porous silicon and silica gel as matrix

X.Zhang

- 1996 Xin Zhang, Carolyn J. Cassady
Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 1996, 7(12), 1211-1218
Apparent gas-phase acidities of multiply protonated peptide ions: Ubiquitin, insulin B, and renin substrate

L.V.Zhigilei

- 1997 a L.V.Zhigilei, P.B.S.Kodali, B.J.Garrison
Chemical physics letters, 1997, 276, 269-273
On the threshold behaviour in laser ablation of organic solids
- b L.V.Zhigilei, P.B.S.Kodali, B.J.Garrison
Journal of physical chemistry B, 1997, 101, 2028-2037
Molecular dynamics model for laser ablation and desorption of organic solids
- 2000 L.V.Zhigilei, B.J.Garrison
Journal of applied physics, 2000, 88(3), 1281-1298
Microscopic mechanisms of laser ablation of organic solids in the thermal and stress confinement irradiation regimes
- 2003 L.V.Zhigilei, E.Leveugle, B.J.Garrison, Y.G.Yingling, M.I.Zeifman
Chemical review, 2003, 103, 321-347
Computer simulations of laser ablation of molecular substrates

M.Ziskind

2004 M.Ziskind, C.Mihesan, N.Lebrun, B.Chazallon, C.Focsa, J.L.Destombes

Applied physics A-materials science & processing, 2004, 79(4), 991-995

Hydrated clusters of organic molecules generated by IR OPO resonant desorption of frozen aqueous solutions

Résumé

La spectrométrie de masse MALDI est une technique devenue incontournable pour l'analyse des biomolécules et largement employée dans de nombreuses applications. Bien que les performances de cette source soient notoires, celles-ci restent encore limitées en particulier en termes de sensibilité ou encore de résolution spatiale pour des applications telles que l'imagerie MALDI MS. En effet, les rendements de production d'ions sont très faibles en MALDI et chutent encore lorsque la résolution spatiale est augmentée (diminution de l'aire irradiée). Ainsi, les objectifs de ces travaux de thèse ont été de développer et d'étudier deux systèmes permettant d'augmenter la sensibilité.

La première partie de ces travaux a donc portée sur la réalisation d'un système permettant la désolvatation des agrégats formés dans le processus MALDI via l'utilisation d'un second faisceau laser interceptant la plume en expansion. Par utilisation d'un laser pulsé émettant à 1064 nm il a été ainsi possible de démontrer une augmentation d'un facteur 2 à 3 de l'intensité des signaux d'analyte.

Dans une seconde partie un système de masques de silicium permettant de réduire les dimensions de la zone irradiée (sans agir sur la focalisation du faisceau laser) a été développé. Les études réalisées pour différentes géométries de ces masques ont permis de démontrer d'une part l'efficacité de ces systèmes pour réduire l'aire de la zone irradiée en coupant le faisceau laser incident tout en maintenant l'intensité des signaux, et d'autre part que certaines géométries particulières permettaient d'obtenir un effet d'augmentation de la sensibilité et de la résolution spectrale.

Abstract

MALDI Mass Spectrometry is an essential tool for biomolecules analysis and is largely employed in various applications. Albeit performances of this ion source are well known, there are still clear limitations in terms of sensitivity and spatial resolution for applications such as MALDI MS Imaging. Indeed, ion production yields are very low in MALDI and, moreover drop when spatial resolution is increased (decrease of irradiated area). Thus, objectives of this work were to develop and study two systems for improving sensitivity.

First part of this work was dedicated to setup a system allowing desolvation of material clusters formed in the MALDI process by using a second laser to intercept the expanding plume. By using a pulsed laser emitting at 1064 nm it was possible to demonstrate an increase of signal intensity by 2 to 3 folds.

In a second part, Silicon mask systems allowing reduction of irradiated area (without involving any focusing of the laser beam) was developed. Studies of various geometries of the mask showed their efficiency to reduce irradiated area by cutting part of the laser beam while maintaining signal intensity. Moreover, for certain geometries it was demonstrated that masks could lead to an increase in sensitivity and spectral resolution.