



HAL
open science

Développements Méthodologiques en Spectrométrie de Masse LDI pour l'Analyse de Peptides

Mathieu Dupré

► **To cite this version:**

Mathieu Dupré. Développements Méthodologiques en Spectrométrie de Masse LDI pour l'Analyse de Peptides. Autre. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2012. Français. NNT : 2012MON20069 . tel-01089915

HAL Id: tel-01089915

<https://theses.hal.science/tel-01089915>

Submitted on 2 Dec 2014

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

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

**UNIVERSITÉ MONTPELLIER 2
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

THÈSE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER 2

Discipline : Chimie Organique, Minérale et Industrielle

École doctorale : Sciences Chimiques

Spécialité : Ingénierie moléculaire

Présentée et soutenue publiquement

par

Mathieu DUPRÉ

le 23 novembre 2012

**Développements Méthodologiques en Spectrométrie de
Masse LDI pour l'Analyse de Peptides**

JURY

Mr Gérard Bolbach	Directeur de recherche, Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
Mr Frédéric Aubriet	Professeur, Université de Lorraine	Rapporteur
Mme Julie Hardouin	Maître de conférences, Université de Rouen	Examineur
Mr Yannick Coffinier	Chargé de recherche, Université de Lille 1	Examineur
Mr Jean Martinez	Professeur, Université Montpellier 1	Examineur, Président du jury
Mme Christine Enjalbal	Professeur, Université Montpellier 2	Directeur de thèse

**UNIVERSITÉ MONTPELLIER 2
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

THÈSE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER 2

Discipline : Chimie Organique, Minérale et Industrielle

École doctorale : Sciences Chimiques

Spécialité : Ingénierie moléculaire

Présentée et soutenue publiquement

par

Mathieu DUPRÉ

le 23 novembre 2012

**Développements Méthodologiques en Spectrométrie de
Masse LDI pour l'Analyse de Peptides**

JURY

Mr Gérard Bolbach	Directeur de recherche, Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
Mr Frédéric Aubriet	Professeur, Université de Lorraine	Rapporteur
Mme Julie Hardouin	Maître de conférences, Université de Rouen	Examineur
Mr Yannick Coffinier	Chargé de recherche, Université de Lille 1	Examineur
Mr Jean Martinez	Professeur, Université Montpellier 1	Examineur, Président du jury
Mme Christine Enjalbal	Professeur, Université Montpellier 2	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Avant de présenter le travail qui a été réalisé pendant cette thèse, il est important pour moi d'exprimer toute ma gratitude aux personnes qui ont contribué à faire de ces trois années une aventure enrichissante tant sur un aspect scientifique que sur le plan humain.

Je souhaite tout d'abord exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Jean Martinez pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et me faire l'honneur de participer à ce jury.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Monsieur le Directeur de Recherche Gérard Bolbach pour s'être intéressé à mes travaux lors des différents congrès où nous nous sommes rencontrés et pour avoir accepté de juger ce travail. Je souhaite associer ces remerciements à Monsieur le Professeur Frédéric Aubriet avec qui j'ai également pu échanger, entre autres, sur mon sujet de recherche lors des manifestations scientifiques qui nous ont réunis, pour juger de la qualité de mes travaux.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Madame le Docteur Julie Hardouin pour avoir accepté d'examiner ces travaux, et à Monsieur le Chargé de Recherche Yannick Coffinier, pour faire également parti de mon jury en qualité d'examineur.

J'exprime mes remerciements à tous les collaborateurs qui m'ont permis de mener à bien ce travail : Monsieur le Directeur de Recherche Rabah Boukherroub et Monsieur le Chargé de Recherche Yannick Coffinier (IEMN/IRI Lille), pour leur accueil dans leur laboratoire et les nombreux échanges que nous avons eus (et ce n'est pas fini, il reste du travail !), ainsi que Monsieur le Chargé de Recherche Jean-Olivier Durand (ICG Montpellier) pour m'avoir initié à la synthèse de nanoparticules et pour les collaborations que nous avons pu développer.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Madame le Professeur Christine Enjalbal qui m'a fait l'honneur d'encadrer cette thèse et sans qui je ne serais pas là aujourd'hui. Je lui témoigne ma profonde gratitude pour toutes les connaissances qu'elle m'a transmises, le temps qu'elle m'a toujours accordé, malgré ses très nombreuses occupations (!). Je la remercie aussi pour ses conseils et ses recommandations qui m'ont été précieux et le seront d'autant plus à l'avenir. Plus simplement, merci pour ces trois années passées à ses côtés, aussi bien dans "notre" bureau, que lors des expériences que j'ai pu partager à ses côtés, comme un certain congrès au Japon que je n'oublierai, je pense, jamais...

Je souhaite associer à ces remerciements Madame le Docteur Sonia Cantel pour son accueil (moi qui arrivait dans "le sud" en ne connaissant personne), son encouragement et sa sympathie, sans oublier de la remercier pour m'avoir appris à faire mes premiers dépôts MALDI, apprentissage fort utile étant donné le nombre d'expériences qui a suivi. Je souhaite

aussi remercier Monsieur Pierre Sanchez ("Spectroman") pour m'avoir remis à jour dès mon arrivée sur les techniques ESI-MS.

Je remercie la Société Française de Spectrométrie de Masse pour m'avoir permis de présenter mes travaux lors du congrès de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique (SMAP) de 2011, mais également pour m'avoir apporté un soutien financier me permettant de participer à la Conférence Internationale de Spectrométrie de Masse (IMSC 2012) à Kyoto cette année.

Je ne saurais oublier les deux spécialistes de spectrométrie de masse du Laboratoire de Mesures Physiques aux côtés de qui j'ai passé une grande partie de mon temps d'expérimentation, Guillaume Cazals et Gilles Valette. Je les remercie chaleureusement pour les échanges que nous avons pu avoir, ainsi que les autres membres de l'équipe, Karine, Magalie, Aurélien, Patricia et temporairement Julien.

Je tiens à remercier également Monsieur le Docteur Pascal Verdé pour avoir pris le temps de m'initier à la synthèse peptidique et tous les autres membres du laboratoire de la faculté de Pharmacie pour leur sympathie à cette occasion.

Mes remerciements s'adressent aussi aux autres chercheurs qui m'ont ouvert les portes de leurs laboratoires à différentes occasions pour découvrir leurs environnements de travail et leurs instrumentations : le Directeur de Recherche Christian Larroque et le tout nouveau Docteur Amina Bouslimani (IRCM Montpellier); Messieurs les chercheurs Jean Armengaud, Alain Dedieu et Jean-Charles Gaillard (LBSP CEA Marcoule) ; et Monsieur Jérôme Vialaret (PPC Hôpital Saint-Eloi de Montpellier).

Je voudrais bien sûr remercier l'ensemble des permanents, post-doctorants, doctorants et des stagiaires du laboratoire que j'ai pu côtoyer pendant cette période. Je salue tout particulièrement les "anciens" Manu, Thibault, Alice, Emilie, Sofiane, Christophe et Yoann (foot samedi ??), ceux qui sont toujours présents, Laure (on ne court pas...) et Anaïs (Heyyy ! Non rien...), sans oublier les actuels doctorants (ou les futurs docteurs) avec qui j'ai passé des moments inoubliables, Charlotte (ou la personne à qui demander TOUTES les infos du labo !), Guilhem (maintenant entouré uniquement de filles, courage ! Et allez l'OM !) et Adé (Le Loiret, c'est bien là où se trouve Saint-Etienne ?!). Encore une année pour vous, mais attention, elle va passer très (trop) vite ! Un grand merci spécial également à Rose-Marie. Sans toi, le labo ne serait pas le même, c'est sur !

Enfin, je remercie mes parents, sans qui je ne serais pas là, pour avoir toujours gardé confiance en moi. Je remercie aussi mes deux petits frères qui, j'espère, même si je ne les vois pas très souvent, savent que je pense fort à eux...

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

Publications

1. Investigation of silicon-based nanostructure morphology and chemical termination on LDI-MS performance. Dupré M, Enjalbal C, Cantel S, Martinez J, Megouda N, Hadjersi T, Boukherroub R, Coffinier Y., *Analytical Chemistry* **2012**; 84:10637-10644.
2. Silica nanoparticles pre-spotted onto target plate for LDI mass spectrometry analyses of peptides. Dupré M, Cantel S, Durand J-O, Martinez J, Enjalbal C., *Analytica Chimica Acta* **2012**; 741:47–57.
3. Laser desorption ionization mass spectrometry of protein tryptic digests on nanostructured silicon plates. Dupré M, Coffinier Y, Boukherroub R, Cantel S, Martinez J, Enjalbal C., *Journal of Proteomics* **2012**; 75(7): p. 1973-1990.
4. Occurrence of C-terminal residue exclusion in peptide fragmentation by ESI and MALDI tandem mass spectrometry. Dupré M, Cantel S, Martinez J, Enjalbal C., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2012**; 23:330–46.
5. Sequencing Lys-N proteolytic peptides by ESI and MALDI tandem mass spectrometry. Dupré M, Cantel S, Verdié P, Martinez J, Enjalbal C. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2011**; 22:265–79.

Communications orales

1. LDI-MS of proteolytic synthetic model peptides deposited on silicon-based nanowires: an alternative to MALDI PMF? Dupré M, Coffinier Y, Boukherroub R, Cantel S, Martinez J, Enjalbal C. Congrès français de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique – Avignon – 19-22 Septembre 2011.
2. LDI-MS as alternative methods to sensitive and reproducible peptide detection. Dupré M, Boukherroub R, Durand J-O, Mehdi A., Cantel S, Martinez J, Enjalbal C. Desorption 2010 – Seillac – 30 Mai-3 Juin 2010.

Présentée par un membre de l'équipe : Sequencing Lys-N Proteolytic peptides by ESI and MALDI tandem mass spectrometry. Enjalbal C, Dupré M, Cantel S, Verdié P, Martinez J. 27ème Journées Françaises de Spectrométrie de Masse – Clermont-Ferrand – 13-16 Septembre 2010.

Communication par affiche

1. Peptide mass fingerprinting from silica/silicon based substrates as efficient LDI-MS strategies. Dupré M, Durand J-O, Coffinier Y, Boukherroub R, Cantel S, Martinez J, Enjalbal C. International Mass Spectrometry Conference – Kyoto – 15-21 Septembre 2012.

2. Peptide fragmentation upon low and high energy CID in ESI and MALDI mass spectrometry: A statistical approach. Enjalbal C, Dupré M, Cantel S, Martinez J. International Mass Spectrometry Conference – Kyoto – 15-21 Septembre 2012.
3. Occurrence of C-terminal residue exclusion in peptide fragmentation by ESI and MALDI Tandem Mass Spectrometry. Dupré M, Cantel S, Martinez J, Enjalbal C. International Mass Spectrometry Conference – Kyoto – 15-21 Septembre 2012 & Congrès français de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique – Avignon – 19-22 Septembre 2011.
4. Sequencing Lys-N proteolytic peptides by ESI and MALDI tandem mass spectrometry. Dupré M, Fromenty G, Cantel S, Martinez J, Enjalbal C. Journées GSO Grand Sud-Ouest et Catalogne SCF-SCQ – Montpellier – 26 Septembre 2010 & Congrès français de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique – Avignon – 19-22 Septembre 2011.
5. LDI-MS from inert silica/silicon-based surfaces. Dupré M, Fromenty G, Pialat A, Kaaki K, Raehm L, Durand J-O, Mehdi A, Boukherroub R, Cantel S, Martinez J, Enjalbal C. Desorption 2010 – Seillac – 30 Mai-3 Juin 2010 & 27ème Journées Françaises de Spectrométrie de Masse – Clermont-Ferrand – 13-16 Septembre 2010.

PREAMBULE

Le potentiel de la spectrométrie de masse dans le cadre de l'analyse et de la caractérisation de molécules organiques est tel que cette technique est devenue actuellement indispensable non plus seulement aux chimistes, mais aussi à d'autres communautés scientifiques, comme les biologistes et plus récemment les praticiens hospitaliers (médecins/pharmaciens/cliniciens). En effet, la multiplicité des techniques disponibles a rendu possible l'identification et la détermination de séquence de molécules d'intérêt ayant des propriétés et des caractères très éloignés, permettant ainsi d'étendre les champs d'investigations à de nombreux domaines scientifiques. De fait, la chimie analytique, et plus spécifiquement la spectrométrie de masse, a alors évolué de simple support à des branches majeures de la science vers une discipline à part entière. Il est donc normal que la conception de nouveaux équipements et de nouvelles méthodes en spectrométrie de masse constituent depuis plusieurs années l'objet de très nombreuses recherches, et qu'aujourd'hui nous disposions d'un large éventail d'instrumentations basées sur des procédés d'ionisation et d'analyse multiples, présentant des caractéristiques distinctes, et menant à des applications diverses et variées. Les développements méthodologiques analytiques constituent une partie de ce travail en permettant la mise au point et la validation de protocoles innovants utiles à l'évolution des appareillages de spectrométrie de masse. C'est dans ce cadre que s'inscrit ce travail de thèse.

Les travaux de recherche menés au cours de ces trois années ont été focalisés autour des techniques de spectrométrie de masse utilisant des méthodes d'ionisation douce, à savoir la désorption/ionisation laser (LDI) assistée par différents types de matrice, et l'Electrospray (ESI), pour l'analyse et la caractérisation de biomolécules. Durant cette période, deux axes d'études ont principalement été développés :

- La détection et l'identification de biomolécules en LDI-MS et LDI-MS/MS *via* l'utilisation de techniques alternatives à la méthode MALDI. Cette thématique a été initiée au laboratoire lors de la thèse de N. Shenar (2005-2008) [¹ Shenar, 2008], dont le travail était principalement centré sur la détection de peptides en LDI. Elle s'inscrit donc dans la continuité des perspectives et axes d'investigations les plus prometteurs.
- La caractérisation de peptides en spectrométrie de masse en tandem. En raison de la multiplicité des échantillons étudiés et des nombreuses interactions existantes avec les équipes en charge de synthèses de biomolécules à l'Institut des Biomolécules Max Mousseron, l'équipe possède un savoir-faire dans l'analyse structurale de peptide. Il a

d'ailleurs été démontré au travers des deux thèses précédentes, soutenues par L. Mouls en 2005 [² Mouls, 2005] et N. Shenar en 2008 [¹ Shenar, 2008]. L'étude du comportement en MALDI-MS/MS et ESI-MS/MS d'une sélection de peptides spécifiques a donc fait l'objet d'une partie des travaux de thèse. Les objectifs étaient d'une part de contribuer à une meilleure connaissance des règles de fragmentation gouvernant le séquençage peptidique, et d'autre part de disposer de spectres MS/MS de références pour valider les comportements de dissociations observés en LDI-MS/MS.

Le sujet principal étant dévolu aux développements méthodologiques en désorption/ionisation laser, il a été choisi de centrer l'introduction bibliographique uniquement sur cette thématique dans la **PARTIE A**.

Pour mener l'ensemble des expérimentations effectuées lors de ce travail, la sélection de l'instrumentation, des matériaux utilisés ainsi que des échantillons de référence de type peptide a fait l'objet d'une discussion en **PARTIE B**.

La **PARTIE C** est consacrée à la présentation des résultats. Il a été choisi de reproduire dans cette partie les cinq publications issues de ces travaux de thèse, en incluant pour chacune d'entre elles le résumé graphique et les illustrations complémentaires proposées en "supplementary material". Au cours de cette thèse, la caractérisation de peptides synthétiques en spectrométrie de masse en tandem impliquant les sources d'ionisation MALDI et ESI a fait l'objet d'études approfondies décrites dans deux publications (*Article 1: Sequencing Lys-N proteolytic peptides by ESI and MALDI tandem mass spectrometry* et *Article 2: Occurrence of C-terminal residue exclusion in peptide fragmentation by ESI and MALDI tandem mass spectrometry*). Nous avons fait apparaître ces travaux dans le manuscrit, précédés d'une courte introduction au séquençage peptidique. Ces résultats sont présentés dans le **CHAPITRE I**. Le **CHAPITRE II** traite du cœur du sujet de thèse qui consiste en l'étude de plusieurs variantes de la technique LDI comme méthodes de détection et de caractérisation de biomolécules. Les développements méthodologiques LDI ont également en partie été valorisés à travers la publication de trois articles (*Article 3: Silica nanoparticles pre-spotted onto target plate for LDI mass spectrometry analyses of peptides*, *Article 4: Investigation of silicon-based nanostructure morphology and chemical termination on LDI-MS performance* et *Article 5: Laser desorption ionization mass spectrometry of protein tryptic digests on nanostructured silicon plates*).

Enfin, une conclusion de ce travail et des perspectives sont mentionnées dans la **PARTIE D**.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	I
PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES	III
PREAMBULE.....	V
SOMMAIRE.....	VII
LISTE DES ABREVIATIONS	XI
PARTIE A. INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I. LES METHODES DOUCES DE DESORPTION IONISATION LASER.....	3
I.1. Les techniques de désorption/ionisation utilisées en spectrométrie de masse	3
I.2. La désorption/ionisation laser assistée par une matrice	9
I.2.1. Le principe de l'ionisation MALDI.....	10
I.2.2. Les inconvénients de la méthode MALDI	16
I.3. Les nouveaux développements des stratégies douces de désorption/ionisation laser	19
I.3.1. Les systèmes binaires basés sur un matériau inerte dispersé dans une matrice organique liquide	25
I.3.2. Les matrices utilisant uniquement un matériau inerte	31
I.3.3. Conclusion sur les nouvelles stratégies douces LDI	77
CHAPITRE II. OBJECTIFS ET ENJEUX	81
PARTIE B. MATERIELS ET METHODES.....	83
CHAPITRE I. SPECTROMETRIE DE MASSE : LES DIFFERENTES CONFIGURATIONS.....	85
I.1. Les méthodes d'ionisation DI : les techniques MALDI-MS et MALDI-MS/MS	85
I.1.1. La source d'ionisation MALDI.....	86
I.1.2. L'analyseur à temps de vol	92
I.1.3. Deux conceptions différentes de la spectrométrie de masse en tandem	94
I.1.4. L'imagerie MALDI-MSI.....	98
I.2. Les méthodes d'ionisation API : les techniques ESI-MS et ESI-MS/MS.....	99
I.2.1. La source Electrospray	100
I.2.2. Les analyseurs	102
I.2.1. Méthode d'activation disponible	104
CHAPITRE II. SELECTION DES MATERIAUX INERTES.....	107
II.1. Matériaux type poudre	107
II.1.1. Produits commerciaux	108
II.1.2. Substrats synthétiques	108

II.2. Matériaux type surface	111
II.2.1. Support commercial : plaques NALDI™	112
II.2.2. Surfaces synthétiques.....	113
CHAPITRE III. ECHANTILLONS MODELES : SELECTION ET SYNTHESE	117
III.1. Peptides synthétiques	117
III.1.1. Préparation des peptides	117
III.1.2. Evaluation du caractère hydrophobe des séquences	122
III.2. Réalisation de mélanges artificiels de peptides trypsiques	123
III.3. Digestats trypsiques de protéines.....	125
PARTIE C. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	127
CHAPITRE I. SEQUENCAGE DE PEPTIDES EN MALDI-TOF/TOF ET ESI-Q/TOF	129
I.1. Introduction	129
I.2. Méthodes d'activation	130
I.3. Fragmentation des peptides - Modèle du proton mobile	130
I.3.1. La voie de fragmentation b_x-y_z	133
I.3.2. La voie de fragmentation y_z	133
I.3.3. La voie de fragmentation a_1-y_x	135
I.3.4. Les ions secondaires	136
I.4. Séquençage de peptides Lys-N	141
I.4.1. Article 1: Sequencing Lys-N proteolytic peptides by ESI and MALDI tandem mass spectrometry.....	141
I.4.2. Illustrations complémentaires.....	159
I.5. Observation de fragmentations remarquables	167
I.5.1. Article 2: Occurrence of C-terminal residue exclusion in peptide fragmentation by ESI and MALDI tandem mass spectrometry	167
I.5.2. Illustrations complémentaires.....	187
CHAPITRE II. ANALYSE PAR DESORPTION/IONISATION LASER SUR SUPPORTS INERTES DE TYPE POUDRE... 207	207
II.1. Généralités.....	207
II.2. Analyses de peptides et de digestats trypsiques sur un support de type poudre	211
II.2.1. Article 3: Silica nanoparticles pre-spotted onto target plate for LDI mass spectrometry analyses of peptides.....	211
II.2.2. Illustrations complémentaires.....	225
CHAPITRE III. ANALYSE PAR DESORPTION/IONISATION LASER SUR SUPPORTS INERTES DE TYPE SURFACE. 233	233
III.1. Comparaison des performances LDI obtenues pour différentes surfaces.....	235
III.1.1. Article 4: Investigation of silicon-based nanostructure morphology and chemical termination on LDI-MS performance	235
III.1.2. Illustrations complémentaires.....	245

III.2. Analyses de peptides et de digestats tryptiques sur un support de type surface	251
III.2.1. Article 5: Laser desorption ionization mass spectrometry of protein tryptic digests on nanostructured silicon plates.....	251
III.2.2. Illustrations complémentaires	271
PARTIE D. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	279
LISTE DES FIGURES, TABLES ET GRAPHES.....	291
ANNEXE 1 - PARAMETRAGES DES SPECTROMETRES DE MASSES UTILISES	297
ANNEXE 2 - SYNTHESE DES MATERIAUX	303
ANNEXE 3 – SYNTHESE PEPTIDIQUE SUR SUPPORT SEMI-AUTOMATISEE	309
REFERENCES.....	313

LISTE DES ABREVIATIONS

AAO	Anodic Aluminium Oxide
AgNPs	Nanoparticules d'Argent
ATP	Adenosine Triphosphate
AuNPS	Nanoparticules d'Or
BSA	Bovin Serum Albumin
CAD	Collisionally Activated Dissociation
CCM / TLC	Chromatographie sur Couche Mince / Thin-Layer Chromatography
CD	Cyclodextrine
CID	Collision-Induced Dissociation
CNTs	Carbon Nanotubes
DESI	Desorption ionization Electrospray
DHB	Dihydroxybenzoïc acid
DI	Désorption/Ionisation
DIAMS	Desorption/Ionization on Self-Assembled Monolayer Surfaces
DIOM	Desorption/Ionization on Mesoporous silicate
DIOS	Desorption/Ionization On porous Silicon
DLC	Diamond Like Carbon
DVD	Digital Versatil Disk
ESI	Electrospray
FAB	Fast Atom Bombardment
GALDI	Graphite-Assisted Laser Desorption/ionization
GLAD	Glancing Angle Deposition
GO	Graphene Oxide
HCCA	α -cyano-4-hydroxycinnamic acid
HCD	Higher energy C-trap Dissociation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IMSC	International Mass Spectrometry Conference
IR	Infrarouge / Infrared
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LD	Laser Desorption
LDI	Laser Desorption/Ionization
LID	Laser-Induced Dissociation
LSIMS	Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
MCM-41	Mobil Catalyst Material / Mobil Composition of Matter No. 41 (41 = structure hexagonale)
MELDI	Material-Enhanced Laser Desorption/Ionization
MS	Mass Spectrometry
MWNTs	Multi-Walled Carbon Nanotubes
NALDI	Nano-Assisted Laser Desorption/ionization
NALDI	Nanostructure-Assisted Laser Desorption/Ionization
NBA	3-Nitrobenzyl Alcohol

Nd:YAG	Neodymium/Yttrium-Aluminium-Garnet
NPs	Nanoparticles / Nanoparticules
NWs / NFs	Nanowires / Nanofils
OTS	Octadécyltrichlorosilane
PCIS	Precursor Ion Selector
PECVD	Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition
PEG	Polyéthylène Glycol
PFPDSCS	Pentafluorophénylpropyldiméthylchlorosilane
PFTS	Perfluorodécyltrichlorosilane
PLMS	Post LIFT Metastable Suppressor
PSD	Post Source-Decay
Q	Quadripôle / Quadrupole
RGO	Reduced Graphene Oxide
RP-HPLC	Reversed Phase - High Performance Liquid Chromatography
SALDI	Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization
SAM	Self-Assembled Monolayers
SBA-15	Santa-Barbara Amorphous- 15 (famille 15)
SEAC	Surface-Enhanced Affinity-Capture
SELDI	Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization
SEND	Surface-Enhanced Neat Desorption
SGALDI	Sol-Gel-Assisted Laser Desorption/Ionization
SID	Surface-Induced Dissociation
SIMS	Secondary Ion Mass Spectrometry
SLD	Soft Laser desorption
SPE	Extraction sur Phase Solide
SWNTs	Single-Walled Carbon Nanotubes
TEOS	Tetraéthoxysilane
TOF	Temps-de-vol (Time-of-flight)
UV	Ultraviolet

PARTIE A. INTRODUCTION

"On ne connaît pas complètement une science tant qu'on n'en sait pas l'histoire."

Auguste Comte

CHAPITRE I. LES METHODES DOUCES DE DESORPTION IONISATION LASER

De nos jours, la méthode LDI la plus connue et la plus usitée est la désorption/ionisation laser assistée par une matrice organique (MALDI). En effet, l'ionisation MALDI est utilisée au travers de nombreuses applications qui s'étendent du contrôle qualité de molécules de synthèse, à la détection, caractérisation et analyse structurale de biomolécules/macromolécules/polymères, en passant par la cartographie de surface *via* le mode imagerie. Cependant, pour palier à certaines limitations que nous discuterons plus loin dans le manuscrit, de nombreuses méthodes LDI alternatives à la technique MALDI sont apparues lors de ces deux dernières décennies. Afin de mieux comprendre ces récentes évolutions, il était nécessaire de rappeler brièvement les différentes investigations ayant abouti au développement de la spectrométrie de masse par désorption/ionisation.

I.1. Les techniques de désorption/ionisation utilisées en spectrométrie de masse

Comme l'illustre la **Figure A-1** extraite d'un tutorial de spectrométrie de masse publié par K.L. Bush [3 Busch, 1995], le principe de la désorption/ionisation consiste à bombarder la surface d'un échantillon par un faisceau incident (dit primaire) pour mener à l'éjection de particules chargées destinées à être analysées en spectrométrie de masse, le plus souvent à l'aide d'un analyseur à temps de vol (TOF, pour Time-of-flight).

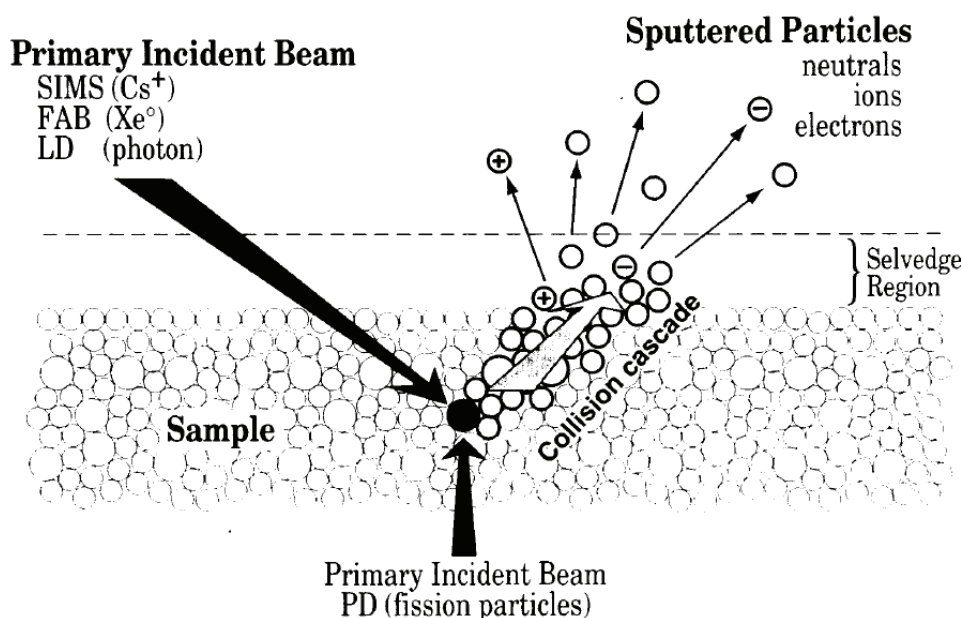


Figure A-1. Illustration de l'impact d'une particule primaire en spectrométrie de masse par désorption/ionisation d'après [3 Busch, 1995].

Selon la nature du faisceau incident, trois grandes familles se distinguent :

- La spectrométrie de masse des ions secondaires (SIMS) : développée dès la fin des années 1940 [⁴ Herzog *et al.*, 1949], puis commercialisée une dizaine d'années après [⁵ Castaing *et al.*, 1962; ⁶ Liebl, 1967], la méthode SIMS implique le bombardement de la surface de l'échantillon par un faisceau d'ions qui conduit à la pulvérisation de matière et à l'émission de particules chargées. Ces ions, dits secondaires, sont ensuite détectés en spectrométrie de masse. La particularité du SIMS réside dans le fait que l'on peut moduler l'analyse selon l'intensité du courant d'ions primaires. Ainsi, en régime statique, seule l'extrême surface des échantillons correspondant à la première couche atomique (~10 Å) est accessible et génère les ions secondaires. En revanche, le régime dynamique, de plus forte intensité, permet une analyse en profondeur (profilage). Le SIMS est également très répandu de part sa capacité en régime statique à permettre la réalisation de cartographie de surface en espèces élémentaires et moléculaires avec une très bonne résolution spatiale (imagerie TOF-SIMS).
- La désorption laser (LD) : la désorption laser repose sur l'irradiation par un faisceau laser impulsionnel d'un échantillon présenté sous forme d'un dépôt solide sur une plaque en acier inoxydable. Dès 1968, cette technique est utilisée par Vastola pour obtenir des ions générés par irradiation de molécules organiques avec un laser pulsé à rubis (694 nm) [⁷ Vastola *et al.*, 1968; ⁸ Vastola *et al.*, 1970]. Les premiers essais systématiques réalisés pour l'analyse d'échantillons organiques ont été menés à la fin des années 1970. Durant cette période, le développement des lasers a permis aux chercheurs d'utiliser une grande variété de sources lumineuses, couvrant ainsi une large gamme de longueurs d'ondes (UV et IR) et utilisant différentes durées d'impulsions (de la picoseconde à une irradiation continue) [⁹ Posthumus *et al.*, 1978; ¹⁰ Kupka *et al.*, 1980]. Ces chercheurs ont également tenté de coupler cette source d'ionisation de désorption laser avec les différents types d'analyseurs disponibles, l'analyseur à temps de vol fut ainsi choisi comme étant le plus adapté avec les sources à laser pulsé. Cependant, malgré toutes les conditions expérimentales étudiées, la limitation de la LD a vite été contraignante de part la difficulté d'analyser des molécules de haut poids moléculaires intacts (> 1000 g.mol⁻¹) et sa forte propension à fragmenter les molécules fragiles (et donc une grande partie des biomolécules). En effet, la forte puissance nécessaire à la désorption laser de ces grosses molécules induit leur fragmentation, voire leur destruction, par une trop forte augmentation de leur énergie interne. Il faut noter que des sources de désorption laser ont également été utilisées comme outil d'imagerie pour analyser des éléments atomiques ou des composés de faibles masses, notamment au travers de la technique LAMMA (Laser Microprobe Mass Analysis) [¹¹ Verbueken *et al.*, 1985].
- Le bombardement par des atomes rapides (FAB pour Fast Atom Bombardment) : en s'inspirant de la source SIMS, Barber décrit en 1981 la première technique de

désorption/ionisation douce permettant d'accéder à l'analyse de molécules polaires de masses conséquentes (jusqu'à 2 000 Da) [¹² Barber *et al.*, 1981]. La technique FAB consiste à déposer sur la cible métallique, en bout d'une canne d'introduction, l'échantillon en mélange dans une matrice liquide (le plus souvent du glycérol ou de l'alcool 3-nitrobenzylique). Le mélange est ensuite bombardé par un faisceau d'atomes rapides (xénon ou argon) pour conduire par protonation et/ou cationisation à la formation d'espèces intactes monochargées. La matrice liquide permet d'éviter la dégradation de l'échantillon sous l'impact du faisceau énergétique incident tout en favorisant la désorption/vaporisation et l'ionisation des molécules pour conduire à la formation d'ions intacts. Basé sur le même principe, le bombardement de l'échantillon par des ions rapides (Cs⁺ par exemple) a également été développé sous le terme de SIMS liquide (LSIMS) par analogie au SIMS où le faisceau incident de bombardement est constitué d'ions. Ces techniques ont joué un rôle important en spectrométrie de masse en permettant d'accéder pour la première fois au séquençage de peptides et donc de remonter à des informations structurales. Cependant, elles présentent des inconvénients qui se traduisent par une impossibilité de désorber des molécules de masses molaires élevées (> 2 000 g.mol⁻¹) due à la faible énergie transférée par le faisceau incident. Par ailleurs, la présence de signaux provenant de l'ionisation de la matrice peut rendre ambiguë l'interprétation du spectre de masse dans les faibles masses.

A partir de ces deux dernières stratégies, deux équipes ont développé simultanément au milieu des années 1980 une nouvelle méthodologie pour l'analyse de macromolécules basée sur la désorption/ionisation laser couplée à l'analyseur temps de vol. Comme pour la technique FAB, une matrice organique est mélangée à l'échantillon à analyser. Dès 1985, Hillenkamp et Karas ont introduit la technique de désorption/ionisation laser assistée par une matrice (MALDI) en utilisant pour cette dernière des molécules organiques absorbant dans l'ultraviolet [¹³ Karas *et al.*, 1985; ¹⁴ Karas *et al.*, 1987]. Dans la méthode MALDI, ces composés faisant office de matrice sont mélangés à l'échantillon de manière à former après co-cristallisation un dépôt solide homogène. En fort excès par rapport à la quantité d'analyte dans le dépôt, la matrice permet d'absorber l'énergie du faisceau laser puis de la redistribuer à l'échantillon. Elle assure également d'autres fonctions comme protéger l'échantillon de l'irradiation laser directe, limiter son agrégation en dispersant les molécules, favoriser la vaporisation de l'analyte en l'entraînant en phase gazeuse ou encore jouer le rôle d'adjuvant d'ionisation par transfert de proton en fonction de ses propriétés acido-basiques. Cette nouvelle stratégie a permis d'accéder à l'analyse de nombreuses macromolécules ce qui était jusque là difficile voire impossible [¹⁵ Karas *et al.*, 1988]. Une illustration représentant le spectre de la protéine lactoglobuline (18,4 Da) tiré de la publication originelle est reproduite en **Figure A-2**.

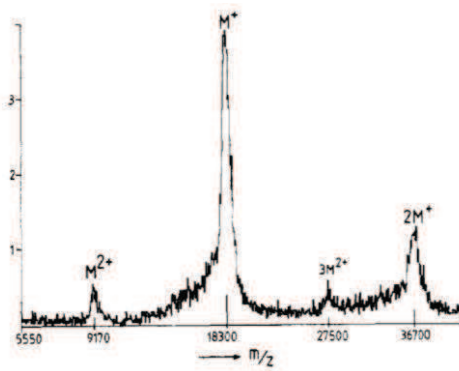


Figure A-2. Spectre "Matrix-UVLD" de la lactoglobuline A d'après [15 Karas et al., 1988].

Parallèlement, Tanaka avait employé une des deux matrices communément utilisées en FAB, à savoir du glycérol, mais dans laquelle il a ajouté une fine poudre de cobalt pour parvenir à désorber des protéines intactes de masses moléculaires comprises entre 12000 et 35000 g.mol⁻¹ [16 Tanaka et al., 1987; 17 Tanaka et al., 1988]. Les particules de cobalt (30 nm) dont le diamètre était inférieur à la longueur d'onde du laser à azote utilisé (337 nm) permettaient l'adsorption de l'énergie du faisceau incident. Le glycérol assurait quant à lui une homogénéisation de l'échantillon, tout en permettant de limiter la dispersion d'énergie absorbée par les particules et ainsi d'optimiser son transfert à l'analyte par conduction. Cette méthode a été qualifiée de désorption laser douce (SLD pour Soft Laser Desorption), et a permis à Koichi Tanaka d'être récompensé par le prix Nobel de chimie de l'année 2002 [18 Tanaka, 2003]. Un schéma extrait de la publication issue de la conférence présentée lors de la remise du prix Nobel est reproduit en Figure A-3. Il a partagé cette récompense avec John B. Fenn, inventeur de l'Electrospray, pour leur développement des méthodes d'ionisation douce en spectrométrie de masse pour l'analyse de macromolécules biologiques. Cette distinction a aussi été simultanément attribuée à Kurt Wüthrich pour ses travaux sur la résonance magnétique nucléaire pour la détermination de la structure tridimensionnelle de protéines. Une réserve peut être émise quand au choix de ne pas avoir associé Karas et Hillemkamp à ce prix pour leur découverte de la technique MALDI qui reste *in fine* à ce jour la plus méthode LDI la plus usitée.

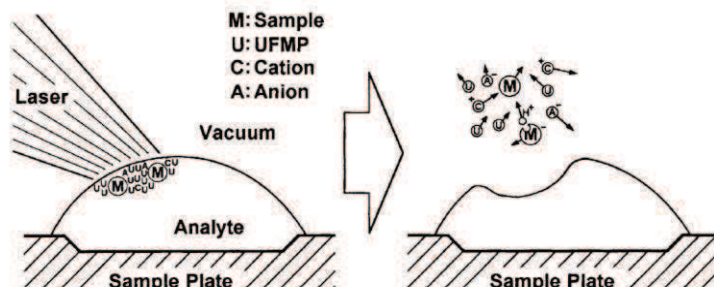


Figure A-3. Désorption ion-molécule avec une matrice UFMP (poudre de métal ultrafine) d'après [18 Tanaka, 2003].

Un aspect plus récent de ces développements qui consiste en l'utilisation de la désorption/ionisation pour entreprendre des analyses d'imagerie doit également être souligné. En effet, faisant suite aux

méthodes d'acquisition d'image développées à travers les techniques SIMS (imagerie TOF-SIMS), et de désorption laser (LAMMA), l'imagerie en spectrométrie de masse (MSI pour Mass Spectrometry Imaging) a également suscité l'intérêt de nombreuses équipes. Ces dernières se sont penchées sur la transposition de cette technologie à la source MALDI, qui en comparaison des sources LD, pouvait rendre accessible l'analyse d'une grande variété de molécules tant en nature chimique qu'en gamme de masse. A la suite de la démonstration du principe de l'imagerie MALDI présenté en 1994 [¹⁹ Spengler *et al.*, 1994], le groupe de Caprioli a publié en 1997 les premiers travaux utilisant cette technique pour générer des images représentant la localisation des peptides lors d'analyses de tissus de rat [²⁰ Caprioli *et al.*, 1997]. L'imagerie MALDI est alors devenue une thématique de recherche à part entière nécessitant de nombreuses investigations sur la mise en œuvre de la technique (choix de la matrice, méthode de dépôt, automatisation...) et entraînant de très nombreuses études dans des applications pour la plupart biologiques [²¹ Spengler, 2007].

Ces techniques de désorption/ionisation sont récapitulées dans la **Table A-1**. En plus de 60 ans, grâce à ces découvertes, la spectrométrie de masse par désorption/ionisation a connu un essor fantastique. La technique SIMS, d'abord utilisée principalement pour la caractérisation de matériaux (étude de la corrosion de métaux par exemple), a ensuite pris toute son envergure dans le domaine de la chimie organique avec la mise en œuvre d'expériences d'imagerie permettant la cartographie d'échantillons chimiques [²² Enjalbal *et al.*, 2003] et biologiques [²³ Brunelle *et al.*, 2007]. La désorption laser a rapidement été supplantée par l'avènement de la technique FAB dans les années 80. Devenu un outil analytique incontournable pour les chimistes organiciens, cette méthodologie a donné toute satisfaction pour le contrôle qualité de composés organiques polaires de masses moléculaires relativement faibles pendant une vingtaine d'année. Les techniques d'ionisation à pression atmosphérique (API) tel que l'Electrospray ont progressivement pris le pas sur cette source d'ionisation depuis leur mise sur le marché dans les années 1990. En parallèle, durant cette décennie, l'ionisation MALDI s'est implantée dans les laboratoires en complément des techniques d'ionisation API pour l'analyse de molécules polaires de hautes masses.

Si les techniques FAB et LSIMS ont aujourd'hui été abandonnées, les méthodes SIMS et MALDI sont toujours d'actualité, faisant l'objet de nombreux travaux de recherches et équipant aussi de nombreux laboratoires académiques et industriels. Quant à la SLD, bien que supplantée par le MALDI, nous allons voir que son développement a contribué à la mise au point d'autres techniques basées sur la Désorption Ionisation Laser (LDI).

Technique	Année	Faisceau incident	Energie	Principaux ions émis	Matrices	Imagerie
SIMS	1949	Ions rapides (Ar ⁺ , Cs ⁺)	0,1 - 50 keV	Ions fragments	-	oui
LD	1968	Photons (UV/visible/IR)	0,1 - 10 eV	Ions M ⁺ / MH ⁺ / MNa ⁺ / Ions fragments	-	oui
FAB	1981	Atomes rapides (Ar, Cs)	4-10 keV	Ions MH ⁺ / MNa ⁺	Liquide non volatil (Glycérol / acide 3-nitrobenzylrique)	non
LSIMS		Ions rapides (Ar ⁺ , Cs ⁺)	2-30 keV			
MALDI	1985	Photons (UV/visible/IR)	0,1 - 10 eV	Ions MH ⁺ / MNa ⁺ / MK ⁺	Solide cristallin (molécules organiques avec un système conjugué)	oui
SLD	1987	Photons (UV/visible/IR)	0,1 - 10 eV	Ions MH ⁺ / MNa ⁺ / MK ⁺	Particules de cobalt + glycérol	non

Table A-1. Les différentes techniques de désorption/ionisation utilisées en spectrométrie de masse.

En plus de ces techniques traditionnelles de désorption ionisation où la source est sous vide, il est à mentionner que d'autres méthodes reposant sur une ionisation à pression ambiante ont été développées plus récemment, parmi lesquelles les plus prometteuses sont la désorption ionisation par Electrospray (DESI pour DESorption Ionization by electrospray) et la source d'ionisation DART (Direct Analysis in Real Time). Les schémas de principe de ces deux méthodes d'ionisation, extraits d'une revue publiée par Cooks en 2006 [24 Cooks *et al.*, 2006], sont présentés en Figure A-4.

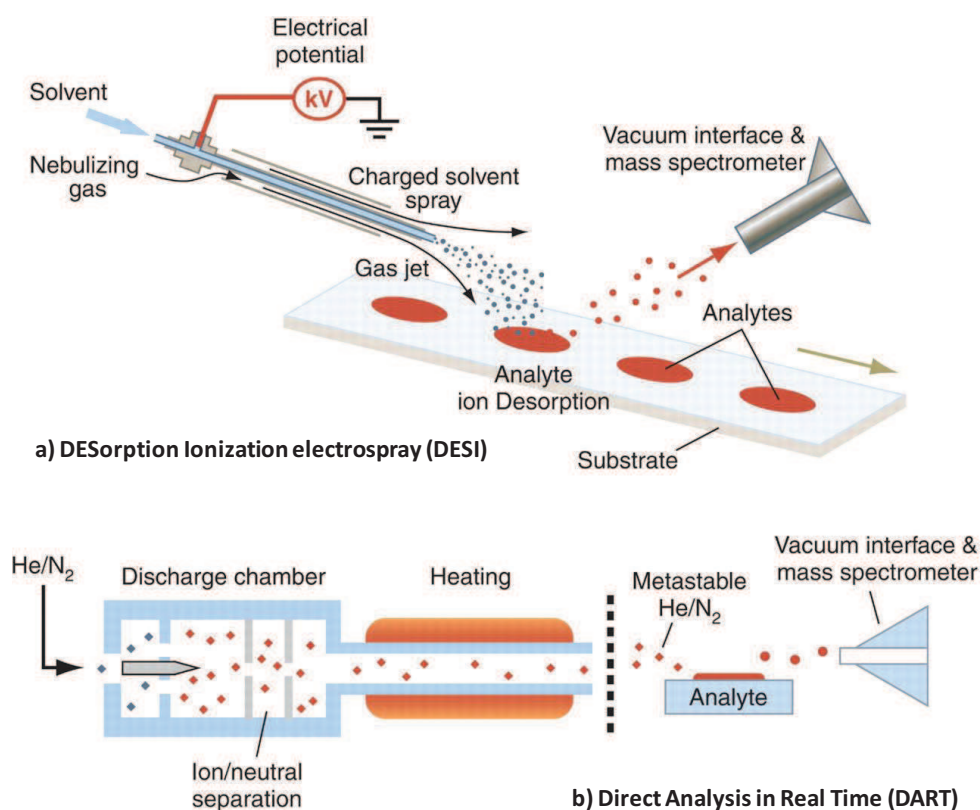


Figure A-4. Schéma de principe des techniques a) DESI et b) DART selon [24 Cooks *et al.*, 2006].

Dans la technique DESI, introduite par Cooks en 2004 [25 Takáts *et al.*, 2004], le faisceau incident est constitué par un spray de gouttelettes chargées qui vient frapper la surface de l'échantillon à analyser afin d'éjecter les analytes. Basée sur le même principe, la source d'ionisation DART,

commercialisée par Jeol en 2005 [²⁶ Cody *et al.*, 2005], est constituée par un plasma formé d'ions, d'électrons et d'atomes excités (typiquement des atomes d'hélium) qui vient percuter la surface de l'échantillon et entraîner la désorption et l'ionisation des molécules de faibles masses moléculaires. Ces techniques de désorption ionisation à pression atmosphérique assurent des analyses très rapides et immédiates de surfaces d'intérêt de type très varié pour la mise en évidence de la présence de petites molécules organiques ciblées. Citons à titre d'illustration l'analyse de billets de banque à la recherche de substances illicites prohibées, de denrées alimentaires pour la contamination par des herbicides et pesticides, et de médicaments dans le cadre de la détection de contrefaçons.

I.2. La désorption/ionisation laser assistée par une matrice

La technique MALDI est devenue la méthode de désorption/ionisation la plus étudiée et la plus utilisée de part ses nombreuses applications [²⁷ Hillenkamp *et al.*, 2007]. En effet, que ce soit en recherche et développement de méthodologies purement analytiques, ou bien au service de la chimie organique, de la chimie des polymères, de la protéomique ou plus généralement de la biologie, le MALDI est largement employé dans de nombreux domaines de recherche. Comme il a été mentionné dans la partie précédente, la technique MALDI donne accès à des molécules intactes, ce qui permet de remonter plus facilement aux espèces présentes dans l'échantillon dans le cadre d'analyse de mélange. Elle présente aussi l'avantage par rapport à l'autre méthode d'ionisation douce la plus répandue qu'est l'Electrospray de produire quasi-exclusivement des ions monochargés, ce qui a pour effet de considérablement simplifier l'interprétation du spectre de masse. Il faut toutefois mentionner que des espèces dichargées voire trichargées peuvent être observées dans le cas d'analyses de macromolécules (protéines). De la même façon, l'utilisation de laser transférant une plus forte quantité d'énergie (laser picoseconde ou femtoseconde) peut également induire la formation d'espèces multichargées. La capacité de la source MALDI à générer des ions sur une très large gamme de masse, sa sensibilité, notamment permise par la possibilité d'accumuler plusieurs spectres d'un même échantillon, sa tolérance aux sels pour l'analyse d'échantillons biologiques, mais aussi sa rapidité d'exécution sont également des avantages qui ont fait de la technique MALDI un outil de choix dans les laboratoires de spectrométrie de masse. Dans une grande majorité des cas, la source MALDI est associée à un analyseur TOF, parfaitement adapté à la séparation d'ions produits de façon impulsionnelle. On peut cependant citer une variante de la technique d'ionisation MALDI où la source est à pression atmosphérique (AP-MALDI). Dans ces conditions, différents analyseurs utilisés classiquement avec les techniques d'ionisation API peuvent être associés à une telle source (MALDI-FTICR ou MALDI-Orbitrap par exemple). Avant de poursuivre plus avant le propos, il est nécessaire d'explicitier le principe général de la technique MALDI afin de mettre en perspective les développements LDI réalisés ces dernières années.

I.2.1. Le principe de l'ionisation MALDI

La technique MALDI repose sur l'irradiation par un faisceau laser pulsé, utilisant une longueur d'onde ultraviolet (ou parfois infrarouge), d'un dépôt solide formé par la co-cristallisation de l'échantillon et de la matrice en excès. L'énergie transmise par le laser est alors absorbée par les molécules de matrice. L'excitation des molécules de matrice conduit à la désorption/ablation d'une fine couche du dépôt solide matrice/analyte puis à la vaporisation de la matière pour former un nuage gazeux, appelée "plume" ou "plumeau", au sein duquel va se dérouler l'ionisation des molécules d'analytes. Par application d'un champ électrostatique, les ions peuvent alors être accélérés, extraits de la source et introduit dans l'analyseur au travers de systèmes de lentilles de focalisation.

De façon plus détaillée, le principe de l'ionisation MALDI peut être scindé en trois étapes majeures :

- L'absorption du faisceau d'énergie lors de l'irradiation laser,
- Le processus d'ablation/désorption,
- L'ionisation des analytes.

Cependant, les mécanismes mis en jeu dans ces étapes demeurent toujours mal compris et font l'objet de nombreux débats autour d'études mécanistiques fondamentales. Pour recenser les différents processus, quelques auteurs ont publié ces dernières années des revues sur la formation des ions en MALDI [²⁸ Zenobi *et al.*, 1998; ²⁹ Karas *et al.*, 2003], les processus de désorption [³⁰ Dreisewerd, 2003], ou les phénomènes se déroulant dans l'expansion gazeuse [³¹ Knochenmuss *et al.*, 2002]. Il est toutefois difficile de bien assimiler tous les processus mis en jeu tant ils sont complexes, entremêlés et qu'ils font appel à des notions approfondies de physique et de modélisation. En se basant sur les explications détaillées par Hillemkamp et Karas dans un chapitre du livre "MALDI MS, a practical guide to Instrumentation, Method and Application" [³² Hillemkamp *et al.*, 2007], sur une revue récente de Knochenmuss [³³ Knochenmuss, 2006], ainsi que sur un chapitre de livre intitulé "MALDI Ionization Mechanisms: an Overview" également rédigé par Knochenmuss en 2010, nous avons résumé le principe de l'ionisation MALDI.

I.2.1.1. L'absorption de l'irradiation laser

Les composés organiques qui font office de matrice sont choisis pour leurs propriétés optiques afin de transférer de façon la plus efficace l'énergie du faisceau laser à l'échantillon. Le rôle de l'absorption de la matrice dans le transfert de l'énergie provenant du faisceau laser est gouverné par la loi de Beer (1).

$$(1) H = H_0 * e^{-\alpha Z}$$

H = fluence du laser (énergie/unité de surface)

Z = profondeur dans l'échantillon

H₀ = fluence du laser à la surface de l'échantillon

α = coefficient d'absorption de la matrice (cm⁻¹)

Le coefficient d'absorption α est le produit du coefficient d'absorption molaire α_n par la concentration C_n des molécules de matrice dans l'échantillon. Seules les molécules possédant des noyaux aromatiques montrent des coefficients d'absorption molaire qui satisfont les grandeurs nécessaires à l'absorption des photons dans l'UV. Pour ces composés qui présentent des valeurs moyennes d' α_n comprises entre 5×10^3 et 5×10^4 l.mol⁻¹.cm⁻¹ à la longueur d'onde du maximum d'absorption, pour des concentrations de matrices très élevées (généralement 10 mol.l⁻¹), le coefficient d'absorption α se situe alors dans une gamme de 5×10^4 à 5×10^5 cm⁻¹. La profondeur de pénétration du laser dans l'échantillon, correspondant à l'inverse du coefficient d'absorption, a ainsi une valeur de quelques nanomètres. Cela donne une estimation de la quantité de matière ablatée par impulsion laser. Cette faible profondeur implique une analyse de l'extrême surface et explique qu'une même localisation peut être irradiée plusieurs fois consécutivement avant que l'échantillon ne soit épuisé. De plus, on peut déduire de la loi de Beer (1) que l'énergie absorbée dans l'échantillon par unité de volume dans le processus MALDI est égale au produit de la fluence laser par le coefficient d'absorption de la matrice (2).

$$(2) E_a/V = \alpha * H$$

Ainsi, en prenant des concentrations de matrices C_n élevées et en sélectionnant des molécules qui ont des coefficients d'absorption molaires α_n élevés (tels que les composés aromatiques précédemment évoqués), le coefficient d'absorption α est donc suffisamment grand pour permettre l'éjection de matière avec des fluences laser relativement faibles, typiquement 20 à 200 J.m⁻². Par exemple, une fluence laser de 100 J.m⁻² et un temps d'impulsion de 2 ns correspond à une irradiance du laser sur la surface de l'échantillon de 10¹¹ W.m⁻². A cette fluence, le flux de photons, soit le nombre de photons entrant en contact avec l'échantillon par impulsion laser, correspond à $1.7 * 10^{16}$ photons par cm², chaque photon portant une énergie de 3.6 eV pour les lasers à azote à 337 nm, et de 3.3 eV pour les lasers à 355 nm. Un coefficient d'absorption molaire typique de 10⁴ l.mol⁻¹.cm⁻¹ représente une moyenne de 0.7 photons absorbés par molécules de matrice, ce qui mène à une forte densité de molécules excitées qui conduit à une ablation explosive du volume d'échantillon excité.

1.2.1.2. Le processus d'ablation/désorption

L'exposition d'un échantillon à l'irradiation laser mène à l'ablation de matière, soit plusieurs couches de molécules de matrice. Selon Hillemkamp et Karas, le terme désorption, choisi originellement par analogie avec la désorption de champs (FD pour Field Desorption), n'est peut-être pas le plus adéquat. Le terme ablation, qui correspond plus au phénomène observé en MALDI, semble plus approprié. Plusieurs auteurs travaillant sur les mécanismes du MALDI mentionnent d'ailleurs régulièrement dans leurs travaux le terme ablation, seul, ou en association avec la désorption (soit ablation/désorption). Selon Knochenmuss, le changement de phase en MALDI peut être caractérisé comme un phénomène de "désorption" ou "d'ablation" en fonction de la densité d'énergie déposée

par le laser. Ce comportement est illustré dans la **Figure A-5** [³³ Knochenmuss, 2006]. Il définit la désorption comme étant une transition continue de la phase condensée solide au gaz à la surface de l'échantillon (ligne rouge pleine). Dans le phénomène d'ablation, l'échantillon est surchauffé et il apparaît une nucléation sous la surface qui entraîne un changement de phase explosif et l'éjection de matériel condensé (ligne rouge pointillée) [³⁴ Knochenmuss, 2010]. Toutefois, la très grande majorité des publications traitées dans le manuscrit mentionnent uniquement le terme désorption et c'est pourquoi, ce chapitre mis à part, nous avons choisi d'utiliser uniquement le terme désorption dans le reste du mémoire.

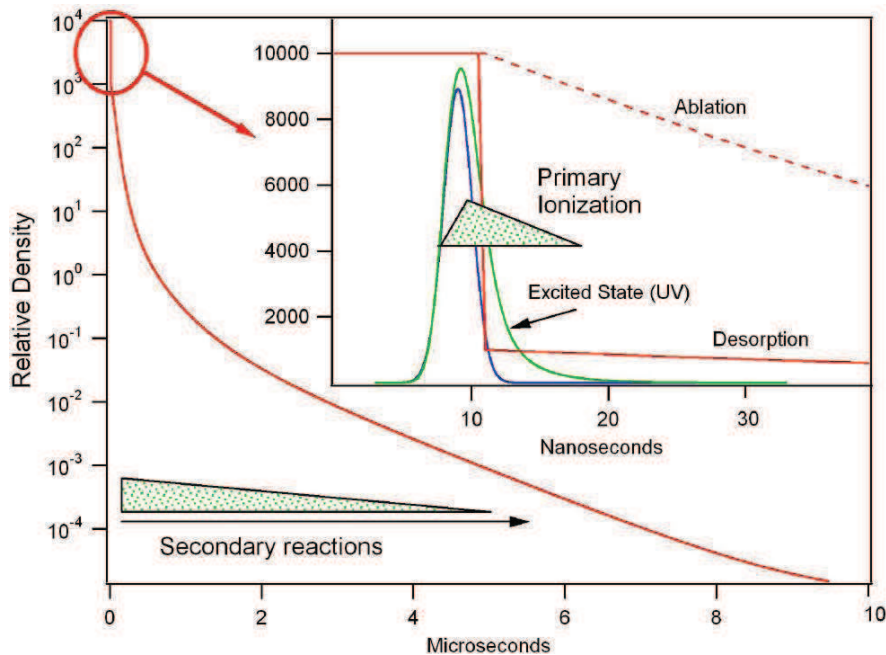


Figure A-5. Représentation du changement de densité pendant un événement MALDI (La courbe bleue représente une impulsion laser typique, la courbe verte la population d'états excités et les courbes rouges la densité relative de la plume s'étendant contre le temps).

Les processus de l'ablation de matière et de l'ionisation de la matrice et des molécules d'analyte sont vraisemblablement intimement mêlés. Ils prennent place dans une échelle spatiale micrométrique et temporelle nanométrique. Il faut distinguer les processus purement ablatifs (phénomène d'onde de choc) et ceux purement thermiques (vaporisation thermique du matériau) induits par l'interaction laser-matière (picoseconde à femtoseconde). Il est toutefois expérimentalement très difficile, voire impossible, de faire ressortir les contributions de ces processus physiques. Au seuil de la fluence laser permettant la détection, chaque impulsion laser transfère une quantité d'énergie à l'échantillon proche de la somme de toutes les énergies de liaison dans le solide (équivalent à la somme de la température de fusion et d'évaporation). Bien que cette énergie mène dans tous les cas à l'ablation de la matière excitée, différents processus de dissipation d'énergie doivent être pris en compte. Cependant, l'énergie de dissipation par conduction thermique pendant l'irradiation peut être négligée. Pour une profondeur de pénétration de 100 nm du faisceau laser UV, la constante de temps

pour une conduction thermique des matrices UV est généralement de 10 ns, soit une valeur inférieure à la durée typique d'impulsion laser. Au final, cette irradiation rapide de l'échantillon par le laser génère dans l'échantillon une onde de pression thermoélastique qui quitte le volume excité à la vitesse du son (de l'ordre de 2 000 à 3 000 m.s⁻¹ dans une matrice cristalline). Le "plume" est ainsi généré par détente adiabatique et subit une expansion supersonique dans la source sous vide.

I.2.1.3. L'ionisation

Les mécanismes qui mènent à la formation des molécules d'analyte et de matrices chargées dans le processus MALDI sont aussi complexes que le phénomène d'ablation/désorption. Les deux grandes classes de réactivité (réactions acido-basiques et réactions d'oxydoréduction) sont observables. Néanmoins, la majorité des ions observés pour les analytes polaires sont des ions à nombre pair d'électrons. Pour expliquer le processus MALDI, il est nécessaire de distinguer l'ionisation des molécules de matrice et l'ionisation des analytes. Bien qu'aucun nombre précis n'ait été déterminé expérimentalement, il est estimé que le rendement d'ion dans la matrice, c'est-à-dire le rapport des espèces ioniques sur les espèces neutres, est dans la gamme 10⁻⁵ à 10⁻² (soit 1% de molécules de matrice excitées au maximum). Les auteurs travaillant sur les mécanismes de formation des ions en MALDI s'accordent sur un processus en deux étapes ("two-step framework") qui prennent place dans une échelle de temps différente (**Figure A-5**).

La première étape est définie sous le terme d'ionisation primaire (Primary ionization dans la **Figure A-5**). Elle consiste en la formation des ions (ou leur éjection dans le cas d'ions pré-formés), qui a lieu pendant ou très rapidement après l'irradiation laser (une centaine de ns). Cette étape demeure la plus controversée puisque plusieurs modèles ont été proposés pour l'expliquer. Parmi eux, deux principales approches ont été particulièrement détaillées pour le MALDI-UV.

Le plus ancien modèle ("pooling/photoionization" model) suppose la présence de molécules neutres d'analyte dans les cristaux de matrice, avec comme première étape la photoionisation de ces molécules de matrice, suivi d'une seconde étape de transfert de charge à l'analyte dans le "plume" [¹⁴ Karas *et al.*, 1987; ³⁵ Ehring *et al.*, 1992]. Dans ce modèle, il est suggéré que la forte densité de molécules excitées résulte dans un phénomène de mise en commun de l'énergie entre les molécules de l'échantillon, tel que présenté dans la **Figure A-6**.

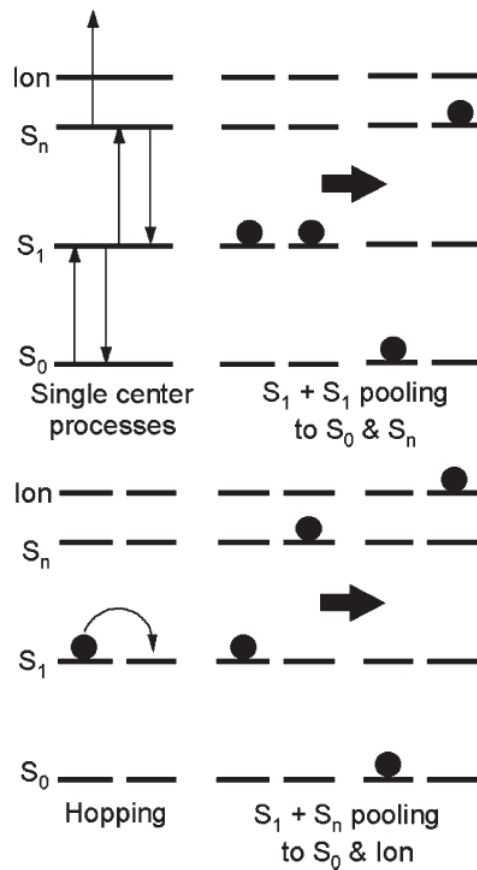


Figure A-6. Processus unimoléculaire et bimoléculaire selon le modèle "pooling/photoionization" d'après [33 Knochenmuss, 2006].

En effet, avec un laser UV (337 ou 355 nm), au moins deux photons sont nécessaires pour entraîner la photoionisation des molécules de matrice. Cependant, la puissance maximale des lasers utilisés en MALDI est trop faible pour avoir une absorption directe de deux photons par une seule molécule de matrice. Il est suggéré que cette quantité d'énergie soit alors concentrée sur une molécule de matrice par deux événements séquentiels d'union (phénomène de hopping et de pooling). Ainsi, deux molécules voisines pourraient regrouper leur énergie afin que l'une d'entre elles accède à une énergie équivalente à l'absorption de deux photons nécessaire à son ionisation, tandis que l'autre retombera à l'état fondamental. Cette union peut arriver quand deux molécules voisines sont assez proches pour que leurs états électroniques interagissent. Dans des matrices MALDI, ceci implique le contact des électrons π des systèmes aromatiques des molécules ordonnées dans le solide.

Le second modèle "Cluster", également qualifié de modèle "Lucky survivor", qui a été proposé et développé par le groupe de Karas, présume la présence d'espèces chargées préformées dans la matrice solide [36 Karas *et al.*, 2000]. Lors de la désorption/ablation des clusters matrice/analyte, la plupart de ces espèces sont re-neutralisées, et une minorité demeurent chargées : les "lucky survivor". Dans ce modèle, Karas semble signifier qu'un processus de recombinaison aléatoire permet d'obtenir quelques ions utiles à la détection. Il est possible que quelques contre-ions soient

séparés par un processus de photoionisation qui résulte dans la perte d'électron de l'échantillon qui peut alors acquérir une charge positive. Les charges dans les clusters peuvent également migrer *via* des transferts de protons, de cation ou d'électrons, pour aboutir à la formation des ions les plus stables.

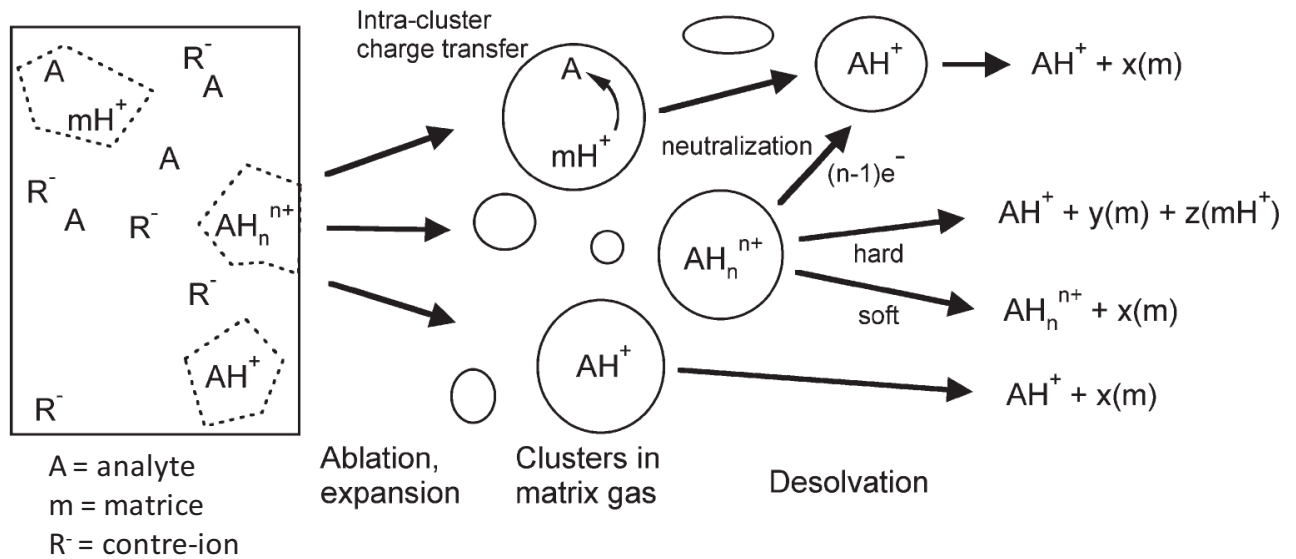


Figure A-7. Représentation des processus majoritaires proposé dans le modèle "cluster" d'après [33 Knochenmuss, 2006].

Comme l'illustre la **Figure A-7**, les ions préformés, séparés dans la solution, sont contenus dans les clusters ablatés de la matière solide initiale. Quelques clusters contiennent un excès net de charges positives, d'autres de charges négatives. Si l'analyte est déjà chargé, par exemple par protonation, la désolvation du cluster peut libérer l'ion. Dans d'autres clusters, il peut y avoir des transferts de charge à l'analyte neutre. Pour les espèces multichargées, des processus de desolvation "durs" et "doux" peuvent mener à différents ions libres. Il existe également des phénomènes de neutralisation par des électrons ou des contre-ions mais qui ne sont pas majoritaires.

La seconde étape réside dans les réactions secondaires (secondary reaction dans la **Figure A-5**) qui mettent en jeu des réactions ion-molécules dans l'expansion supersonique du "plume" pour lequel il est admis qu'il est suffisamment dense et que le phénomène est suffisamment long pour pouvoir appliquer les règles conventionnelles de cinétique et de thermodynamique. En effet, la densité de la plume change relativement lentement, ce qui autorise un grand nombre de collision. En conséquence, les ions formés lors de l'ionisation primaire peuvent réagir avec les molécules neutres pour donner de nouveaux ions qui sont finalement détectés. Ce phénomène d'ionisation secondaire est décrit par Knochenmuss comme étant plus long que l'ionisation primaire (**Figure A-5**). Il est également mentionné que les deux étapes d'ionisation se chevauchent puisque l'ionisation secondaire débute dès l'existence de premiers ions formés lors de l'ionisation primaire.

Les ions de l'analyte peuvent alors être formés à partir de réactions avec les ions de matrice selon les processus suivants (m=matrice, A=analyte) :

- Transfert de proton : $[m+H]^+ + A \leftrightarrow m + [A+H]^+$ et $[m-H]^- + A \leftrightarrow m + [A-H]^-$
- Transfert électronique : $m^+ + A \leftrightarrow m + A^+$ et $m^- + A \leftrightarrow m + A^-$
- Transfert de cation : $[m+Na]^+ + A \leftrightarrow m + [A+Na]^+$

Les nombreuses collisions dans le "plume" permettent d'approcher un équilibre thermique local. Une conséquence est que les ions formés à la fin de l'expansion du "plume" sont, en général, les plus favorables thermodynamiquement.

Au regard de cette discussion, les phénomènes multiples et complexes qui gouvernent les processus d'ablation/désorption et d'ionisation en MALDI demeurent un sujet d'investigation. De nombreux débats animent encore la communauté scientifique par rapport aux différents modèles proposés à ce jour. Ainsi, le congrès international de spectrométrie de masse 2012 (IMSC Kyoto, 2012) a consacré une session intitulée "The ion formation and dissociation mechanisms in MALDI" où se sont affrontés plusieurs avis contradictoires. Le titre de la communication plénière ("MALDI and related desorption/ablation/ionization methods : a solved problem or still a mystery") montre que les recherches menées jusqu'à présent n'ont pas répondu à toutes les questions soulevées par les résultats expérimentaux. En particulier, seule une matrice, en l'occurrence le DHB, a fait l'objet d'études mécanistiques approfondies alors qu'il a été démontré par ailleurs que chaque système matrice/analyte possédait ses propres caractéristiques. Les modèles théoriques établis à partir de conditions expérimentales particulières sont alors difficilement transposables à toutes analyses MALDI, à fortiori à l'ensemble des expériences conduites avec des méthodologies alternatives (LDI).

1.2.2. Les inconvénients de la méthode MALDI

Grâce à son vaste domaine d'utilisation, rendu possible par la grande variété de matrices découvertes ainsi qu'aux avancées technologiques réalisées sur les appareils de spectrométrie de masse MALDI-TOF, tels que le réflectron (ou réflecteur ou miroir électrostatique), l'extraction retardée ou les détecteurs de haute masse, la technique MALDI est devenue un outil très performant. Cependant, elle présente une limitation importante qui se traduit par la difficulté d'analyser des composés de faibles masses molaires ($< 700 \text{ g.mol}^{-1}$). La présence de la matrice organique solide, qui est pourtant indispensable à l'efficacité du phénomène de désorption/ionisation, est la cause de ce problème. Outre l'absorption de l'énergie du laser à la longueur d'onde désirée, la matrice organique doit posséder différentes propriétés comme la faculté à co-cristalliser avec l'analyte ou la capacité d'être soluble dans les solvants classiques. Pour être efficace, elle doit être utilisée en large excès, ce qui contribue à la difficulté de mener à bien l'analyse de petites molécules.

Ces principaux inconvénients peuvent ainsi être récapitulés en trois points :

- La réalisation du dépôt : il est reconnu que la performance de l'analyse en MALDI dépend en grande partie de la qualité du dépôt et donc de l'adéquation du couple échantillon/matrice. Deux paramètres sont cruciaux dans le protocole opératoire de préparation du dépôt : la nature chimique de la matrice et le mode de dépôt.
 - Le choix de la matrice : comme il a déjà été discuté, la matrice a un rôle capital dans le processus de désorption/ionisation des molécules d'échantillon puisqu'elle va permettre le transfert de l'énergie émise par le laser. Pour que la redistribution de l'énergie soit permise, l'échantillon doit être incorporé de façon homogène dans le réseau cristallin formé par les molécules de matrice. Deux principales classes de matrices sont utilisées dans les stratégies MALDI : les dérivés d'acides cinnamiques, et les dérivés aromatiques carbonylés. Le choix de la matrice se fait donc en fonction de l'échantillon à analyser. Bien que des matrices soient reconnues pour être plus efficaces avec certaines familles d'analyte, le choix de ces dernières se fait souvent de façon empirique. Plusieurs essais peuvent être nécessaires pour des échantillons peu communs et/ou non référencés dans la bibliographie. Le succès de l'analyse est également conditionné par le ratio molaire matrice/analyte. Pour des analyses de molécules de haut poids moléculaire, ce ratio se situe dans la gamme 10^3 - 10^5 :1, alors que pour les petites molécules, il est optimum dans un ratio 10^{-1} - 10^3 :1. Les matrices les plus couramment utilisées sont répertoriées en *Matériels et Méthodes (PARTIE B)*, ainsi que la catégorie d'échantillon pour laquelle leur utilisation est préconisée.
 - Le mode de dépôt : selon le couple échantillon/matrice, différents mode de préparation peuvent être envisagés de manière à obtenir un dépôt le plus homogène possible. En règle générale, trois protocoles sont les plus fréquemment utilisés : la goutte séchée, la couche mince et le dépôt sandwich. Ils sont détaillés en *Matériels et Méthodes*.
 - La nature des solvants : les solvants des solutions d'analyte et de matrice ont également un rôle déterminant dans la mise en œuvre de l'analyse MALDI car ils peuvent intervenir dans les différentes étapes de la préparation d'échantillon mais également dans la réalisation du dépôt. En effet, certains échantillons sont solubilisés dans des milieux polaires, alors que d'autres le sont dans des conditions apolaires, et il en est de même pour les matrices MALDI. Des problématiques de miscibilité peuvent alors être rencontrées lors de la réalisation des dépôts et vont avoir un effet défavorable pour l'obtention de dépôts homogènes et donc la bonne conduite de l'analyse.
- La pollution des spectres dans les basses masses : l'absorption des photons du laser conduit à l'excitation des molécules de matrice. Comme pour la technique FAB, celles-ci vont se désorber

et s'ioniser elles-mêmes. Compte tenu de la concentration à laquelle sont utilisées les matrices, soit en large excès vis à vis de l'analyte, il est évident que le spectre peut montrer un nombre très important de signaux correspondant à la matrice et à ses dérivés (fragments, agrégats, adduits...). Il est souvent nécessaire d'appliquer une déflexion afin d'empêcher ces ions de faibles masses de saturer le détecteur. Néanmoins, si les échantillons d'intérêt présentent des ions dans la même gamme de masse, aucune déflexion n'est applicable. Dans ce cas, le recours à des appareillages munis d'analyseurs de haute résolution permet de différencier ces ions de matrice de ceux provenant de l'échantillon.

- L'effet de suppression spectrale : en spectrométrie de masse, l'analyse d'un mélange de composés induit inévitablement une compétition lors de l'étape de formation des ions ce qui peut entraîner une suppression ou une exaltation du signal de l'analyte. Ainsi, les rapports entre les abondances des pics observés sur un spectre de masse ne sont pas quantitativement représentatifs des concentrations des espèces présentes dans l'échantillon mais dépendent plutôt d'autres paramètres comme le rendement d'ionisation ou le seuil de puissance laser nécessaire à désorber les molécules d'intérêt. Cette problématique, qui touche toutes les techniques LDI, est prépondérante dans le cas du MALDI, puisque l'analyte, même pur, est en mélange avec la matrice. On parle alors de "matrix-ion effet" : selon la nature de la matrice et le ratio analyte/matrice, il peut être compliqué de ne pas désorber majoritairement l'analyte au détriment de la matrice. Cette dernière peut avoir un seuil de désorption inférieur et être détectée prioritairement. Il est donc souvent nécessaire de moduler la puissance du laser afin d'optimiser les signaux de l'analyte par rapport à ceux de la matrice.

Des solutions ont été suggérées afin de palier à ces limitations telles que des protocoles spécifiques de préparation d'échantillon [³⁷Cohen *et al.*, 2007] ou la recherche de nouvelles matrices organiques. Parmi elles, on peut citer des matrices de type solide tels que des dérivés de la coumarine [³⁸Feng *et al.*, 2009] ou des polymères organiques (dans la technique dénommée PALDI pour Polymer-Assisted Laser Desorption/Ionization) [³⁹Woldegiorgis *et al.*, 2004], des matrices liquides ioniques [⁴⁰Tholey *et al.*, 2006], ou encore des matrices de poids moléculaires élevés complexant l'analyte [⁴¹Wu *et al.*, 2009; ⁴²Zhang *et al.*, 2010]. L'utilisation de tensioactifs pour améliorer la détection des analytes et diminuer les signaux dus à la matrice a aussi été suggéré [⁴³Grant *et al.*, 2007]. Pour éviter les problématiques de comptabilité de solvants, il a également été proposé d'utiliser une préparation des dépôts MALDI sans recourir à un solvant [⁴⁴Trimpin *et al.*, 2005]. Dans ce protocole, les analytes et la matrice sont broyés conjointement dans un mortier ou dans un broyeur à boulets, puis le dépôt solide est ensuite effectué sur la cible par écrasement de la poudre. Malgré tout, trouver des méthodologies permettant de simplifier le protocole de dépôt et de s'affranchir des limitations

induites par la matrice afin d'exploiter le MALDI sur les faibles gammes de masse reste un objectif majeur qui a entraîné la mise au point de nouvelles stratégies LDI.

I.3. Les nouveaux développements des stratégies douces de désorption/ionisation laser

Pour remédier aux difficultés inhérentes à la technique MALDI, d'autres approches de désorption/ionisation laser ont été développées ces vingt dernières années. En se basant sur la technique originelle LD et en s'appuyant également sur les études fondamentales du phénomène MALDI, les équipes de recherche ont mis en œuvre de nombreuses méthodologies LDI afin de tenter d'accéder de façon plus efficace à l'analyse d'une large gamme de molécules de faibles masses moléculaires [³⁷ Cohen *et al.*, 2007; ⁴⁵ Peterson, 2007; ⁴⁶ Law *et al.*, 2011; ⁴⁷ Dattelbaum *et al.*, 2006]. La plupart des méthodes décrites étant réalisées sur des appareillages commerciaux disposant d'une source d'ionisation traditionnelle MALDI, la principale différence entre ces stratégies a reposé sur la nature de la matrice. Pour cela, la recherche de matrices innovantes alternatives aux matrices organiques traditionnelles a donc constitué le principal enjeu des investigations.

Pour jouer le rôle de matrice dans une méthodologie LDI, et ainsi s'affranchir des problématiques induites par l'utilisation d'une matrice organique solide dans la stratégie MALDI, différents substrats ont été sélectionnés. Cependant, le choix de ces substrats n'a pas été fait au hasard et il est possible de définir certains pré-requis idéaux permettant d'envisager leur utilisation en tant que matrices LDI :

- Favoriser la désorption/ionisation des analytes, tout en ne la subissant pas lui-même, c'est-à-dire un substrat qui ne va pas être vaporisé, entièrement ou en partie, sous l'impulsion du laser, afin de ne pas entraîner d'interférences visibles sur le spectre de masse,
- Ne pas former d'interaction avec l'analyte (soit se lier de façon covalente, soit le complexer par exemple) au risque de modifier le résultat de l'analyse,
- Être le plus stable possible dans le temps et sous atmosphère ambiante. Par exemple, un substrat qui s'oxyde à l'air lors de la manipulation change de propriétés, ce qui affectera forcément son usage et son potentiel en spectrométrie de masse LDI,
- Ne pas se dégrader au contact des solvants organiques classiquement utilisés,
- Être suffisamment conducteur afin de ne pas limiter la mise en place d'une différence de potentiel entre la cible et les électrodes dans la source d'ionisation.

Pour satisfaire toutes ces contraintes, différents substrats composés pour tout ou partie de matériaux présentant généralement une nature inorganique ont été étudiés. Afin de les regrouper sous une appellation collective, nous avons opté pour le terme "inerte" afin de qualifier ces matériaux jouant le rôle de supports LDI en satisfaisant ces conditions. Ce qualificatif, qui est parfois

utilisé dans la bibliographie, n'a de signification que dans le contexte de ces recherches de désorption/ionisation laser puisqu'il regroupe plusieurs sens. En effet, un matériau peut être inerte de différentes façons : chimiquement, physiquement, thermiquement...Par exemple, la chimie de surface qui peut lui être associée ou les effets de transfert d'énergie dont on peut supposer qu'ils sont dus à une transmission de chaleur sont le symbole de la réactivité de ces matériaux qui ne seraient donc pas inertes dans d'autres contextes.

Au travers de la bibliographie, il existe une très forte disparité entre les matériaux ayant été utilisés comme supports inertes pour assister la désorption/ionisation laser. Les meilleures connaissances acquises, d'une part sur les phénomènes LDI, et d'autre part sur la synthèse et les propriétés des matériaux, ont entraîné un développement de méthodes utilisant de plus en plus de matériaux structurés, de matériaux composites (combinaison de matériaux de nature, structure, propriété, différentes) et même l'association de matériaux physiquement différents (surfaces et particules). Il est possible de classer les différences majeures existant entre ces matériaux selon les critères suivants :

❖ Les tailles, les structurations et les dimensions :

- Matériaux à l'échelle micrométrique : pour les travaux publiés en LDI, cela concerne principalement les particules dont les tailles sont autour du μm ,
- Matériaux à l'échelle nanométrique : ce sont des objets dont 3 dimensions (nanoparticules), ou dont deux dimensions (diamètre et hauteur de nanofils/nanotubes) ou dont une seule dimension (épaisseur d'un nanofilms) sont à l'échelle nanométrique. Suivant la structuration, d'autres nanostructures différentes sont également répertoriées et ont été utilisées dans différents travaux (*e.g.* nanofibres, nanodots, nanofleurs). Suivant certaines définitions, on peut également parler de nanostructures pour qualifier un matériau dont les pores sont à l'échelle nanométrique.

❖ Les propriétés conductrices (électrique et/ou thermique)

- Des isolants, sous forme d'oxydes (silice, alumine), et le diamant qui possède une faible conductivité électrique mais une très bonne conductivité thermique,
- Des conducteurs métalliques (or, argent, aluminium), ou carbonés (graphite),
- Un très grand nombre de matériaux semi-conducteurs élémentaires (Silicium, Germanium), oxydés (dioxyde de titane, oxyde de zinc), ou possédant cette propriété de part leur structuration (fullerène, nanotubes de carbone).

❖ L'apparence physique

- Les plaques, surfaces ou films : utilisables en l'état comme un support pour réaliser le dépôt de l'échantillon,

- Les substrats sous forme de poudre : mis en suspension et déposés en mélange avec l'échantillon pour une stratégie de goutte séchée ou de dépôt double couche.
- ❖ La méthode de fabrication
- D'une part, il existe deux approches d'élaboration ou de structuration des matériaux, qui consistent soit à synthétiser le matériaux en partant de briques élémentaires (approche bottom-up), ou à dégrader un matériel de départ pour lui conférer la structure souhaitée (approche top-down),
 - D'autre part, il existe de nombreuses méthodes de synthèse qui dépendent de la structure souhaitée (surface ou particules), de la nature du matériau, de l'approche envisagée..., et qui conduisent à des matériaux différents. Parmi les techniques fréquemment utilisées, on citera comme exemple les méthodes sol-gel, les techniques de gravure chimique sèche (ou physique) et humique (ou chimique), électrochimique, ou assistée par des métaux, les techniques de dépôt chimique en phase vapeur ou encore les méthodes de croissance par vapeur-liquide-solide ou de croissance orientée (épitaxie).

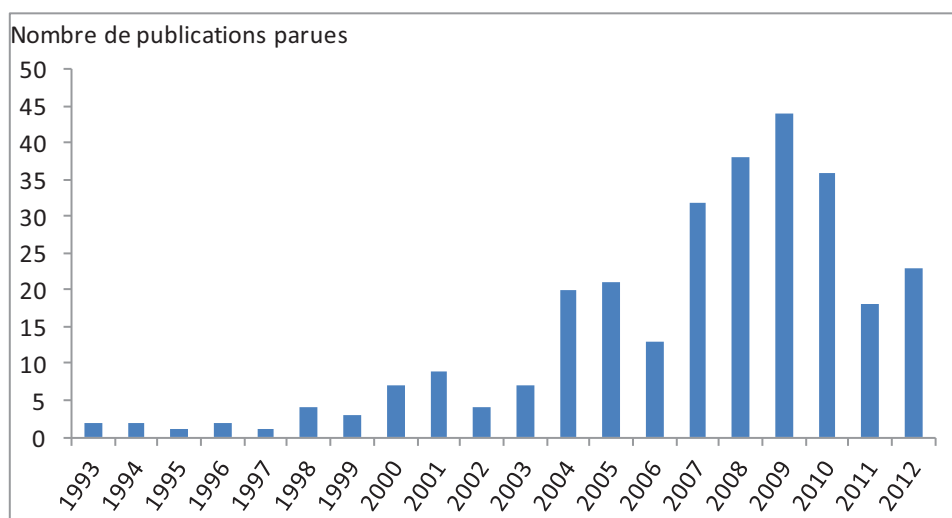
En raison de ces nombreuses variables, plusieurs classifications sont donc possibles. Une autre difficulté que nous avons rencontrée provient du nombre très important d'acronymes utilisés dans l'ensemble des travaux publiés. De cette multiplicité émerge aussi bien des sigles utilisés exclusivement par une équipe de recherche que des acronymes employés dans de nombreuses publications, parfois même sans lien apparent avec la signification originelle. De ce fait, le classement bibliographique peut s'avérer délicat, et il ne sera donc pas surprenant de trouver des méthodologies répertoriées sous le même acronyme dans la bibliographie mais qui, selon nos critères, se trouvent dans des catégories distinctes de notre classification. Quelques revues ne présentant aucune homologie dans le classement des méthodes ont été publiées sur le sujet, leur auteurs précisant parfois que leur approche était une tentative de classification [⁴⁵ Peterson, 2007; ⁴⁷ Dattelbaum *et al.*, 2006; ⁴⁸ Afonso *et al.*, 2005; ⁴⁹ Kuzema, 2011; ⁵⁰ Rainer *et al.*, 2011].

Pour notre part, nous avons adopté une organisation différente de ces auteurs. Nous avons choisi de répertorier les nouvelles techniques LDI selon d'une part, le système utilisé en tant que matrice, et d'autre part, la nature et la structuration générale du support utilisé dans ce système matrice. Pour ce faire, nous avons regroupé les méthodes LDI selon deux grandes catégories :

- ❖ **Les systèmes binaires, basés sur une association non covalente entre un matériau inerte et une matrice organique liquide,**
- ❖ **Les systèmes inertes, non fonctionnalisés ou fonctionnalisés de façon covalente avec des molécules organiques, dont les matrices MALDI constituent un cas particulier.**

Il faut mentionner que, parmi les systèmes binaires, certains chercheurs ont aussi fait le choix de combiner une matrice organique solide traditionnellement utilisée en MALDI et un support constitué d'un matériau inerte. A première vue, cette approche ne semble pas idéale pour résoudre l'ensemble des limitations expliquées antérieurement. Si l'amélioration des performances de détection peut être envisagée avec ces méthodologies, il n'en reste pas moins que la réalisation du dépôt n'est pas simplifiée puisqu'elle repose toujours sur la cristallisation du mélange matrice/échantillon, et que la matrice organique libre peut conduire aux mêmes difficultés que dans une méthodologie MALDI classique. Dans ce cas, l'efficacité de la désorption/ionisation ne repose donc pas sur le matériau inerte mais bien sur la matrice utilisée. Ces approches sont par exemple employées dans des techniques d'enrichissement où le matériau inerte est utilisé comme matériel d'extraction de molécules cibles, puis le système matériau inerte/échantillon est analysé en MALDI en présence de matrice organique traditionnelle. La technique MELDI, pour Material-Enhanced LDI, est une bonne illustration de ce système puisqu'elle met en jeu différentes particules fonctionnalisées (cellulose, silice, polymères de méthacrylate de glycidyle/divinylbenzène et poudre de diamant) et chargées en Cu^{2+} pour mettre en œuvre la chromatographie d'affinité métallique (IMAC pour Immobilized Metal Affinity Chromatography) et ainsi se lier spécifiquement avec certains constituants du sérum, dont des protéines [51 Feuerstein *et al.*, 2006]. Les molécules cibles fixées sur les particules chargées sont ensuite extraites et analysées en MALDI. Ces stratégies LDI, qui peuvent être alors dénommées sous des acronymes spécifiques, ne sont en réalité que des combinaisons de techniques séparatives ou préparatives et de la technologie MALDI.

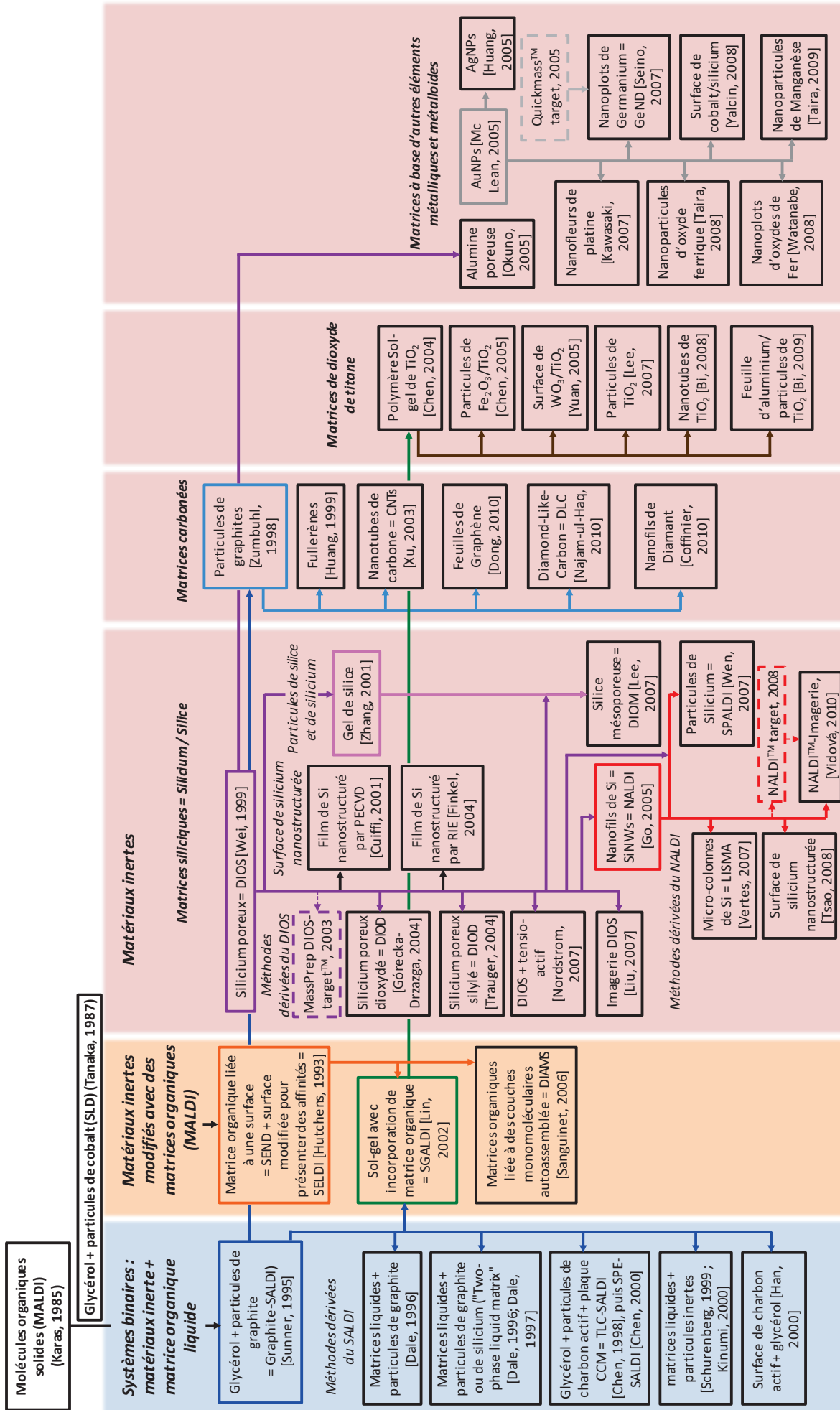
Compte tenu de la multiplicité des champs d'investigation, ces nouveaux développements des stratégies LDI ont conduit à une bibliographie très abondante (plus de 280 publications à ce jour comme illustré dans le **Graphe A-1**).



Graphe A-1. Répartition des publications parues sur les développements de techniques douces LDI.

De nombreuses méthodes souvent présentées comme innovantes découlent en fait de stratégies déjà publiées. Pour chaque catégorie, nous avons discuté les méthodologies en fonction de la nature du matériau utilisé dans le système matrice en reportant en priorité de façon détaillée les méthodes pionnières et innovantes, mais également les méthodologies à partir desquelles nous nous sommes inspirées pour ce travail. Nous avons également opté pour une restitution chronologique des événements afin de bien situer l'évolution des recherches et les objectifs actuels. La **Figure A-8** regroupe ainsi les contributions principales qui ont donné lieu à des méthodes de référence (principalement SALDI, DIOS, NALDI) qui sont encadrées en couleur. Certaines méthodologies innovantes découlant de ces stratégies analytiques sont mentionnées à la suite. Un code couleur permet de visualiser l'évolution des supports LDI étudiés. Les systèmes binaires qui constituent la première catégorie sont représentés en bleu. La seconde catégorie est divisée en deux parties. Les matériaux inorganiques qui sont fonctionnalisés de façon covalente par les matrices MALDI sont représentés en orange. Tous les autres substrats inertes utilisés seuls sont indiqués dans la zone délimitée par la couleur rose.

Figure A-8. Sélection des principales méthodologies LDI assistées par des matériaux inertes (représentée en page suivante).



Partie A. Chapitre 1.3.1.

Partie A. Chapitre 1.3.2.1

Partie A. Chapitre 1.3.2.2.1

Partie A. Chapitre 1.3.2.2.2

Partie A. Chapitre 1.3.2.2.3

Partie A. Chapitre 1.3.2.2.4

1.3.1. Les systèmes binaires basés sur un matériau inerte dispersé dans une matrice organique liquide

Pour s'affranchir des problématiques liées à la difficulté de désorber/ioniser efficacement les petites molécules, des systèmes binaires utilisant un matériau inerte et une matrice organique liquide ont été développés. Ils constituent la suite logique des développements amorcés par Tanaka en SLD (Soft Laser Desorption) puisque la désorption/ionisation ne repose pas sur un mécanisme MALDI avec un mélange solide co-cristallisé, mais principalement sur les propriétés du matériau inerte. Bien que la matrice organique liquide présente d'avantage un rôle équivalent à celui d'un solvant que d'un agent favorisant la désorption/ionisation à proprement parler, ces méthodes ne satisferont donc évidemment pas toutes les conditions idéales puisqu'elles présentent une partie organique libre qui peut subir la désorption/ionisation. Elles ont cependant constitué des travaux précurseurs en LDI assistés par des matériaux inertes desquels ont découlé les stratégies LDI discutées dans ce mémoire.

Le premier à avoir poursuivi le travail de Tanaka fut Sunner dès 1995 [⁵² Sunner *et al.*, 1995]. Sunner et son équipe souhaitait s'affranchir de l'utilisation des matrices solides utilisées en MALDI qui nécessitaient des étapes de préparation fastidieuses (notamment le séchage et la cristallisation à l'origine de "sweet-spot" ou de la dénaturation des protéines). Pour cela, leur choix s'est porté sur l'utilisation combinée de la même matrice liquide que Tanaka, le glycérol, et de particules de graphite. En revanche, Sunner a employé des particules de dimensions supérieures (2 à 150 μm) à celle de Tanaka (30 nm), expliquant que l'utilisation de particules de taille inférieure entraînait un phénomène de désorption de masse. Au contraire, des particules de diamètre supérieur à la longueur d'onde du laser permettaient d'accéder à un phénomène de désorption à la surface des particules. Sunner a ainsi proposé que deux types de désorption puissent avoir lieu, les peptides et des protéines seraient désorbés par un chauffage intense à la surface des particules, tandis que les petits analytes le seraient à partir de la solution de glycérol. En raison de ce mécanisme supposé de désorption à la surface des particules de graphite, il a nommé sa technique graphite Surface-Assisted Laser Desorption/Ionisation ou graphite-SALDI.

Il est important de mentionner à ce stade que le terme SALDI est depuis entré dans la nomenclature IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) sous la définition suivante : "The formation of gas-phase ions from molecules deposited on a particular surface that is irradiated with a pulse laser" [⁵³ IUPAC, 2006]. Il n'est donc pas cité exclusivement pour les systèmes formés par des matrices binaires, mais simplement pour des matrices utilisant un matériau dont on suppose que ses propriétés de surface favorisent la désorption/ionisation. De très nombreux travaux ont ensuite utilisé cet acronyme pour décrire leur méthode reposant sur l'utilisation unique de matériau inerte

que nous discuterons plus tard dans ce chapitre. A ce sujet, Law et Larkin ont récemment proposé une liste de critères permettant de valider un protocole comme étant une méthode SALDI [46 Law et al., 2011] :

- Les performances doivent être supérieures à celles obtenues par une désorption/ionisation laser directe sur une surface métallique ou de silicium nue,
- La puissance laser pour réaliser la désorption/ionisation laser ne doit pas être supérieure à celle impliquée dans une analyse MALDI utilisant des matrices organiques conventionnelles,
- Les ions moléculaires, ou quasi-moléculaires, doivent dominer le spectre pour valider une ionisation douce,
- Si des fragmentations sont obtenues, elles doivent être ordonnées et prédictibles,
- Une grande variété de composés doit pouvoir être analysée.

Ces critères sont à prendre avec prudence car ils ne concernent que les performances de la méthode et non sa mise en œuvre.

A la suite des travaux de Sunner, l'équipe de Zenobi a entrepris d'étudier le rôle de la matrice en s'intéressant à différentes matrices liquides: le glycérol, le thioglycérol, l'alcool 3-nitrobenzylique (NBA), le tetraglyme et le nitrophényl octyl éther [54 Dale et al., 1996]. Les recherches visaient également à démontrer le potentiel de cette nouvelle méthodologie LDI en étudiant le mécanisme de désorption/ionisation, l'influence des procédures de préparation de l'échantillon et les applications possibles, notamment en étendant le champ d'investigation à l'analyse d'oligosaccharides et de polymères synthétiques. Leurs travaux ont confirmé que la combinaison de particules de graphite et d'une matrice liquide était efficace pour la désorption/ionisation d'une large variété de composés de masses intermédiaires (e.g. petites protéines), avec des seuils de détection de l'ordre de la dizaine de femtomoles. Les particules de graphite ont été définies comme des vecteurs de transfert d'énergie amenant une désorption thermique, tandis que la matrice liquide a été associée à quatre rôles essentiels :

- Agir comme agent de protonation pour les espèces préférant s'ioniser sous leur forme protonée,
- Favoriser la cationisation pour les espèces formant des adduits avec des métaux alcalins,
- Minimiser la décomposition thermique en étant en excès par rapport aux analytes,
- Participer à l'homogénéisation du mélange graphite/analyte et protéger l'échantillon.

Ces travaux ont permis de démontrer les performances de cette méthode pour l'analyse de composés de poids moléculaires intermédiaires, en précisant cependant la nécessité de concevoir des améliorations permettant de désorber de plus grosses molécules tels que des polymères synthétiques de masse supérieure à 10 000 Da. La **Figure A-9** illustre les résultats obtenus pour

l'analyse d'un peptide et de deux petites protéines avec le graphite mélangé dans deux matrices liquides différentes.

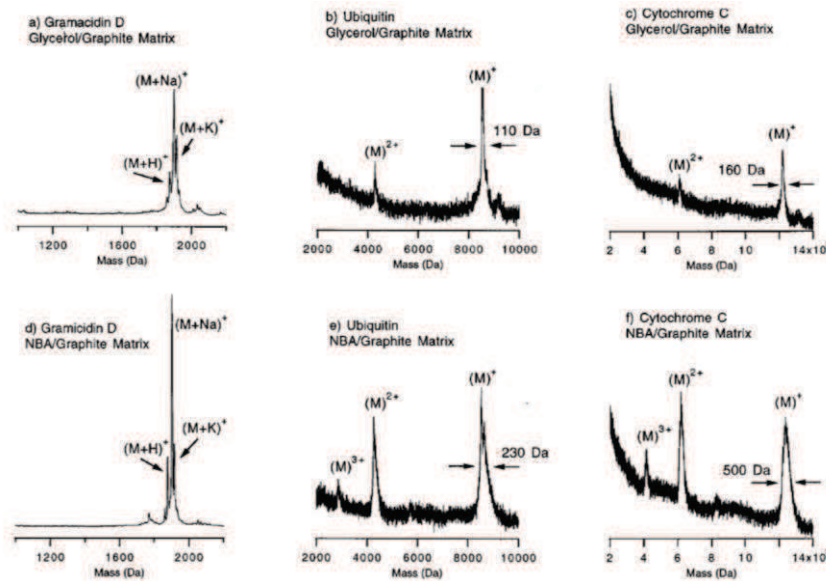


Figure A-9. Spectres de masse LDI-UV de la gramicidine D, l'ubiquitine, et le cytochrome C utilisant (a-c) le système glycérol/graphite et (d-f) le système NBA/graphite comme matrices d'après [54 Dale *et al.*, 1996].

Dans la continuité, Zenobi a poursuivi ses travaux sur ce qu'il a alors qualifié de "Two-phase liquid matrix" en utilisant en plus du système précédent des particules de silicium et une matrice liquide de diéthanolamine [55 Dale *et al.*, 1997]. Le choix de la diéthanolamine comme matrice a été gouverné par le fait que son affinité protonique, supérieure au glycérol, faisait d'elle un accepteur de proton. L'étude de composé en mode négatif pouvait alors être envisagée. La combinaison diéthanolamine/particules de silicium lui a permis de réaliser l'analyse de complexes anioniques en obtenant des spectres d'une grande qualité notamment en termes de pollutions dans les basses masses du spectre moins prononcées que dans le cas du graphite.

Parallèlement, Sunner a appliqué en 1998 sa méthode à l'analyse de composés organiques, principalement des peptides, séparés par chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC pour Thin-Layer Chromatography) pour développer le TLC-SALDI [56 Chen *et al.*, 1998]. Le principe consistait à déposer une suspension composée de particules de charbon actif (2 µm), de glycérol, de saccharose, de méthanol et d'eau sur le dépôt à analyser de la plaque CCM. Les analytes diffusaient alors dans le gel de silice pour être extraits jusqu'à la surface où ils étaient adsorbés sur le charbon actif. Comparé à la méthode originale, l'apport du saccharose permettait de réduire les contaminations en source et de jouer le rôle d'un adhésif en fixant les particules de carbone au support. L'équipe a également testé avec succès les autres matrices liquides précédemment utilisés par Zenobi.

Deux années plus tard, Sunner employait sa technique en association avec une autre méthode de séparation, l'extraction sur phase solide (SPE). Conscient que le gain de temps était un enjeu

important, il s'est servi du charbon actif à la fois comme adsorbant en SPE et comme "solide SALDI" pour extraire et analyser des polyphénols dans l'eau [⁵⁷ Chen *et al.*, 2000]. Chen a ensuite poursuivi le travail de son ancien mentor en utilisant les mêmes méthodes SALDI et TLC-SALDI. Dans un premier temps, cette scientifique a utilisé la méthode SALDI classique pour analyser des tensioactifs anioniques et cationiques (*e.g.* acide *p*-toluènesulfonique, dodecylsulfate de sodium et bromures d'ammonium). Elle les a ensuite utilisés en tant qu'additifs dans la matrice SALDI pour déterminer si l'activité de surface était affectée *via* l'amélioration/la détérioration du signal [⁵⁸ Chen *et al.*, 2000], et en SPE-SALDI pour activer le charbon actif. Les résultats ont permis de démontrer que les tensioactifs ioniques avaient une influence importante sur le signal détecté, confirmant leurs suppositions de l'existence d'interactions ioniques entre les analytes et les tensioactifs. Dans un second temps, Chen a appliqué la TLC-SALDI à la détection des sels d'ammonium quaternaires aux propriétés tensioactives [⁵⁹ Chen *et al.*, 2001]. En confirmant la forte interaction ayant lieu entre ces composés et le charbon actif, elle a ensuite amélioré la technique avec l'utilisation de tensioactifs cationiques qui s'assemblaient en "hémimicelle" (micelles associées à la surface d'un matériau) autour des particules de charbon actif pour fonctionnaliser le graphite et ainsi améliorer la sensibilité de la méthode SPE-SALDI [⁶⁰ Chen *et al.*, 2000].

Une autre équipe s'est ensuite attachée à étudier non seulement la matrice liquide mais également la nature des particules à utiliser pour réaliser la désorption/ionisation laser de peptides et de protéines [⁶¹ Schürenberg *et al.*, 1999]. Schürenberg et ses collaborateurs ont pour cela essayé 9 matériaux différents (nitrure de titane, tantale, suie, graphite, oxyde de fer, perle magnétique, polystyrène, plomb, et carbonyle de fer) sous forme de nano- et microparticules (35 nm à 4 µm de diamètre) en combinaison avec 17 matrices liquides différentes. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les systèmes nanoparticules de nitrure de titane, nanoparticules de suie et nanoparticules de tantale en suspension dans le glycérol. Bien que les spectres des protéines de masses supérieures à 13 kDa aient pu être obtenus avec une qualité comparable à ceux enregistrés avec des matrices organiques en MALDI, les échantillons de masses inférieures ont conduit à des spectres avec un signal sur bruit et une résolution dégradés. De plus, à partir de 30 kDa, aucun analyte n'était plus détecté. Selon cette équipe, ces résultats ne faisaient pas de cette méthode dans l'état une alternative viable à la technique MALDI, mais elle présentait toutefois l'avantage d'utiliser des particules en suspension, la matrice liquide permettant d'absorber l'énergie laser sur une large gamme de longueurs d'onde. Selon Schürenberg, deux principales améliorations pouvaient être envisagées :

- Réduire la distance entre les surfaces des particules, en réalisant un recouvrement de molécules non absorbantes par des bras de fixation (*e.g.* polymère),

- Choisir une longueur d'onde en accord avec l'absorbance de matrice liquide utilisée pour répartir l'énergie entre l'ensemble des particules (pour initier la désorption) et le liquide (pour jouer le rôle d'agent d'ionisation).

Kinumi *et al.* ont eux aussi étudié différentes possibilités pour le systèmes matrice liquide/matériau inerte [62 Kinumi *et al.*, 2000]. Le choix des matériaux inerts s'est porté sur des particules inorganiques commerciales à base de métaux et d'oxyde de métaux (Al, Mn, Mo, Si, Sn, SnO₂, TiO₂, W, WO₃, Zn et ZnO) tandis que la matrice liquide était composée de glycérol ou de paraffine liquide. Le mélange TiO₂/paraffine a permis d'obtenir les spectres les moins pollués et les signaux les plus intenses, la paraffine présentant l'avantage par rapport au glycérol de limiter le bruit de fond dans les basses masses (Figure A-10). Les deux échantillons analysés, le PEG 200 (molécule polaire) et le stéarate de méthyle (molécule non polaire), ont été détectés sous forme d'adduits métalliques alcalins ([M+Na]⁺ et [M+K]⁺). Dans certains cas, la puissance laser nécessaire à l'ionisation du stéarate de méthyle a entraîné sa fragmentation, ce qui a laissé penser aux auteurs que l'ionisation se produisait par un phénomène thermique rapide de chauffage/vaporisation en surface des particules inorganiques.

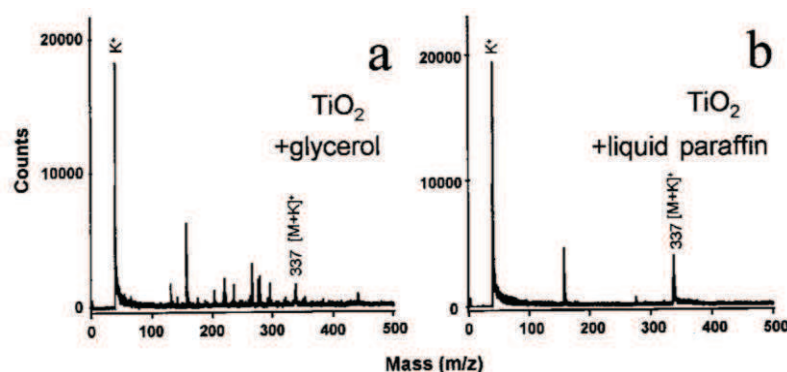


Figure A-10. Spectres de masse MALDI du stéarate de méthyle en utilisant des particules de TiO₂ suspendues dans (a) du glycérol et (b) de la paraffine liquide d'après [62 Kinumi *et al.*, 2000].

La même année, Sunner a modifié une nouvelle fois sa méthode SALDI en s'inspirant des travaux publiés quelques mois plus tôt par Siuzdak (discutés ultérieurement dans le paragraphe 1.3.2.2.1). En effet, au lieu de déposer un matériau présenté sous forme de poudre, le charbon actif a été immobilisé sous forme d'une fine couche pour simplifier la préparation de l'échantillon, limiter la contamination de la source par la poudre et améliorer l'exposition de l'analyte à l'échantillon [63 Han *et al.*, 2000]. En utilisant toujours un mélange glycérol/saccharose comme matrice liquide, il a utilisé cette méthode pour réaliser deux types de dépôts, des dépôts directs d'échantillon et des dépôts sur des plaque CCM, faisant migrer l'analyte dans le gel de silice jusqu'à être adsorbé à la surface du charbon actif comme illustré en Figure A-11.

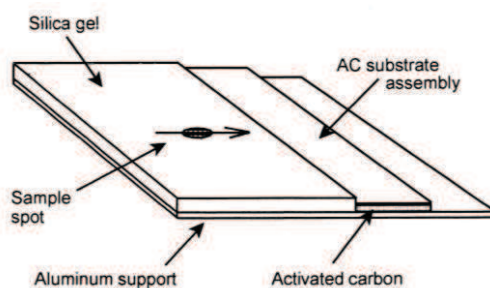


Figure A-11. Interface utilisée pour le dépôt CCM des analytes d'après [63 Han et al., 2000].

L'ancienne élève de Sunner, Chen, a une nouvelle fois repris la suite de ce travail en cherchant à simplifier la procédure. De la même manière, elle a utilisé comme matrice liquide un mélange de glycérol/saccharose solubilisé dans le méthanol. Mais à la différence de Sunner, elle a directement déposé le carbone sur le dépôt de la plaque CCM à partir d'un trait de crayon 2B (Figure A-12). Elle a également repris l'utilisation de tensioactif pour améliorer le signal (e.g. acide *p*-toluenesulfonique, PTSA). Cette approche lui a permis d'analyser des petites molécules, la méthyléphédrine, la cytosine, des PEG 400 et 2000 [64 Chen et al., 2001], ainsi que différentes porphyrines [65 Wu et al., 2002].

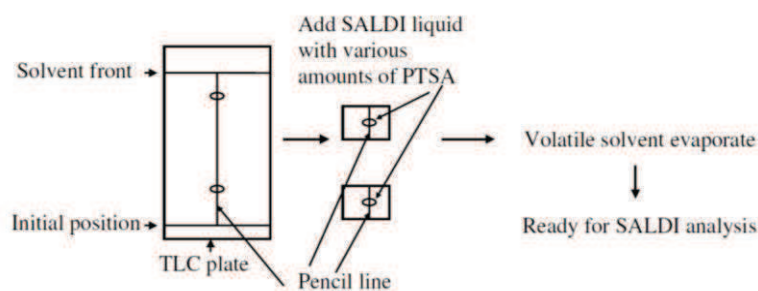


Figure A-12. Préparation de l'analyse TLC-SALDI d'après [65 Wu et al., 2002].

Par la suite, ces systèmes binaires ont peu à peu été laissés de côté. Certaines méthodologies font cependant mention de l'utilisation du glycérol pour augmenter la qualité des spectres obtenus à partir de matériaux seuls. A titre d'exemple, en 2009, Cheng et ses collaborateurs ont utilisé des nanoparticules d'or fonctionnalisées par l'intermédiaire de cystéines avec de l'acide α -cyano-4-hydroxycinnanique (ou HCCA, molécule classiquement utilisée en tant que matrice solide en MALDI), avec et sans ajout de glycérol [66 Duan et al., 2009]. Le principe de la méthode est présenté en Figure A-13. Pour l'analyse des deux peptides étudiés, la fonctionnalisation des nanoparticules d'or avec l'HCCA a permis de gagner en sensibilité par rapport à des nanoparticules nues ou uniquement recouvertes par le bras cystéine. Le glycérol s'est révélé indispensable pour garder une bonne dispersion dans le mélange, prévenant l'aggrégation des nanoparticules après l'évaporation des solvants. L'ajout d'acide citrique a permis d'améliorer la production d'espèces protonées en raison de son caractère donneur de protons.

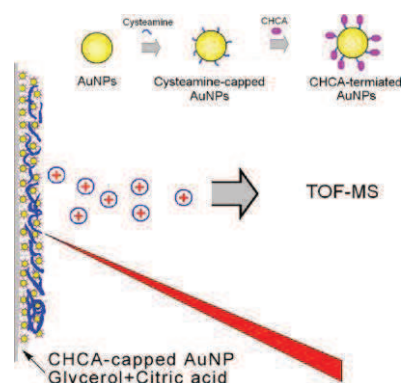


Figure A-13. Principe de la méthode LDI utilisant des nanoparticules d'or fonctionnalisées à l'HCCA en mélange dans du glycérol d'après [66 Duan *et al.*, 2009].

Ces méthodologies ont fortement contribué à l'engouement de nouvelles recherches portées sur les développements LDI. Toutefois, elles n'ont pas répondu à toutes les attentes, telles que la simplification du processus de dépôt, la qualité des spectres obtenus et la reproductibilité des spectres de masse. Ces insuffisances ont conduit à envisager d'autres investigations pour améliorer les performances de ces méthodes LDI.

1.3.2. Les matrices utilisant uniquement un matériau inerte

Comme il a été détaillé précédemment, il est présenté dans cette partie d'une part les techniques utilisant des matériaux inertes modifiés chimiquement par des matrices organiques (ou des dérivés) conventionnellement utilisées dans la technique MALDI, et d'autre part, les méthodes utilisant des matériaux inertes seuls. Cependant, dans cette seconde catégorie, une très grande majorité des matériaux est fonctionnalisée par des terminaisons organiques. Ces deux approches sont donc en réalité similaires puisqu'elles présentent un greffage de surface par des molécules organiques, qui dans les deux cas, est covalent. Cependant, nous avons fait le choix de distinguer ces méthodes en raison de la chronologie des développements mais également de leurs finalités différentes :

- La fonctionnalisation par une molécule organique utilisée habituellement en tant que matrice en MALDI a pour fonction d'utiliser les propriétés d'absorption UV des molécules liées tout en s'affranchissant des signaux détectés sur le spectre dus à leur impossibilité d'être désorbées/ionisées. Le but est donc d'améliorer les performances LDI d'un support mais pas de changer ses propriétés physico-chimiques.
- A contrario, la fonctionnalisation par d'autres types de molécules organiques est utilisée dans un but beaucoup plus vaste, afin d'améliorer les propriétés intrinsèques du matériau (réflectivité, polarité, protection/stabilité de la surface, compatibilité avec les solvants,...).

Cependant, ces méthodologies peuvent être regroupées dans la même catégorie puisque dans les deux cas, l'objectif est d'assister la désorption/ionisation, en disposant d'un support non vaporisable dans son ensemble et donc transparent sur le spectre de masse.

I.3.2.1. L'association covalente de matériaux inertes et de matrices organiques

I.3.2.1.1. Les matériaux inertes modifiés chimiquement en surface

Les premiers à avoir envisagé cette approche ont été Hutchen et Yip qui, dès 1993, ont pensé à modifier des surfaces avec différentes molécules organiques, dont l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique, pour développer la technique Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization (SELDI) [⁶⁷ Hutchens *et al.*, 1993]. Deux méthodes, présentées dans la **Figure A-14**, étaient déclinées dans leurs travaux :

- La méthode SEND pour Surface-Enhanced Neat Desorption, dans laquelle une molécule aux propriétés de matrice LDI-UV était fixée à une surface,
- La méthode SEAC pour Surface-Enhanced Affinity-Capture, utilisant des surfaces fonctionnalisées pour présenter des interactions spécifiques avec certaines familles de composés à analyser, ce qui permettait de capturer l'analyte par des affinités chimiques à partir d'échantillons complexes. Cette stratégie analytique combine donc un protocole de préparation d'échantillon permettant d'extraire et de concentrer un analyte vis-à-vis du milieu dans lequel il se trouve et une technique d'analyse LDI. Dans ce travail, une matrice organique était toutefois ajoutée après le dépôt de l'échantillon.

Au final, le terme SELDI a été retenu au profit de l'acronyme SEAC et cette méthode est devenue très utilisée pour des applications biologiques et protéomiques, le nombre de surface et de fonctionnalisations se diversifiant et donnant accès à l'analyse de différentes classes de composés [⁶⁸ Merchant *et al.*, 2000; ⁶⁹ Tang *et al.*, 2004; ⁷⁰ Seibert *et al.*, 2004]. La technique SELDI est une technique à part entière qui a été développée commercialement à travers des supports dédiés à des analyses spécifiques. Une présentation exhaustive serait trop longue et ne rentre pas dans le cadre de ce travail puisque cette technique combine l'utilisation de matériaux inertes, leur fonctionnalisation biochimique mais aussi une matrice organique solide de type MALDI. Il était toutefois cohérent d'explicitier cette technique SELDI, apparue dans le même article que le SEND, compte tenu de la philosophie analytique proposée. Au cours de la discussion, de nombreux travaux présentant un support combinant un procédé d'extraction et d'analyse LDI *in situ* seront présentés. Les termes SELDI et SEND sont d'ailleurs les deux autres acronymes, en plus du SALDI, admis selon la nomenclature IUPAC sous les définitions suivantes :

- "SEND: Matrix-assisted laser desorption/ionization in which the matrix is covalently linked to the target surface has been called surface-enhanced neat desorption".
- "SELDI: MALDI using a biochemical affinity target has been called surface-enhanced laser desorption/ionization".

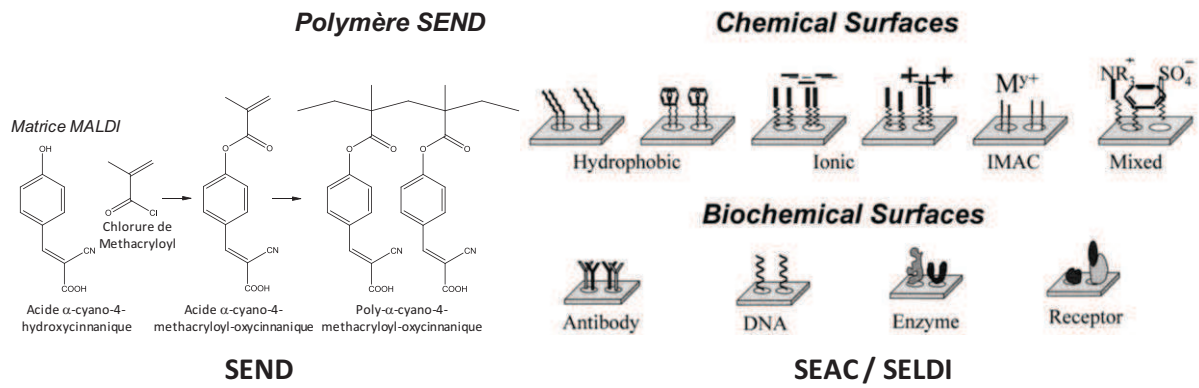


Figure A-14. Exemple de la fonctionnalisation par la méthode SEND [67 Hutchens *et al.*, 1993], et différentes surfaces réalisées pour la mise en œuvre de la technique SELDI d'après [69 Tang *et al.*, 2004].

En s'inspirant de ces recherches, le groupe de Smith a développé en 1996 une matrice constituée de monocouches auto-assemblées (SAM : Self-Assembled Monolayers) sur une surface d'or qui leur a permis d'analyser des petites protéines (Cytochrome C, insuline) et des oligosaccharides [71 Mouradian *et al.*, 1996]. Une illustration de cette matrice est présentée en Figure A-15. En 2006, l'équipe de Rondeau a repris cette approche pour développer la technique de Desorption/Ionization on Self-assembled Monolayer Surfaces (DIAMS), en utilisant comme monomère SAM un groupement chromophore alcane-thiol un peu plus complexe (2,2'-bithiophene-5,5'disubstitué), fixé par interactions covalentes entre un atome de soufre et la surface métallique conductrice. Cette surface modifiée leur a permis d'accéder à l'analyse de PEG, de peptides, d'acides gras et de mélange de glycérides [72 Sanguinet *et al.*, 2006; 73 Bounichou *et al.*, 2008], mais également de petites molécules comme l'acide salicylique [73 Bounichou *et al.*, 2008]. Selon les auteurs, le principal avantage de ces surfaces activées est de pouvoir adapter le support *via* le monomère choisi en fonction de la nature de l'échantillon, en ajustant la balance hydrophobe/hydrophile par exemple.

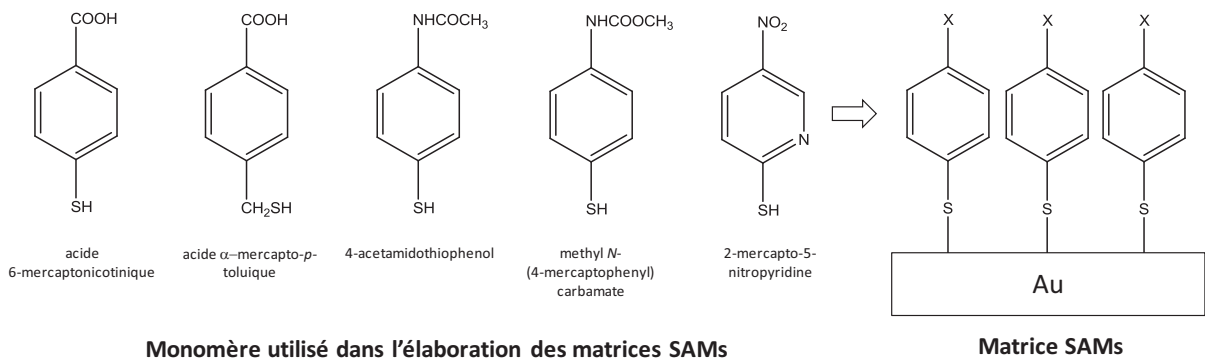


Figure A-15. Schéma d'une matrice SAM et des monomères utilisés (orientation des molécules arbitrairement définie) [71 Mouradian *et al.*, 1996].

Outre ces deux grandes familles (SEND et DIAMS), de nombreux autres travaux présentant des matrices inorganiques modifiées chimiquement ont été publiés depuis les années 2000. En 2001, du gel de silice modifié avec de l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) et de l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB), deux composés utilisés couramment comme matrices MALDI notamment pour l'analyse de peptides, ont par exemple été utilisés [74 Zhang *et al.*, 2001]. Il a été observé une amélioration de l'intensité du signal pour la détection de composés de faibles masses (*e.g.* angiotensine II, ACTH) par rapport aux analyses réalisées avec du gel de silice nu. Cependant, des résultats mitigés ont été observés avec cette approche pour les composés de plus hautes masses (*e.g.* cytochrome C).

I.3.2.1.2. Les structures Sol-gel avec incorporation de matrice organique

Une autre approche consistant à encapsuler les matrices organiques solides dans une structure polymérique, ceci pour garder les propriétés d'absorption UV de la matrice tout en minimisant les interférences dues à sa désorption, a ensuite été présentée par Chen [75 Lin *et al.*, 2002]. En utilisant la technique sol-gel, elle a réalisé un film constitué d'un polymère de silice dopé avec l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) (Figure A-16).

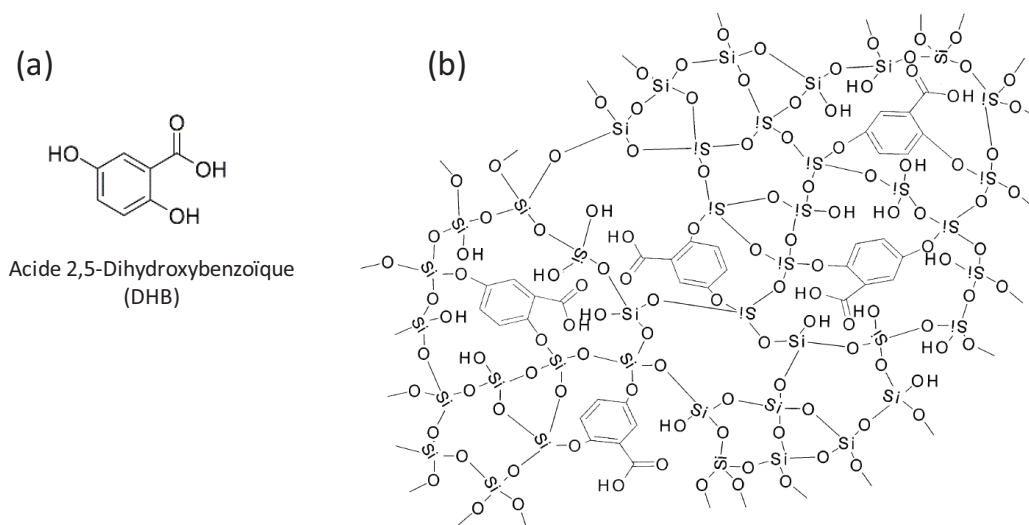


Figure A-16. (a) Structure de l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque et (b) Proposition de structure polymérique sol-gel piégeant le DHB d'après [75 Lin *et al.*, 2002].

Sa nouvelle méthode, qu'elle a nommé SGALDI, pour Sol-Gel-Assisted Laser Desorption/Ionization, avait l'avantage de piéger le DHB dans la structure formée par le précurseur tétraéthoxysilane (TEOS) par des liaisons covalentes possibles *via* les fonctions hydroxyles libres du DHB. Le DHB a été choisi pour respecter les critères d'un bon dopant défini par Chen, à savoir pouvoir créer deux liaisons covalentes, et posséder un groupement supplémentaire acide qui joue le rôle de donneur de proton. Pour avoir un gain de sensibilité sur l'analyse de petites molécules et de petites protéines (phénylalanine, arginine, bradykinine, insuline et cytochrome C) tout en limitant les interférences, une teneur en DHB de 7 500 à 10 000 ppm dans la structure sol-gel a été définie. Chen a ensuite

successivement étudié l'influence de la position du groupement acide sur l'acide benzoïque en réalisant des sol-gels dopés avec des isomères du DHB (2,3-DHB, 2,4-DHB ont également donné de bons résultats) [⁷⁶ Ho *et al.*, 2003], et décliné sa méthode SGALDI à la désalinisation et l'analyse *in situ* d'oligonucléotides avec l'acide diaminobenzoïque comme dopant [⁷⁷ Chen *et al.*, 2003].

I.3.2.2. Les matériaux inertes seuls ou en combinaison (matériaux composites)

Même si certaines techniques répertoriées dans les paragraphes précédents promettaient des résultats intéressants, de nombreuses équipes ont cherché à revenir aux fondements du développement des méthodes LDI pour proposer des méthodes utilisant uniquement un support inerte pour assister la désorption/ionisation laser. Comme il a été mentionné précédemment, bien que le matériau inerte soit utilisé seul, il faut noter qu'il subit de nombreux traitements chimiques post-synthèse et est très souvent fonctionnalisé en surface pour améliorer ses propriétés intrinsèques.

I.3.2.2.1. Les structures siliciques

Parmi les supports utilisés, les substrats à base de silicium sont les plus représentés. Dans cette catégorie, il est difficile de distinguer tous les substrats, tant différents procédés de synthèse peuvent être mis en œuvre pour réaliser des matériaux aux propriétés très proches, ou au contraire, des techniques d'élaboration similaires peuvent engendrer des supports très différents par des simples modifications de protocole expérimental.

I.3.2.2.1.1. Les premières surfaces de silicium poreux

La première approche a été présentée en 1999 par Siuzdak qui a proposé la méthode DIOS, pour Desorption/Ionization mass spectrometry On porous Silicon, dans laquelle il a introduit comme support une surface générée à partir de silicium cristallin par un processus de gravure électrochimique [⁷⁸ Wei *et al.*, 1999]. La configuration de son système est illustrée en **Figure A-17**. Siuzdak a choisi le silicium poreux notamment pour sa capacité à piéger les molécules d'analyte *via* des interactions non covalentes avec les groupements silanol (interaction de Van Der Waals et liaison hydrogènes), sa grande surface spécifique, et pour sa forte absorption dans l'ultraviolet, qui représente un atout pour la mise au point de protocole LDI-UV. Le silicium, qui présente un band gap de 1.1 eV, va en effet pouvoir absorber les photons UV émis par le laser de la source MALDI (3.6 et 3.3 eV pour les lasers à 337 et 355 nm). Un autre avantage du silicium poreux est sa propension à être modulable en dimensions (épaisseur), morphologie, porosité, résistivité, et également la possibilité de fonctionnalisation. Sur ce dernier point, en plus de la surface nue, trois dérivatisations différentes ont été utilisées (une présentant des groupements hydroxyles générés par l'oxydation de la silice, et deux ayant des fonctionnalisations par des groupements hydrophobes dodécyl et éthylphényl), les surfaces les plus hydrophobes lui permettant d'obtenir les meilleurs résultats.

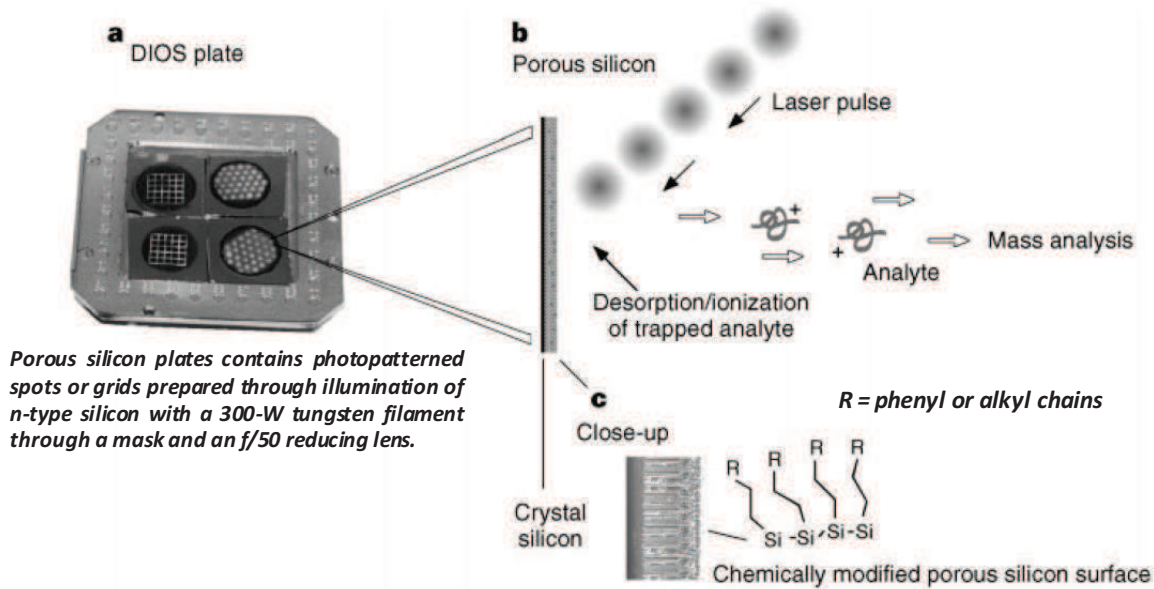


Figure A-17. Configuration expérimentale d'une expérience DIOS d'après [78 Wei et al., 1999]. a. Plaque MALDI contenant 4 plaques de silicium poreux, b. Désorption/ionisation sur silicium poreux induite par le laser, c. Coupe transversale de la surface de silicium poreux fonctionnalisée après hydrosilylation.

Dans ses travaux, Siuzdak a réalisé des surfaces de silicium microporeux et mésoporeux (les dimensions définies par l'IUPAC sont donnés en **Table A-2**) à partir de silicium de type-n (dopé au Phosphore) et de type-p (dopé au Bore). Il a affirmé que la structure poreuse de ces surfaces était un facteur essentiel à la désorption et l'ionisation, expliquant que des analyses réalisées sur du verre, du silicium monocristallin oxydé à l'air, des plaques CCM ou encore des plaques d'or ne donnaient aucun résultat. Il a précisé que les surfaces microporeuses, qui présentaient les pores les plus petits étaient celles qui avaient permis d'obtenir le signal le plus intense.

Morphologie du matériau	Diamètre des pores
microporeux	Inférieure ou égale à 2 nm
mesoporeux	Entre 2 et 50 nm
macroporeux	Supérieure à 50 nm

Table A-2. Les différentes morphologies des matériaux poreux selon l'IUPAC [79 IUPAC, 1994].

Selon Siuzdak, deux approches peuvent être envisagées pour expliquer la désorption/ionisation sur le silicium poreux :

- Un transfert des analytes piégés dans le système poreux vers la surface à travers des mécanismes réactionnels,
- Un mécanisme thermique *via* le chauffage rapide du silicium poreux pourrait soit entraîner la vaporisation des molécules de solvant ou de contaminants piégés dans le silicium, soit produire du dihydrogène, ce qui amènerait dans les deux cas à la libération des analytes.

Avec ces plaques de silicium poreux, Siuzdak a analysé une trentaine de composés sur une gamme de masse de 150 à 12 000 Da (caféine, peptides, produits naturels, sucres...) pour lesquels il a obtenu les ions moléculaires avec pas ou peu de fragmentation.

Ces travaux ont été précurseurs dans les techniques LDI utilisant comme matrice uniquement un matériau inerte et sont régulièrement cités en référence. Il faut noter que Siuzdak, en plus de l'acronyme DIOS, a introduit le terme de "matrix-free desorption" pour définir cette approche. Depuis, certaines méthodes ont repris la terminologie de "matrix-free laser desorption/ionization", bien que le terme de matrix-free ne soit pas toujours accepté, puisque le support inorganique joue un rôle de matrice dans ces techniques. Un qualificatif plus adapté pour décrire ces approches serait selon nous le terme "organic matrix-free LDI".

Siuzdak a ensuite poursuivi ses investigations sur le silicium et ses applications en analyse par désorption/ionisation laser [⁸⁰ Lewis *et al.*, 2003; ⁸¹ Shen *et al.*, 2004]. Il a amélioré ses plaques DIOS en faisant varier de nombreuses conditions opératoires de la gravure chimique (orientation du silicium cristallin, résistivité, solution de gravure, densité du courant de gravure, temps de gravure et irradiation), conférant aux surfaces de silicium poreux différentes structures et propriétés physico-chimiques. En se focalisant sur une gamme d'analyse plus restreinte (100 - 3 000 Da), d'autres composés de faibles masses ont alors pu être détectés (peptides, produits naturels, petites molécules organiques et polymères). Il a également réussi à mettre en pratique sa technique DIOS pour d'autres applications, comme l'analyse quantitative de stéroïdes dans l'urine, la réalisation d'expériences de spectrométrie de masse post source-decay (PSD) ou la séparation *in situ* de composés sur des plaques DIOS [⁸² Shen *et al.*, 2001]. Conscient du fort potentiel de la technique DIOS, son équipe a étendu les champs d'investigation à la caractérisation de protéines. Des suivis de réaction enzyme/substrat (acétylcholine/acétylcholine estérase) et des analyses de digestats trypsiques de protéines (acétylcholine estérase, albumine de sérum bovin (BSA), β -lactoglobuline) [⁸³ Thomas *et al.*, 2001], ont été mis en œuvre. En outre, la méthodologie a aussi été appliquée à l'analyse de petites molécules organiques en démontrant son intérêt en sciences médico-légales pour la détection et l'identification de spermicides provenant de produits contraceptifs commerciaux, discernés parmi des mélanges de PEG [⁸⁴ Thomas *et al.*, 2001]. Avec l'apparition de la technologie TOF/TOF, l'équipe a également profité de la possibilité de réaliser des expériences de spectrométrie de masse en tandem (DIOS-TOF/TOF) pour fragmenter un peptide issu du digestat trypsique de la BSA (YLYEIAR) et deux petites molécules (chlorpromazine et cimetidine) [⁸⁵ Go *et al.*, 2003].

Siuzdak ayant ainsi ouvert la porte à une stratégie très prometteuse, l'intérêt pour les méthodologies LDI reposant sur l'utilisation unique d'un matériau inerte, et en particulier du silicium poreux, s'est

considérablement étendu. Dans ce contexte, le constructeur Waters a d'ailleurs acheté cette technologie, et a présenté en 2003 lors de l'International Mass Spectrometry Conference (IMSC) à Edimbourg les plaques DIOS commerciales prêtes à l'emploi (MassPREP™ DIOS-Target™) en tant qu'outils d'analyse de composés de faibles masses moléculaires [⁸⁶ Waters, 2007].

D'autres équipes de recherche ont tenté d'optimiser la fabrication des surfaces de silicium poreux. A ce propos, Górecka-Drzazga et ses collaborateurs ont publié en 2004 des résultats obtenus avec l'approche DIOS pour l'analyse de catécholamines synthétiques [⁸⁷ Górecka-Drzazga *et al.*, 2004] et endogènes [⁸⁸ Kraj *et al.*, 2006] (noradrénaline, norépinephrine et dopamine) mais à partir selon eux d'une nouvelle surface de silicium poreux oxydé. Ils ont d'ailleurs utilisé le terme de Desorption/Ionization on porous Silicon Dioxide (DIOD) pour qualifier leur travaux. Bien que le procédé d'obtention des surfaces comporte quelques modifications par rapport à ce qui avait déjà été publié, il faut cependant se rappeler que parmi les surfaces développées par Siuzdak, une fonctionnalisation de silicium oxydé avait déjà été testée et avait donné de moins bons résultats que les greffages par des molécules hydrophobes. Contrairement à Siuzdak, les auteurs ont suggéré que l'oxydation thermique appliquée à la surface réduisait le diamètre des pores, ce qui expliquait l'amélioration de l'ionisation des échantillons étudiés.

Suite à l'enthousiasme suscité par le développement de ces méthodologies, l'équipe de Siuzdak a poursuivi son travail sur la fonctionnalisation de surface pour améliorer les performances de sa méthode. Toujours convaincu par le potentiel des greffages de groupements hydrophobes, des surfaces de silicium poreux silylé ont été présentées la même année [⁸⁹ Trauger *et al.*, 2004]. Partant du principe que la silylation était une chimie maîtrisée depuis longtemps pour la mise au point de supports chromatographiques (phase inverse), elle pouvait être facilement transposée à la surface DIOS oxydée. La fonctionnalisation du silicium poreux oxydé sur les groupements silanol (Si-OH) a permis de disposer de différents greffages en surface du silicium de type Si-O-Si-R, R possédant entre autres soit une fonction aminée, carbonée (C8 et C18) ou perfluorée. Cette dérivatisation a eu plusieurs conséquences positives telles que :

- Améliorer la résistance du support vis-à-vis de l'environnement (air/solvant),
- Extraire des analytes d'un milieu complexe (sels, composés non volatiles), par absorption sur le support *via* des interactions hydrophobes/hydrophiles entre l'analyte et les groupements fonctionnels. Pour cela, il a été précisé que déposer la goutte d'échantillon, la laisser au contact du support un temps défini, puis l'aspirer, permettaient d'enrichir les composés d'intérêt. Dans ces conditions, il a été possible de détecter des composés pour lesquels aucun signal n'était obtenu en dépôt classique. Cette technique correspondant à une extraction solide-liquide a d'ailleurs été assimilée dans la bibliographie sous le terme de

DIOS-SLE (Solid Liquid Extraction) [37 Cohen *et al.*, 2007]. On notera que la méthodologie se rapproche du principe de la technique SELDI sans matrice organique,

- Augmenter la sensibilité de détection en choisissant la fonctionnalisation la plus appropriée, telle que présentée dans la **Figure A-18**. Les meilleurs résultats ont été observés avec les fonctionnalisations perfluorées, avec lesquelles une analyse de 800 yoctomoles du peptide des-Arg⁹-bradykinine a même été présentée [89 Trauger *et al.*, 2004].

Surface modification

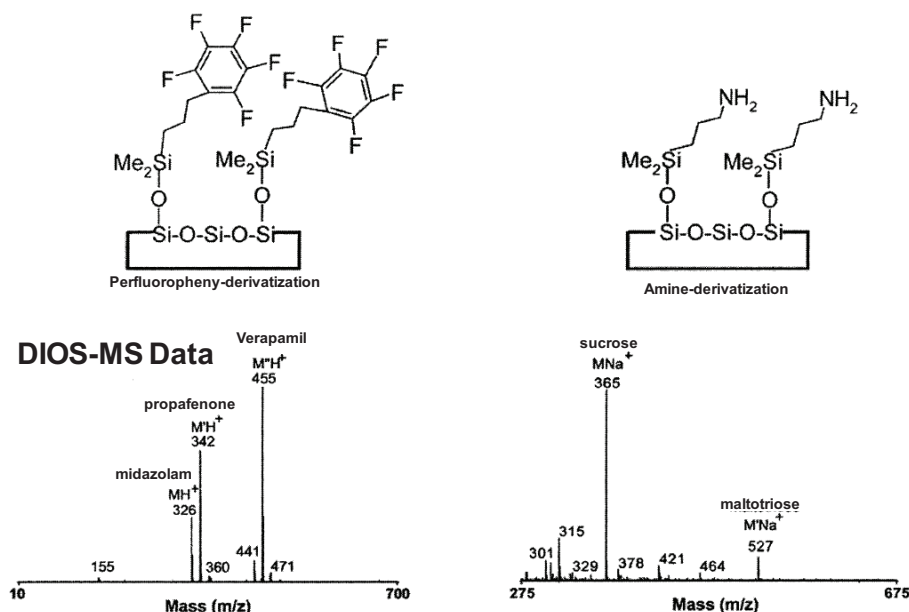


Figure A-18. Spectres de mélanges de petites molécules obtenus sur les surfaces DIOS avec deux fonctionnalisations différentes, d'après [89 Trauger *et al.*, 2004].

La silylation du silicium poreux ayant ouvert la voie à toute une gamme de fonctionnalisations possibles, d'autres équipes ont également modifié ce support pour l'adapter à leur échantillon. En plus du silicium poreux nu (pSi-H) et oxydé (pSi-OH), Shmigol a par exemple fonctionnalisé le silicium poreux avec des groupements anioniques (pSi-R⁻) et cationiques (pSi-R⁺) pour analyser des colorants ioniques modèles [90 Shmigol *et al.*, 2009]. Cette méthodologie lui a permis de définir une relation entre la fonctionnalisation de la surface et le mécanisme mis en jeu pour l'ionisation et la détection du bleu de méthylène (MB), aboutissant aux conclusions suivantes :

- Dans le cas des pSi-H et pSi-OH, le bleu de méthylène est détecté sous forme [MB+H]⁺, ce qui correspond à la réduction/protonation du MB⁺ initial. Cette réduction avait déjà été observée en LDI avec des substrats inertes sur des supports de titane (discutée ultérieurement dans ce chapitre) [91 Gnaser *et al.*, 2005], sur les surfaces DIOS ainsi qu'en analyse MALDI où elle était alors dépendante des conditions opératoires utilisées [92 Okuno *et al.*, 2004]. Ce mécanisme énergétiquement favorable consiste en (1) l'excitation laser du substrat pour former des paires trous – électrons libres, (2) la réduction du MB⁺ en MB[•] par

les électrons émis et (3) le transfert de proton à MB^+ via des interactions avec les groupements Si-OH acides de la surface.

- Dans le cas des $pSi-R^-$, ce mécanisme est très limité car les groupements greffés R^- qui interagissent avec le MB^+ , sont suffisamment loin de la surface pour permettre aux électrons libres de réduire le cation. Il est alors détecté directement sous forme MB^+ , probablement par une désorption thermique directe.

Cet exemple illustre parfaitement les effets de la fonctionnalisation sur le changement des propriétés du matériau vis-à-vis de l'interaction laser.

En 2006, Siuzdak a poursuivi sa quête de la méthode LDI idéale en améliorant non pas sa surface DIOS mais son protocole analytique. Comme Chen avec le SALDI [58 Chen *et al.*, 2000], et s'appuyant sur des études qui avaient introduit le concept de "surfactant-aided MALDI" en démontrant que l'utilisation de dodécylsulfate de sodium (SDS) pouvait affecter positivement l'analyse de peptides [93 Breaux *et al.*, 2000], il a utilisé des tensioactifs pour augmenter l'intensité du signal obtenu à partir de ses surfaces DIOS. Plusieurs molécules amphiphiles, présentées dans la Figure A-19.a., ont été sélectionnées et testées pour l'analyse de petits composés organiques (*e.g.* sucres, peptides).

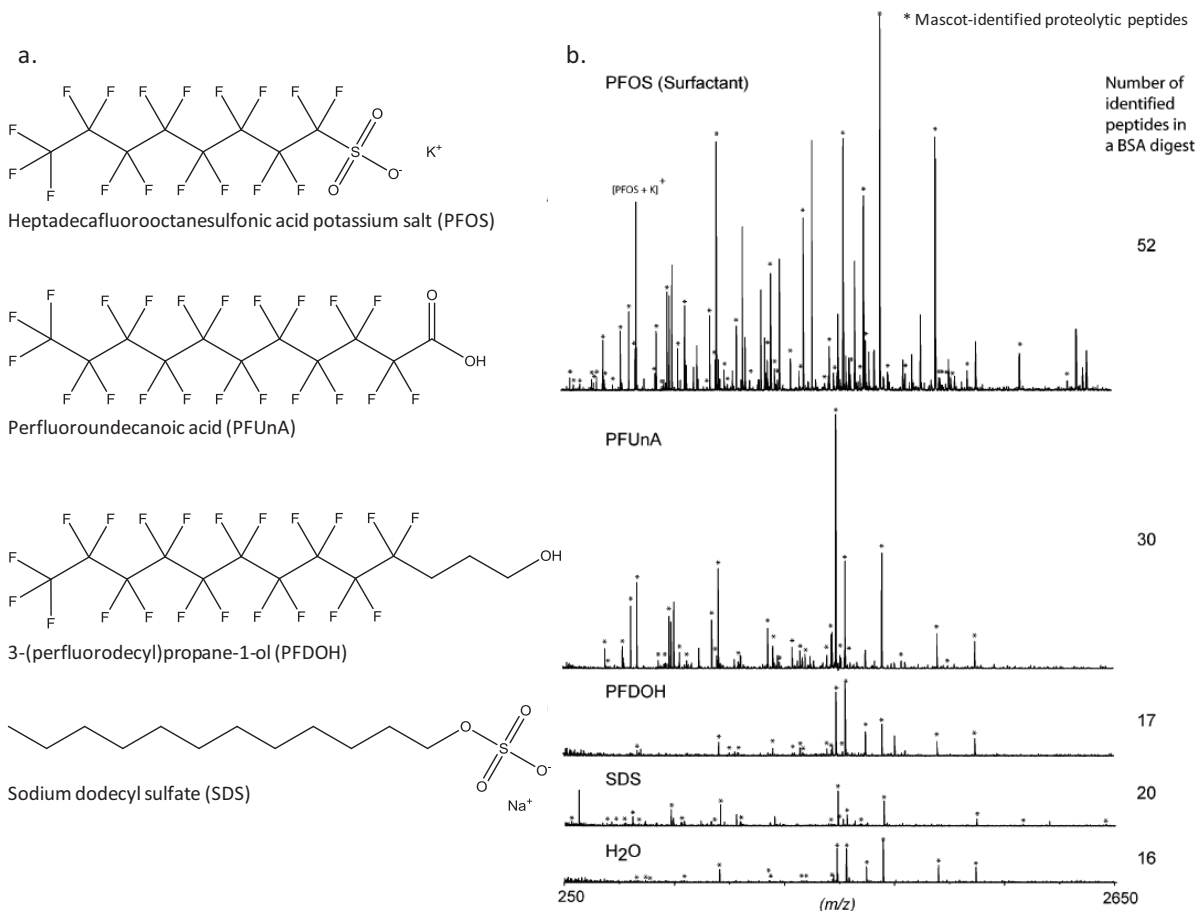


Figure A-19.a. Les structures des différents tensioactifs étudiés b. Spectres de masse de la BSA (100 fmol) obtenus sur la surface DIOS selon différents tensioactifs (0,25 mM) d'après [94 Nordstrom *et al.*, 2006].

De la même manière que pour les fonctionnalisations de surface, les tensioactifs perfluorés ont été privilégiés, le SDS étant tout de même utilisé comme contrôle. Par rapport à une analyse réalisée en condition aqueuse, la présence de tensioactifs perfluorés a engendré une amélioration de la détection, particulièrement importante avec le sel de potassium de l'acide perfluorosulfonique (PFOS). Cette augmentation de performance a été appréciée notamment sur des analyses de digestats de la BSA à travers une amplification des signaux existants, un nombre de peptides détectés plus important et un seuil de détection inférieur en présence du PFOS comme illustré en **Figure A-19.b**. Cependant, cet effet bénéfique est à nuancer par le fait que ces tensioactifs peuvent, de la même façon qu'une matrice, être ionisés et détectés sur le spectre. En effet, en 2009, une étude de Arakawa a montré que le PFOS pouvait être analysé avec une surface DIOS à des seuils de concentration très faibles [⁹⁵ Kawasaki *et al.*, 2009]. Comme tout adjuvant d'ionisation, la concentration de ces composés doit donc être choisie avec attention pour obtenir un effet favorable à l'amélioration de l'ionisation des analytes tout en limitant la contrainte spectrale occasionnée par la détection de l'agent d'ionisation.

A ce sujet, il faut noter que dans de nombreuses méthodologies LDI, un adjuvant d'ionisation est très souvent utilisé pour améliorer le rendement d'ionisation (*e.g.* acide citrique, citrate d'ammonium). Bien que cet additif puisse être assimilé à une matrice organique libre, l'adjuvant n'est utilisé qu'en très faible quantité (0,01 – 0,1 %). Le mécanisme de désorption/ionisation ne repose donc vraisemblablement pas sur cet adjuvant, mais bien sur le support utilisé. Il n'a donc pas été considéré comme une matrice organique MALDI.

Récemment, une autre approche développée par Voelcker avec l'aide de Siuzdak et reposant sur le concept de la méthodologie SELDI, a été de combiner une chromatographie d'affinité (l'immunocapture) à la technique DIOS pour parvenir à une méthode alliant purification et analyse *in situ* sur la même surface [⁹⁶ Lowe *et al.*, 2010]. Dans le contexte d'investigations de police scientifique, ces surfaces de silicium poreux fonctionnalisées par des anticorps ont permis la détection sélective de benzodiazépines en présence de cocaïne.

Au cours des dix dernières années, les développements de la technique DIOS l'ont rendu de plus en plus performante et attractive pour de nombreuses recherches. Sans faire une liste exhaustive de tous les travaux pour lesquels ces surfaces DIOS ont été employés en tant qu'outils analytiques, nous citerons quelques applications particulières, telles que l'analyse de métabolites endogènes (catécholamines, acides aminées...) [⁹⁷ Kraj *et al.*, 2003; ⁹⁸ Vaidyanathan *et al.*, 2005], ou encore d'acides gras synthétiques [⁹⁹ Budimir *et al.*, 2007; ¹⁰⁰ Budimir *et al.*, 2006]. Parmi les utilisations innovantes, il faut également mentionner un des premiers résultats d'imagerie LDI sur substrat inerte

publié par He [¹⁰¹ Liu *et al.*, 2007]. Dans ces travaux, la plaque DIOS est utilisée comme support pour cartographier directement des petites molécules issues de tissus. L'objectif d'utiliser cette technique alternative à la technique d'imagerie MALDI traditionnelle était de limiter la diffusion du phénomène de désorption lors d'un impact laser due à la taille des cristaux de matrice, afin d'augmenter la résolution spatiale de la technique. Cependant, cette approche a présenté deux difficultés. La première réside en la position de la matrice inerte qui se situe sous l'échantillon. Pour conserver un rendement de désorption/ionisation suffisant à l'analyse, il est donc nécessaire d'obtenir une coupe la plus fine possible pour conserver les interactions laser-silicium et silicium-échantillon. La seconde provient de la puissance laser requise pour désorber l'échantillon qui est relativement importante, et qui se traduit par une augmentation de l'impact du laser sur le tissu.

Afin de tenter de mieux comprendre les phénomènes permettant d'accéder à un processus de désorption/ionisation sur ces substrats silicieux, Vertes s'est intéressé dès 2005 aux effets des modifications de surface et des propriétés du laser sur le transfert d'énergie [¹⁰² Luo *et al.*, 2005]. Comme décrit aussi par Siuzdak, Vertes explique que le substrat de silicium poreux absorbe l'énergie du laser puis, avec l'augmentation de la température en surface, il en résulte la désorption des analytes adsorbés et du solvant piégé dans les pores. Pendant quelques nanosecondes, il est en effet estimé que la température en surface peut monter à 600 K (327 °C), ce qui conduit à une évaporation rapide ou à une décomposition des molécules. Cependant, de la même manière que pour l'ionisation MALDI, le mécanisme détaillé de la technique DIOS reste mal compris et plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer, seules ou en combinaison, la production d'ion :

- Des transferts d'électrons entre la surface et les analytes,
- Des transferts de protons entre les groupements Si-H et les analytes,
- Des réactions de photoionisation entre les molécules de solvant piégées dans les pores et les analytes,
- La présence d'ions préformés dans l'échantillon déposé.

Il semble difficile d'envisager un transfert de proton entre les groupements Si-H (hydrogène non acide) et les analytes comme suggéré dans cet article. Des discussions ultérieures sur une réactivité de surface du silicium sous l'impact du faisceau laser indiqueraient la formation d'entités oxydées de type Si-OH qui, à notre avis, peuvent alors être de meilleurs candidates impliquées dans le processus LDI (réaction acido-basique et entraînement par vaporisation en phase gazeuse) [¹⁰³ Northen *et al.*, 2007]. Alors que seule la production de dihydrogène est mentionnée par Siuzdak dans la publication originelle [⁷⁸ Wei *et al.*, 1999], nous pouvons alors supposer que la condensation de groupements silanol SiOH sous l'impact laser génère aussi l'émission de H₂O.

Différents facteurs comme la morphologie de la couche poreuse de silicium, la mouillabilité de la surface ou la nature des dérivatisations vont particulièrement influencer sur l'ionisation. Pour estimer

leur impact sur le transfert d'énergie, Vertes a utilisé une méthode connue en MALDI et en ESI qui consiste à utiliser des ions dits thermomètres, généralement des sels chlorés de benzylpyridinium (BP), pour évaluer le transfert d'énergie interne des ions. En déterminant le rendement de survie des ions moléculaires par rapport aux ions fragments formés, leur énergie interne peut être appréciée en utilisant la théorie de décomposition unimoléculaire (RRKM). En MALDI, il a été démontré que l'énergie interne était principalement dépendante de la matrice organique utilisée, de la fluence et de la largeur d'impulsion du laser. Vertes a donc utilisé cette méthode de rendement de survie d'ion (SY pour survival yield), en utilisant les différentes fonctionnalisations déjà décrites dans les méthodes DIOS et en variant également les paramètres du laser. Les résultats ont ensuite été comparés avec ceux obtenus dans des conditions d'analyse MALDI. Les expériences menées ont permis de conclure que le transfert d'énergie interne était peu sensible à la fluence laser dans la technique DIOS, au contraire de ce qui était observé dans l'ionisation MALDI où il apparaît un seuil de fluence laser pour lequel la fragmentation des ions sondes devient majoritaire. La nature de la fonctionnalisation n'a également eu que peu d'effet sur le taux d'ions survivants, mais elle a en revanche affecté fortement la fluence laser nécessaire à la production des ions. Les résultats nécessitant la plus faible puissance laser ont été obtenus avec la fonctionnalisation perfluorée. On notera qu'elle a été supérieure en DIOS quel que soient les paramètres de laser utilisés. Les comparaisons entre la technique DIOS et l'ionisation MALDI assistée par l'HCCA ont aussi démontré que l'énergie interne était plus faible avec la matrice organique (taux de survie d'ion plus important). Selon Vertes, les principales différences observées entre les deux techniques peuvent être expliquées par plusieurs points :

- Alors que le transfert d'énergie interne dans le "plume" du MALDI est un procédé homogène (c'est-à-dire que la matrice et les analytes passent en phase gazeuse ensemble), le procédé est hétérogène en DIOS, puisque la surface de silicium reste fixe quand les analytes sont désorbés,
- En raison du confinement imposé par la structure poreuse, l'expansion gazeuse n'est pas libre et la densité du "plume" peut être maintenue pendant une plus longue période que dans un processus MALDI où elle peut s'étendre dans toutes les dimensions,
- L'énergie d'activation en DIOS est très fortement dépendante de la fonctionnalisation de surface.

En 2007, il a été ensuite suggéré que le processus DIOS n'était pas essentiellement un processus thermique mais qu'une surface spécifique élevée jouait un rôle prépondérant dans la désorption/ionisation [¹⁰³ Northen *et al.*, 2007]. Dans cette étude, la microscopie à balayage électronique (SEM) a été utilisée en complément d'analyse par spectrométrie de masse pour examiner la corrélation entre la génération d'ion intact et les modifications de la morphologie de surface. Le processus DIOS est apparu fortement dépendant de l'énergie du laser. Il a en effet été

montré que l'apparition des ions est corrélée à une restructuration de surface, induisant la formation d'espèces Si_n^+ et OSiH^+ , qui sont observés à une valeur seuil d'énergie de laser. Pour augmenter les performances de la méthode, les auteurs suggèrent donc d'utiliser des structurations présentant une surface spécifique plus importante, permettant d'utiliser une puissance laser plus faible. C'est pour satisfaire entre autre cet objectif qu'ont été développés les substrats discutés dans la partie suivante.

1.3.2.2.1.2. Les nouvelles surfaces de silicium structurées

Outre la gravure chimique conventionnelle à l'acide fluorhydrique (HF), d'autres équipes ont ensuite mis en œuvre des procédés d'élaboration plus marginaux pour concevoir des substrats LDI. Pour cela, d'autres types de gravures chimiques et physiques ou même des techniques différentes d'élaboration de matériaux ont été utilisés. Dès 2001, le dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma (PECVD) a été utilisé par Cuiffi pour réaliser un film de silicium nanostructuré sur un support adapté (verre ou plastique) [¹⁰⁴ Cuiffi *et al.*, 2001]. Ce substrat, dont la morphologie correspondait à un assemblage de colonnes verticales de l'ordre de 10 nm de diamètre et espacées d'une centaine de nm, a rendu possible l'analyse de peptides et de petites protéines de masses inférieures à 6 000 Da. Selon les auteurs, cette approche a permis de s'affranchir des problèmes de contamination rencontrés dans les procédés de gravure et de stockage en conservant le film sous vide et en ne l'exposant à l'air que pour le dépôt de l'échantillon et l'analyse. Bien que l'équipe ne soit pas allée plus loin sur le sujet, elle a abordé dans ces travaux un point crucial de ces méthodologies en cette problématique de conditionnement.

Ce n'est ensuite qu'en 2005 que d'autres types de surface de silicium plus architecturées sont apparus en tant que support dans les développements de méthodes LDI. He et ses collaborateurs ont d'abord présenté une surface dure de silicium nanostructurée par gravure sèche RIE (Reactive Ion Etching pour gravure ionique réactive) [¹⁰⁵ Finkel *et al.*, 2005]. Dans ces travaux, une oxydation a été réalisée sur un wafer de silicium, puis des billes de silice ont été déposées en surface pour créer, après évaporation, un film (**Figure A-20**). Ensuite, la technique RIE a été appliquée par la mise en œuvre d'un plasma, formé à partir des gaz SF_6 (hexafluorure de soufre) et O_2 (oxygène) utilisés pour bombarder la surface du wafer. Les gaz ionisés ont alors réagi physiquement et chimiquement avec la surface des zones non protégées par la silice, entraînant la désorption de matière, créant ainsi les nanostructures. La particularité de ce support était de présenter en surface un réseau de nanocavités ordonnées pouvant être modifiées géométriquement. L'efficacité de l'analyse de petits peptides (*e.g.* bradykinine, angiotensine) a été discutée selon plusieurs paramètres, notamment la largeur et la profondeur des cavités, qui ont démontré une influence sur le rendement d'ionisation.

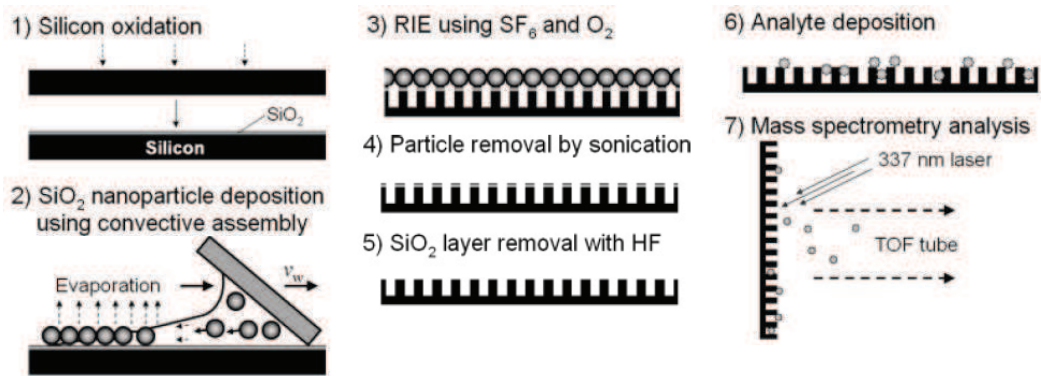


Figure A-20. Schéma de fabrication du réseau de nanocavités ordonnées de silicium par RIE d'après [105 Finkel *et al.*, 2005].

Il est à signaler qu'un substrat présentant un réseau similaire de nanocavités ordonnées a également été réalisé par lithographie par faisceau d'électrons (e-beam lithography) en 2009 pour étudier l'impact de la morphologie de surface sur les performances [106 Xiao *et al.*, 2009]. Par la méthode de rendement de survie d'ions (SY), les auteurs ont suggéré que deux processus compétiteurs intervenaient selon la porosité du matériaux (comprise entre 5% et 92% de la surface totale) : une désorption/ionisation directe principalement observés pour les substrats à faible porosité, vraisemblablement d'origine thermique ; et une désorption/ionisation favorisée par les molécules de solvant piégées dans les substrats hautement poreux et jouant le rôle de matrice, suivant un mécanisme similaire au MALDI.

La même année, une collaboration entre une entreprise, NanoSys., et l'équipe de Siuzdak, a abouti à l'introduction de nanofils de silicium (SiNWs pour Silicon Nanowires) pour assister la désorption/ionisation dans des travaux qui allaient être une nouvelle fois parmi les plus innovants et les plus marquants dans la communauté [107 Go *et al.*, 2005]. Bien connus pour leurs nombreuses applications en électronique, photonique ou optoélectronique, les nanofils de silicium sont des structures qui présentent un diamètre de dimension nanométrique mais qui ont une longueur non définie, généralement de l'ordre du μm , et dont les propriétés sont principalement dépendantes de ces deux dimensions. Dans ce cas, ils ont été préparés par une approche de croissance ascendante (croissance VLS pour Vapor-Liquid-Solid) donnant lieu à une structure composée de nanofils de silicium de 10, 20 et 40 nm de diamètre et 1 μm de longueur, oxydés en surface. De la même manière que pour le DIOS, ces surfaces ont ensuite été fonctionnalisées par silylation avec un groupement fluoré (PFPPDCS pour pentafluorophénylpropyldiméthylchlorosilane). Au contraire de ce qui était attendu, peu de différences sur les données MS ont été observées à partir des nanofils de différents diamètres qui ont permis d'atteindre des seuils de sensibilité similaires. En revanche, les investigations menées sur l'énergie de l'irradiation laser nécessaire à la désorption/ionisation ont démontré tout l'intérêt des nanofils de silicium vis-à-vis d'autres supports LDI, comme le silicium

poreux (pSi) ou la désorption/ionisation laser utilisant des matrices organiques telles que l'HCCA, le DHB ou l'acide sinapinique (SA). En effet, comme illustré dans les **Figure A-21.A** et **B.**, les SiNWs ne nécessitent que peu d'énergie laser par impulsion par comparaison aux deux autres techniques étudiées (MALDI et pSi). Déjà utilisée pour la méthodologie DIOS, la méthode de rendements de survie d'ion (SY) a permis d'apporter des informations sur l'énergie interne des ions produits en phase gazeuse, en se basant sur la relation entre le degré de fragmentation d'un ion dit thermomètre et la quantité d'énergie interne qu'il contient. L'analyse de l'ion 3-méthoxybenzylpyrimidium a mis en évidence que le taux de survivants était plus important pour les surfaces de SiNWs "classiques" et pour celles comportant des motifs (photolithographie) que pour les autres matrices, la puissance laser requise étant inférieure pour toutes les surfaces de SiNWs (**Figure A-21.C**). A partir de ces expériences, plusieurs conclusions ont été exposées :

- L'énergie nécessaire à la désorption/ionisation laser est moindre avec les surfaces de SiNWs
- La morphologie des surfaces (nanofils "classiques", à motifs, ou dégradés) influence le transfert d'énergie observé au travers des différences de résultats.
- La fragmentation est induite plus facilement à partir d'une surface de SiNWs dégradée.

Selon les auteurs, ces phénomènes pourraient provenir de l'effet optique en champs proche : sous l'irradiation laser, les SiNWs agissent comme des minuscules antennes produisant l'augmentation de champs aux alentours de leurs extrémités. L'énergie laser est alors efficacement concentrée sur une petite zone (proportionnelle à la coupe transversale des nanofils) et il en résulte un effet de désorption de champs générant le passage de l'analyte en phase gazeuse.

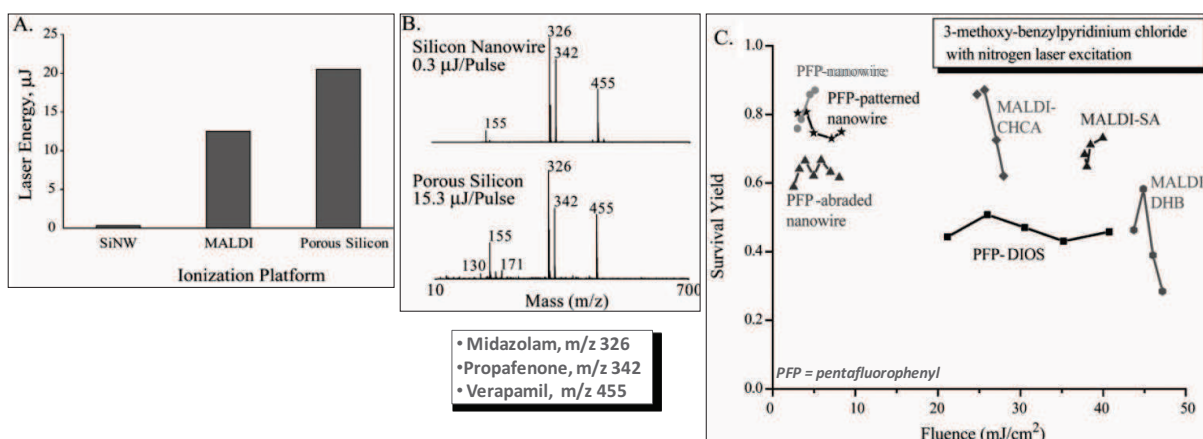


Figure A-21. D'après [107 Go et al., 2005] A. Energie laser par impulsion utilisée dans différentes techniques LDI. B. Comparaison de l'énergie laser requise pour désorber/ioniser des petites molécules sur pSi et sur SiNWs. C. Taux de survivants obtenus pour l'analyse du chlorure de 3-méthoxybenzylpyrimidium selon différentes techniques LDI et MALDI.

Un dernier avantage décrit dans cette étude consiste en l'utilisation de la surface de SiNWs comme plateforme chromatographique en raison de leur important ratio surface/volume et des interactions possibles entre l'analyte et les fonctionnalisations permettant une séparation similaire à celle

effectuée sur une CCM. Cet aspect a été démontré à travers l'analyse de mélanges de petits médicaments (tenoxicam, piroxicam), de drogues dans du sérum humain (cocaïne) et de métabolites endogènes (oléate d'éthanolamine) extraits de moelle épinière de souris.

En 2008, les sociétés NanoSys. et Bruker ont développé la version commerciale de ces supports en tant que méthode LDI utilisable pour l'analyse directe de composés de faibles masses molaires sans aucun recours à une matrice organique [¹⁰⁸ Daniels *et al.*, 2008; ¹⁰⁹ Daniels *et al.*, 2008]. Sous l'acronyme NALDI pour Nano-Assisted Laser Desorption/Ionization, ces cibles directement aimantées sur un support adaptateur peuvent être introduites dans la source des spectromètres de masse MALDI commercialisés par Bruker pour procéder à un protocole d'analyse LDI classique. Une illustration de la cible NALDI est présentée en **Figure A-22.A**.

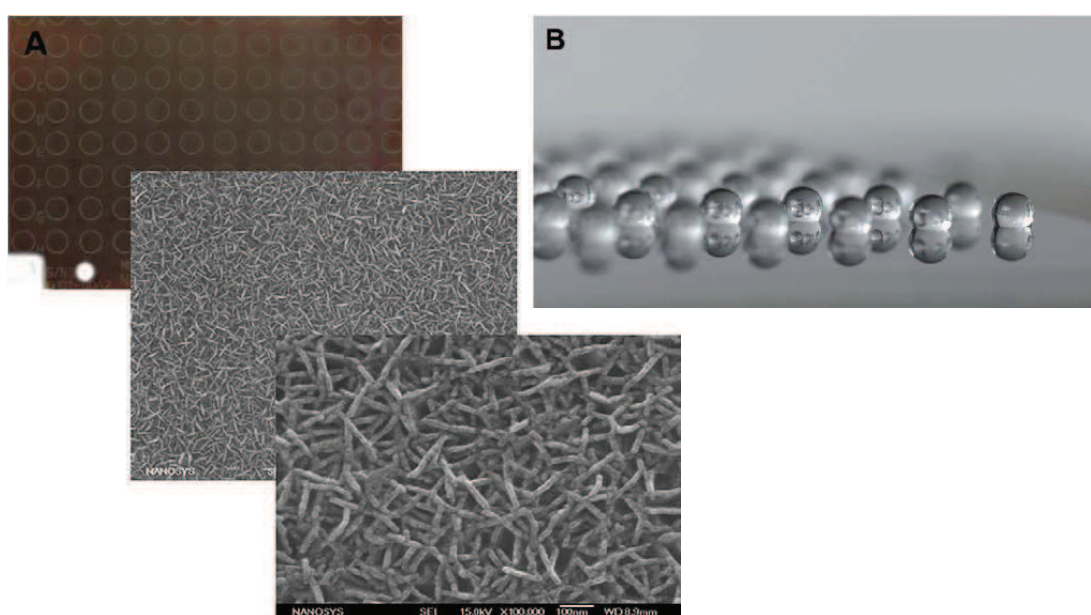
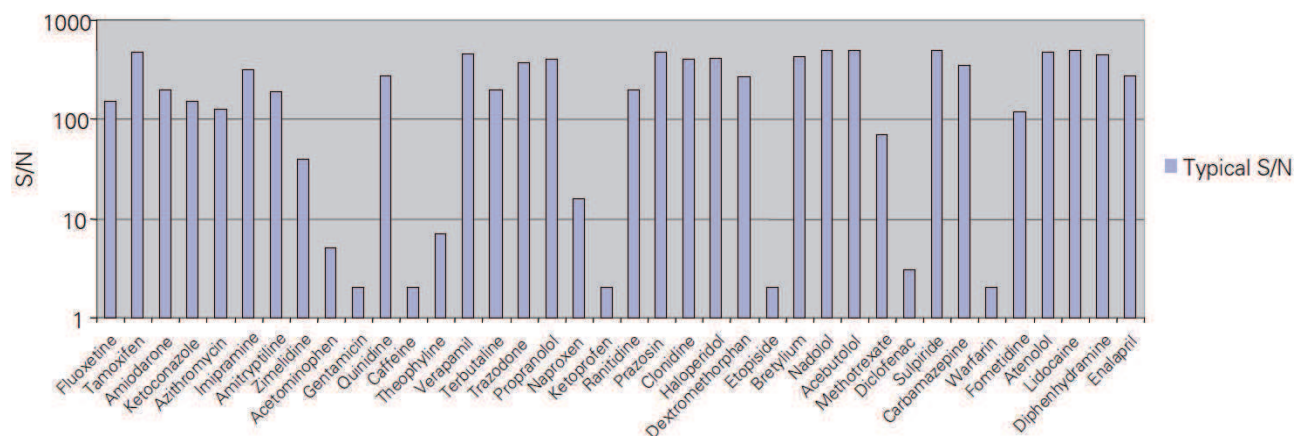


Figure A-22. D'après [¹⁰⁸ Daniels *et al.*, 2008] A. Plaques NALDI et images SEM à deux échelles différentes. B. Illustration du caractère hydrophobe de la surface de SiNWs.

Pour valider les performances de ce support prêt à l'emploi, les limites de détection de nombreux composés pharmaceutiques (énumérés en **Graphe A-2**) ont été évaluées et comparées à celles obtenues avec des méthodologies MALDI. L'étude a affirmé un gain en limite de détection (2 à 10 fois meilleure) en faveur de cette nouvelle méthode LDI. D'autres paramètres importants, telles que la simplicité de la mise en œuvre de la technique, l'homogénéité du dépôt, la capacité d'extraction des analytes vis-à-vis d'un milieu complexe ou la possibilité de mettre en œuvre la spectrométrie de masse en tandem ont également été étudiés et discutés. La fonctionnalisation de ces cibles NALDI, qui n'a pas été dévoilée mais qui vraisemblablement devrait être similaire voire identique à la publication originelle [¹⁰⁷ Go *et al.*, 2005] a été jugée comme étant un facteur important de la compétitivité de ces supports, notamment vis-à-vis des échantillons de nature hydrophobe. La **Figure A-22.B**. présente l'effet de la fonctionnalisation hydrophobe sur le dépôt de gouttes de solvant (Eau/Acétonitrile) sur la cible.



Graph A-2. Représentation des rapports S/N obtenus pour différents composés pharmaceutiques (10 pg/μl, 1 μl déposé) analysés sur les plaques NALDI, d'après [110 Bruker.Daltonics, 2008].

Suite à cette commercialisation, les cibles NALDI ont été au centre de différentes études. Parmi elle, Hardouin et ses collaborateurs ont notamment évalué en 2009 le potentiel de la technique en analysant non plus seulement des petits composés pharmaceutiques mais un éventail de 40 petites molécules aux propriétés différentes sur une gamme de 160 à 1 500 Da (acides aminés, sucres, colorants, peptides, produits naturels, PEG...) nécessitant une adaptation des conditions de solubilisation au cas par cas (eau, acétonitrile, éthanol, dichlorométhane, tétrahydrofurane) [111 Guénin *et al.*, 2009]. La spectrométrie de masse en tandem NALDI-TOF/TOF a également été appliquée pour certains composés et a donné des fragmentations similaires à celles obtenues en MALDI-TOF/TOF et en ESI-MS(n). Ces analyses ont mené à la validation de la méthodologie NALDI pour analyser et caractériser rapidement des petites molécules organiques dans des environnements variés. Les utilisateurs de cette nouvelle technologie LDI ont aussi cherché à l'adapter à leur besoin. Pour exemple, une autre étude a consisté en 2010 à appliquer la méthode NALDI-TOF pour analyser des porphyrines fonctionnalisées, des oligomères polystyréniques et complexes organométalliques et de coordination, notamment pour sa capacité à former des espèces protonées [112 Wyatt *et al.*, 2010]. Bien que ces dernières n'aient pas toujours été obtenues, des espèces complémentaires à celles détectées en MALDI ont souvent montré l'intérêt de la double analyse (MALDI et NALDI).

Comme leur prédécesseur, le support DIOS [101 Liu *et al.*, 2007], les cibles NALDI ont aussi été utilisées comme support analytique dans des expériences d'imagerie par spectrométrie de masse [113 Vidová *et al.*, 2010; 114 Tata *et al.*, 2012]. Dans ces travaux, le protocole de préparation d'échantillon a révélé une particularité puisqu'il a été réalisé un transfert lithographique des analytes, en l'occurrence des lipides, sur la cible NALDI pour créer une empreinte à la surface du support de SiNWs. C'est cette empreinte qui a ensuite été analysée pour créer l'image 2D permettant de localiser les lipides dans la zone étudiée. Il est évident que cette stratégie repose entièrement sur un transfert propre et efficace, tant quantitativement que spatialement, de l'ensemble des lipides du tissu au support

inerte. Une autre application originale a constitué à utiliser les propriétés catalytiques des surfaces de SiNWs nanostructurées pour déterminer les sites d'insaturation dans une chaîne acyle de lipide [¹¹⁵ Pavlásková *et al.*, 2011]. En effet, les auteurs ont discuté dans cette étude que les surfaces NALDI avaient tendance à induire l'oxydation des analytes, causée par l'activité de surface et non par le processus d'ionisation lui-même. Cette oxydation se traduisait donc par une modification de mesure de masse sur le spectre, due à une fragmentation de la chaîne acyle au niveau de la double liaison. En démontrant la dépendance entre le temps d'exposition et l'oxydation, les positions des doubles liaisons présentes sur les chaînes acyles des lipides ont pu être déterminées. Cependant, cet outil n'est applicable que dans le cas où aucun autre site d'oxydation non désiré n'est présent sur la molécule.

Bien que le sigle NALDI soit connu par de nombreux expérimentateurs comme faisant référence aux surfaces commercialisées par Bruker, il est toutefois important de mentionner que simultanément, l'équipe de Kang avait proposé d'utiliser cet acronyme pour définir la méthode Nanowire-Assisted Laser Desorption/Ionization [¹¹⁶ Kang *et al.*, 2005]. Si cette méthode repose sur le même concept, à savoir l'utilisation de nanofils, ils ne sont pas dans ces études constitués uniquement de silicium, mais également d'autres semi-conducteurs : oxyde de zinc, oxyde d'étain, carbure de silicium et nitrure de gallium.

Plutôt que d'utiliser la version commerciale de ce substrat, d'autres équipes ont parallèlement développé leur propre matrice LDI basée sur des nanostructures de silicium. Dans ce contexte, des supports composés de rangées de micro-colonnes de silicium préparées par irradiation laser d'un wafer de silicium (LISMA pour Laser-Induce Silicon Microcolumn Arrays) ont été développés en 2006 comme matrice LDI par Vertes [¹¹⁷ Chen *et al.*, 2006]. La polyvalence de cette technique, démontrée par l'analyse de petits peptides et polymères, a été attribuée aux effets de confinement dus à la morphologie sub-micrométrique ainsi qu'aux propriétés de surface, thermiques et optiques du silicium traité. L'année suivante, plusieurs travaux proposant des substrats de silicium comme matrice LDI ont été présentés. Une importante étude portant sur les relations entre la génération d'ion dans les techniques LDI (dénommée SALDI dans ces travaux) et les propriétés chimiques, physiques et électroniques des matrices de silicium a ainsi été présentée par Alimpiev en collaboration avec Sunner [¹¹⁸ Alimpiev *et al.*, 2008]. A partir du wafer (ou galette) de silicium poli, 6 autres substrats de silicium gravés par une variété de méthodes différentes ont été utilisés pour des expériences LDI :

- 3 substrats de silicium poreux obtenus par gravure chimique à l'acide fluorhydrique, à l'iode et à la vapeur d'une solution d'un mélange HF/H₂O,

- 3 substrats amorphes non poreux générés à partir de films de silicium : (1) poncés par traitement avec une poudre de diamant, (2) recouverts par pulvérisation de silicium cristallin et (3) recouverts par pulvérisation de silicium cristallin puis passivés par hydrogénation (H_2 ou par décomposition du silane SiH_4).

Afin de pouvoir contrôler les variables expérimentales, en limitant notamment l'exposition à l'air et aux contaminations, les auteurs ont réalisé des dépôts d'échantillons en phase gazeuse *in situ* dans la source. Suite à de nombreuses expériences et à des études mécanistiques, les points suivants ont été avancés :

- Des substrats poreux et non-poreux ont démontré des performances équivalentes, ce qui contredit les études, notamment réalisées sur le DIOS, présentant une grande influence de la porosité sur le mécanisme de désorption/ionisation. Parmi les substrats testés, le silicium amorphe a constitué une excellente matrice LDI, tandis que les homologues passivés par hydrogénations n'ont pas constitué un substrat SALDI actif,
- Plus que la géométrie structurale, la rugosité du substrat en surface a été déterminante dans les performances LDI,
- Le rendement de production d'ions n'étant pas optimum lors des premières irradiations UV, les surfaces SALDI nécessitent en fait une activation par des impulsions laser préliminaires de faible puissance afin d'être efficace. Pendant cette activation, la surface est chimiquement modifiée pour donner des groupements polaires généralement de type silanol (comme discuté à la fin de la partie I.3.2.2.1.1. [Les premières surfaces de silicium poreux](#)),
- La formation majoritaire d'ions protonés est principalement gouvernée par l'affinité protonique des analytes. D'après les résultats obtenus, les auteurs ont proposé un modèle de formation de ces ions selon lequel les molécules adsorbées à la surface du silicium, créeraient des liaisons hydrogènes avec les groupements silanols.

Une autre surface nanostructurée a été présentée en 2008 par l'équipe de DeVoe [¹¹⁹ [Tsao et al., 2008](#)]. Ce travail peut être signalé puisqu'en plus de proposer un substrat de silicium poreux nanostructuré (étonnamment référencé en tant que nanofilaments de silicium), un protocole original de déposition d'échantillon a été décrit. Pour cela, l'équipe a utilisé une surface de silicium préparée par gravure chimique dans l' HF/H_2O_2 assistée par de l'or, suivi par une oxydation et une silylation telles que décrites par l'équipe de Siuzdak [⁸⁹ [Trauger et al., 2004](#)]. En plus d'utiliser une stratégie de dépôt classique, un dépôt par électro-mouillage dynamique a été mis en pratique en appliquant un voltage entre la goutte d'échantillon et la surface superhydrophobe. Cette approche a permis de limiter la dispersion de l'échantillon autour de la zone de contact lors du séchage de la goutte en faisant pénétrer l'analyte en profondeur, mouillant ainsi les nanofilaments sur leur dimension verticale. Selon les auteurs, cette procédure a augmenté les interactions peptide-surface et il en a résulté une augmentation conséquente des signaux LDI des peptides étudiés. Cependant, il est

difficile de confirmer la réelle efficacité de ce protocole. En effet, lorsque Tsao, l'ancien étudiant de DeVoe, a pris la suite de ce travail, il n'a plus utilisé le dépôt par électromouillage dynamique. En revanche, il a poursuivi les recherches sur sa surface de silicium poreux (dénommé maintenant surface nanostructurée) en l'utilisant pour dépister des drogues dans des échantillons d'urine [¹²⁰ Cheng *et al.*, 2012]. Par la suite, visant l'optimisation du support, une série de publications est parue pour :

- Proposer des protocoles opératoires différents, avec l'utilisation d'un procédé autocatalytique pour déposer l'or à la surface du silicium et ainsi améliorer la rapidité et l'efficacité de la gravure chimique [¹²¹ Tsao *et al.*, 2012],
- Présenter les relations entre les performances LDI et les paramètres de la procédure de gravure (temps de gravure, résistivité du substrat et composition de la solution) ainsi que les propriétés de la surface résultante [¹²² Chen *et al.*, 2011]. Il est à noter qu'un travail similaire avait été publié par Law quelques temps auparavant, à la différence que les surfaces étaient dans ce cas préparées par gravure chimique assistée à l'iode [¹²³ Law, 2010], comme déjà mentionné dans les travaux d'Alimpiev [¹¹⁸ Alimpiev *et al.*, 2008]. Law avait également étudié les corrélations entre les morphologies des substrats et les performances LDI de différentes surfaces de silicium. Pour parfaire le protocole, il avait également utilisé une procédure de gravure plasma à l'argon habituellement réalisée pour nettoyer le support des espèces résiduelles. Cependant, malgré l'efficacité de la décontamination, cette approche a augmenté la taille de la fine couche dense nanostructurée en surface, ce qui a eu pour effet d'exalter sa réflectivité. Cette conséquence a été toutefois limitée par la modification chimique de surface avec des groupements perfluorés,
- Comparer l'effet de différentes fonctionnalisations appliquées au substrat de silicium par l'intermédiaire d'une couche d'or en surface. Comme illustrées dans la **Figure A-23** extraite de la publication de Tsao [¹²⁴ Tsao *et al.*, 2012], six modifications présentant des caractères hydrophiles, hydrophobes, ioniques et métalliques ont été étudiées à travers l'analyse de peptides aux propriétés différentes pour démontrer la sélectivité des analyses.

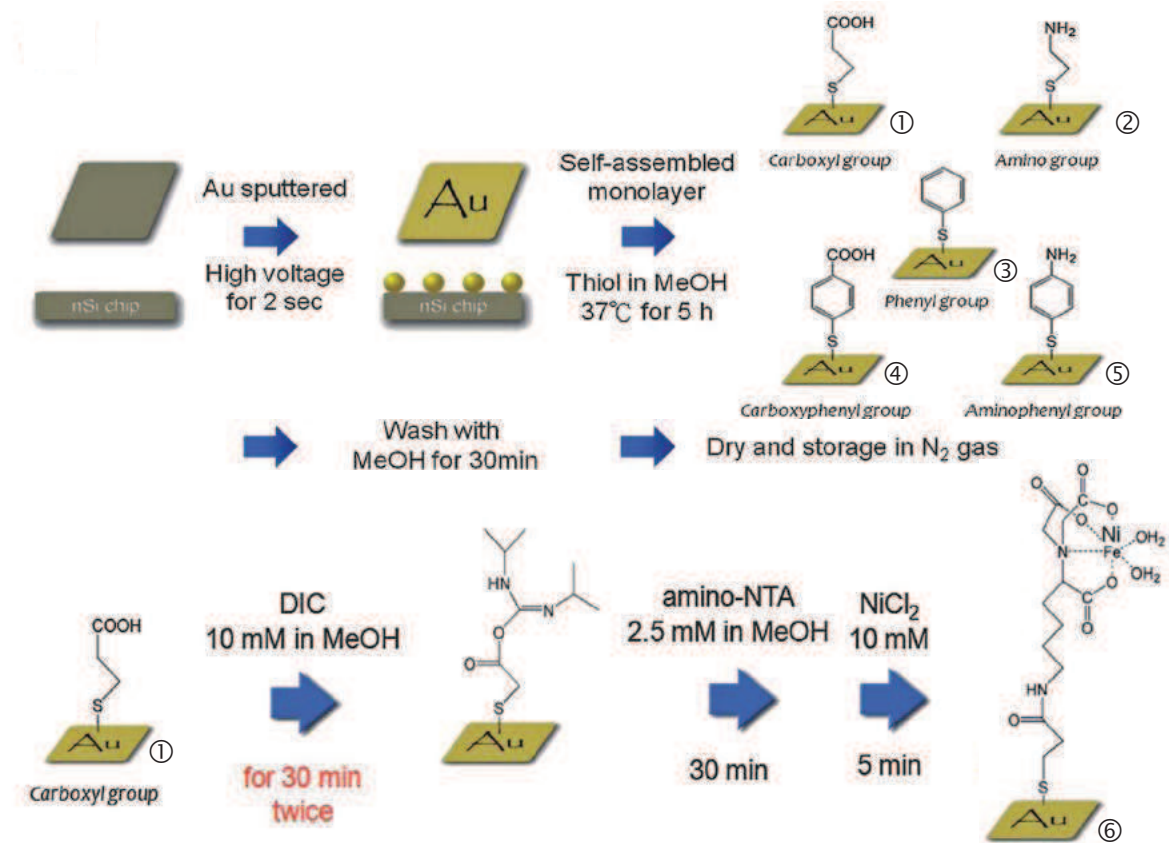


Figure A-23. Schéma des différentes modifications effectuées sur la surface de silicium d'après [124 Tsao et al., 2012].

D'autres supports reposant sur des structurations ou des procédés de synthèse différents ont également été présentés. Par exemple le groupe d'Iyer a réalisé une couche mince de silice ordonnée, préparée par un procédé sol-gel et déposée sur un substrat de silicium, pour analyser des molécules de masses inférieures à 3 000 Da [125 Dattelbaum et al., 2008]. Pour ce faire, des motifs nanoporeux ont été construits par irradiation du film à la lumière UV afin de créer des zones identifiées de dépôt. Ce système composite a également été repris par Jokinen qui a fait varier la nature du substrat (notamment du silicium cristallin et du dioxyde de silicium amorphe) ainsi que celle de la couche déposée en surface (silicium amorphe, nitrure de silicium et dioxyde de titane) en utilisant le dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma (ou PECVD, pour Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition) [126 Jokinen et al., 2009]. Une autre équipe a préféré utiliser la technique de dépôt de couches minces en incidence rasante (GLAD pour GLancing Angle Deposition) pour réaliser des films nanostructurés de silicium [127 Jemere et al., 2010]. Par ailleurs, pour s'assurer du contrôle de la morphologie de la finesse de son substrat, un autre groupe a utilisé l'approche d'auto-assemblage pour préparer des surfaces de silicium ultérieurement modifiées avec des groupements hydrophobes (OTS) ou hydrophiles (amine) [128 Çelikbiçak et al., 2012].

I.3.2.2.1.3. Les matrices colloïdales de particules de silicium ou de silice

Toutes les études réalisées à partir de nanostructures n'ont pas uniquement consisté en des surfaces élaborées. En effet, l'utilisation originelle de particules inspirée par Tanaka s'est maintenue dans les méthodologies LDI. Suites aux premières études mentionnant l'usage de particules de silicium dans les systèmes binaires [⁵⁴ Dale *et al.*, 1996; ⁶² Kinumi *et al.*, 2000], une équipe a utilisé en 2001 des particules de silicium et de gel de silice pour assister la désorption/ionisation laser [⁷⁴ Zhang *et al.*, 2001]. Zhang *et al.* se sont rendus compte que pour un nombre conséquent d'analytes, la méthode DIOS induisait des interférences dans les basses masses du spectre qui gênaient la détection des petites molécules. Pour s'affranchir de cet inconvénient, ils ont utilisé de la poudre de silicium poreux obtenue par éraflure d'une plaque de silicium gravée, et des particules de gel de silice poreuses (5 µm, pores de 20, 100 et 300 Å) et non poreuses (3 µm). En comparant les résultats obtenus pour l'analyse des petites molécules (trois peptides FFFFF, PHY et l'angiotensine ainsi que la β-cyclodextrine) entre la méthode DIOS et les particules de silice poreuses, ils ont pu observer une diminution des contaminations et une amélioration de la qualité des spectres. Dans leurs travaux, aucun résultat n'a été obtenu avec les particules non poreuses, tandis que les particules de gel de silice présentant des tailles de pores les plus élevées ont permis d'accéder à de meilleures performances, ce qui les a conduit à affirmer que la structure poreuse avait une influence sur le mécanisme de désorption/ionisation. Cette approche simple et accessible basée sur le gel de silice a d'ailleurs été reprise par d'autres chercheurs [¹²⁹ Rowell *et al.*, 2009; ¹³⁰ Shariatgorji *et al.*, 2009].

Par ailleurs, après avoir travaillé sur les conditions d'élaboration de surfaces DIOS [¹³¹ Lee *et al.*, 2005], une autre équipe a employé une méthode utilisant la silice mésoporeuse SBA-15 sous forme de silicate et d'aluminosilicate (Si-SBA-15 et Al-SBA-15) [¹³² Lee *et al.*, 2007; ¹³³ Lee *et al.*, 2007]. La silice SBA-15 (au même titre que la silice MCM-41 citée plus tard dans le manuscrit) est une silice mésoporeuse à structure régulière, formée de canaux cylindriques disposés selon un arrangement hexagonal, créant des pores de taille correspondant à des matériaux mésoporeux à l'intérieur de la structure (2-10 nm pour la SBA-15, 5-30 nm pour la MCM-41) et présentant une grande surface spécifique (1000 m²/g). Du fait de leurs très nombreuses applications (catalyse, supports adsorbants et chromatographiques, libération de médicament...), ces matériaux ont une chimie connue et maîtrisée qui assure une facile modularité de leurs propriétés physiques. Surnommée DIOM, pour Desorption/Ionization on Mesoporous Silicate, cette approche a permis d'analyser des petites molécules (90 – 2 000 Da), sans toutefois atteindre de très hautes performances. En 2009, une seconde équipe a tout de même repris l'utilisation de cette même silice mésoporeuse en la fonctionnalisant avec des quinoléines pour améliorer les performances de la méthode [¹³⁴ Li *et al.*, 2009]. Des résultats supérieurs avec cette matrice fonctionnalisée ont été obtenus pour l'analyse d'acides aminés et de sucres, notamment en termes de limite de détection (8 pmol pour la L-

Arginine-HCl), d'interférences imputables à la matrice, et de reproductibilité due à une meilleure homogénéité en solution. Parmi les conditions opératoires optimisées, le méthanol a été défini en tant que solvant de conditionnement de la silice et le ratio analyte/matrice idéal a été établi à 3,5/10. Etonnamment, il a été préconisé un protocole de préparation en deux étapes où l'échantillon est déposé dans un premier temps, puis après séchage, la matrice est déposée sur la couche d'échantillon. Cette méthode de dépôt ("first sample method") a été inspirée d'un travail utilisant une matrice inorganique composée de nanoparticules d'or pour assister l'analyse LDI de sucre [¹³⁵ Wu *et al.*, 2007]. Selon les auteurs, ce protocole permet de répartir de façon homogène une couche de silice sur l'analyte. L'irradiation laser atteint alors préférentiellement la silice, entraînant une augmentation de la température locale à son contact. L'énergie se transfère ensuite à la couche inférieure d'analyte qui est désorbée, vraisemblablement par vaporisation. Selon les auteurs, dans le cas d'un dépôt en goutte sèche, le laser irradie d'abord l'échantillon, il en résulte une moins forte augmentation de la température, d'où une ionisation moins efficace. Cependant, le mode de dépôt double couche où la couche inférieure est constituée par la matrice n'a pas été discuté et il est logique de se demander quelles auraient été les performances de ce protocole.

Suivant la même stratégie, d'autres équipes se sont penchées sur l'utilisation de particules de silicium nanostructurées. Dès 2007, l'équipe de Wysocki a choisi d'utiliser des particules commerciales de 5, 30 et 50 nm pour assister la désorption/ionisation de plusieurs analytes (composés pharmaceutiques, peptides, pesticides...) en étudiant différents protocoles de préparation des poudres [¹³⁶ Wen *et al.*, 2007]. Pour cela, les particules de silicium ont été utilisées non modifiées, mais aussi modifiées par un processus comprenant une gravure chimique à l'HF, suivie d'une oxydation à l'HNO₃ puis d'une fonctionnalisation avec des agents silylés. A partir de l'analyse d'un composé modèle, la propafénone (médicament anti arythmique), les conditions optimisées ont été déterminées pour chaque catégorie de particules. A la différence des particules de 50 nm pour lesquelles la gravure chimique a permis de réduire le diamètre et d'augmenter la surface active en créant une structure poreuse en surface, cette étape n'a pas été bénéfique pour les particules de 30 nm car elle a augmenté les effets d'agrégation des particules de silicium ce qui a induit une baisse des performances de la technique. De fait, il est apparu que les meilleures performances étaient obtenues avec des particules de 30 nm sans gravure chimique, mais avec oxydation et dérivatisation, en particulier avec la même fonctionnalisation perfluorophényl, que celle utilisée pour les nanofils de silicium de Siuzdak (pentafluorophénylpropyldiméthylchlorosilane). Pour situer la méthodologie et valider son caractère d'ionisation douce, plusieurs avantages vis-à-vis des méthodes DIOS et MALDI ont été soulignés : puissance laser requise inférieure, tolérance aux sels supérieure et spectres moins encombrés dans les basses masses. Cependant, les points forts de la méthode n'ont pas seulement été basés sur la performance. En effet, les auteurs ont également mis en exergue une préparation

simple et facile à mettre en œuvre comparée à d'autres méthodes LDI, d'autant plus qu'il a été démontré que le procédé de gravure chimique n'était pas indispensable. Aucun matériel ou dispositif supplémentaire n'étant nécessaire, puisque le dépôt a pu être réalisé sur une plaque MALDI traditionnelle, et les nanoparticules de départ étant disponibles commercialement, cette méthodologie a aussi l'avantage de présenter un faible coût. Intitulée Silicon-Nanoparticle-Assisted Laser Desorption/Ionization, puis SPALDI, cette approche a aussi fait l'objet d'études mécanistiques dans des travaux ultérieurs parus en 2009, par la méthode de rendements de survie d'ion [¹³⁷ Dagan *et al.*, 2009] dans lesquels l'équipe a conclu que le faible contenu en énergie interne des ions produits par SPALDI en faisait une méthode de désorption/ionisation douce. D'autres applications de cette méthode peuvent également être cités, comme des expériences de dissociation induite par la surface (SID pour Surface-Induced Dissociation) [¹³⁸ Yoon *et al.*, 2009] ou l'analyse d'acides gras déprotonés [¹³⁹ Shariatgorji *et al.*, 2009].

En résumé, il est important de souligner le grand nombre de travaux utilisant des matrices siliciques. Bien qu'ils émanent pour la plupart de quelques groupes de recherche pilotes, ils ont été repris et modifiés par d'autres équipes. De nombreuses variantes sont ainsi introduites, avec en particulier des divergences dans les propriétés souhaitées des matériaux étudiés, rendant difficile la détermination des paramètres nécessaires et suffisants pour la conduite d'analyses LDI sensibles et reproductibles. Le champ d'investigation reste donc ouvert, aussi bien pour les matériaux de type surface, que de type poudre.

1.3.2.2.2. Les structures carbonées

Compte tenu des résultats obtenus avec des systèmes binaires utilisant le graphite dans la technique SALDI, les structures carbonées, majoritairement présentées sous forme de poudre, ont elles aussi fait l'objet de nombreuses recherches dans le cadre de supports assistant la désorption/ionisation laser [¹⁴⁰ Najam-ul-Haq *et al.*, 2007]. Les différentes formes allotropiques du carbone, d'origine naturelle ou synthétique, testées comme substrats LDI sont illustrées en **Figure A-24**.

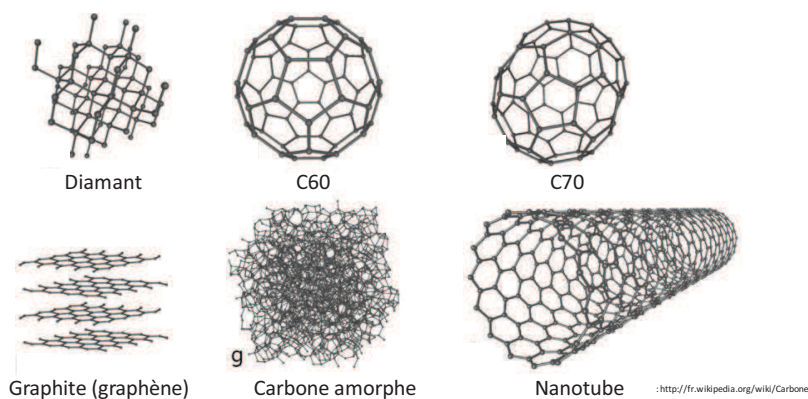


Figure A-24. Les différentes formes allotropiques du Carbone utilisées dans les méthodologies LDI.

Ainsi, dès 1994, Wilet et ses collaborateurs avaient tenté d'utiliser le fullerène C60 comme matrice LDI en raison de sa structure bien définie, sa grande pureté et sa forte absorption dans la région UV [¹⁴¹ Hopwood *et al.*, 1994; ¹⁴² Michalak *et al.*, 1994]. Dans ces travaux, les analytes étaient déposés sur une fine couche de fullerène (~ 10 nm d'épaisseur) puis irradiés avec un laser à azote. Quelques ions avaient été obtenus pour des protéines (*e.g.* Cytochrome C, BSA), mais l'analyse de petits composés biologiques a conduit à des résultats peu concluants. Ceci était apparemment dû à la dispersion inégale d'analyte polaire dans la matrice fullerène non polaire, ce qui a limité le développement de cette approche. En s'inspirant d'autres méthodologies combinant des matrices MALDI à des fullerènes fonctionnalisés pour détecter des peptides et des protéines [¹⁴³ Huang *et al.*, 1999], d'autres équipes ont ensuite utilisé des C60 portant des groupements sulfobutyl [¹⁴⁴ Shiea *et al.*, 2003]. Cette fonctionnalisation a modifié le caractère hydrophobe des C60, augmenté la solubilité de ces structures carbonées dans l'eau. Elle a aussi assuré l'extraction sélective, la concentration et l'analyse d'espèces chargées (tensio-actifs, acides aminés, peptides et protéines), par formation de paires d'ions entre les C60 fonctionnalisés par les groupements sulfates et les analytes chargés positivement, avec une affinité dépendante de leur charge, structure et hydrophilie. Basée sur ces développements, une publication fait mention de l'utilisation d'une couche cristalline de fullerènes C70 pour analyser des stéroïdes synthétiques et des stéroïdes en milieu biologique [¹⁴⁵ Montsko *et al.*, 2009]. Suite à ces recherches, les C60 et C70 ont peu à peu été délaissés au profit d'autres structures carbonées.

Le développement d'autres matériaux carbonés nanostructurés a ensuite amorcé de nouvelles recherches. En 2003, des nanotubes de carbone (CNTs) ont été utilisés pour la première fois en tant que matrice pour assister la LDI de mélanges de petits analytes par le groupe de Xu [¹⁴⁶ Xu *et al.*, 2003]. Les nanotubes de carbone ont été préparés à partir d'électrodes de graphite par ablation par arc électrique et obtenus sous forme de multifeuillets (ou Multi-Walled NanoTubes, MWNT). Dans cette structuration, chaque cylindre, composé de plusieurs feuillets, présentait des diamètres internes de 2 nm et externes de 20 nm qui sont visibles sur la **Figure A-25**, extraite de la publication de Xu, représentant une image des CNTs obtenue par une analyse de microscopie à transmission (TEM). Les CNTs ont permis la détection des peptides quasi-exclusivement sous forme cationisée ($[M+Na]^+$ et $[M+K]^+$), de β -cyclodextrines et de deux dérivés d'acides aminés chlorés. Pour ces deux composés, la désorption/ionisation a nécessité moins de puissance laser que celle requise en analyse MALDI utilisant l'HCCA comme matrice organique, permettant d'accéder à des spectres de masse moins pollués, tout en présentant une résolution spectrale sensiblement meilleure. Des analyses de microscopie ont été réalisées afin de mieux comprendre les interactions possibles entre les CNTs et les analytes à la surface lors du dépôt. Ces expériences ont indiqué que les analytes formaient des solides monocristallins s'adsorbant en surface des CNTs qui ne subissaient pas de changements

d'état (forme, configuration) avant et après le dépôt des analytes. Le support de carbone a alors été considéré comme une plateforme LDI qui, par sa faculté de promouvoir la formation de cristaux à sa surface, simplifiait le protocole de dépôt. Il faut cependant nuancer ces résultats par le fait qu'ils sont dépendants de la capacité des analytes à cristalliser entre eux.

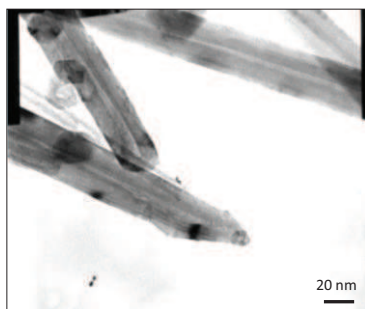


Figure A-25. Image TEM des CNTs d'après [¹⁴⁶Xu *et al.*, 2003].

Une année plus tard, une équipe a repris l'utilisation de CNTs simples feuillets (Single-Walled pour SWNTs) et de fullerène C60 fonctionnalisés pour augmenter l'adsorption des molécules à leur surface tout en conservant leurs propriétés de matrice inorganique LDI [¹⁴⁷Ugarov *et al.*, 2004]. Une fonctionnalisation acide hydrophile a été appliquée aux C60 et aux SWCNTs pour accéder à l'analyse de peptides, tandis que des C60 ont également été dérivatisés avec des fonctions alcanes hydrophobes pour permettre la détection de lipides. L'usage des fullerènes a ainsi rendu possible l'analyse sensible d'échantillons biologiques, favorisée par la possibilité d'utiliser de très faibles quantités de matrice pour promouvoir l'extraction puis la désorption/ionisation des analytes. Cependant, les auteurs ont indiqué que les fullerènes entraînaient des signaux isobariques à leurs analytes. Bien que dans leur cas, ces interférences n'aient pas été gênantes en raison de la capacité de leur appareillage à séparer les entités présentes selon leur mobilité ionique (MALDI-Ion Mobility-TOF), cela s'avère en revanche contraignant avec un spectromètre MALDI-TOF traditionnel. Une seconde limitation est apparue au travers de l'impossibilité d'appliquer cette approche en mode imagerie compte tenu du fait qu'aucune protéine n'a été détectée directement à partir de tissus.

Par la suite, le groupe de Xu a appliqué les CNTs à l'analyse de composés de faibles masses moléculaires en tirant profit de leurs propriétés adsorbantes [¹⁴⁸Pan *et al.*, 2005]. Comme dans la méthode SPE-SALDI développée par Chen, les CNTs ont été utilisés à la fois comme phase solide pour extraire les composés cibles d'un milieu complexe et comme matrice LDI. Des analyses de différents échantillons modèles tels que des petits médicaments (propranolol, cinchonine et quinine) solubilisés à des concentrations de 3 ppm dans de l'urine ont été menées. Les auteurs ont toutefois précisé que l'ajout de glycérol ou de sucrose dans la suspension de CNTs, ce qui revient à mettre en œuvre une méthodologie SALDI, augmentait les performances de la méthode en termes d'intensité et de résolution des signaux. Simultanément avec une autre équipe, le groupe a ensuite oxydé les CNTs pour générer des groupements acides en surface (COOH, COONa et COOK) en vue d'améliorer les

propriétés du support (solubilité dans l'eau, homogénéité du dépôt de matrice) [¹⁴⁹ Pan *et al.*, 2005]. La même année, un travail similaire a été publié par Ren [¹⁵⁰ Ren *et al.*, 2005]. Cette oxydation a aussi entraîné une augmentation de la densité du dépôt et une amélioration de son adhérence à la plaque MALDI avec une augmentation de la surface de contact comme présenté en **Figure A-26**. A travers l'étude de l'hydroxypropyl β -Cyclodextrine, les CNTs oxydés ont alors démontré leur capacité à parfaire la reproductibilité des analyses, intra- et inter-dépôts. La méthode a également été appliquée à l'analyse quantitative de deux alcaloïdes utilisés en médecine chinoise traditionnelle (Jatrorrhizine et Palmitine) sur une gamme de concentration de 1-100 ng/ml, en utilisant un troisième composé (Berbérine) comme étalon interne. Capitalisant sur ces résultats préliminaires, le dosage de petites molécules dans des échantillons environnementaux (*e.g.* alkylphénol et bisphénol A, hydrocarbures aromatiques polycycliques), a été entrepris avec notamment une très grande sensibilité pour les composés les plus polaires [¹⁵¹ Hu *et al.*, 2005]. Parallèlement, l'équipe de Ren a menée l'analyse de biomolécules (oligosaccharides, peptides dont l'insuline) pour démontrer les capacités de la même approche, précisant que les carboxylates introduits en surface des CNTs jouaient également le rôle de source de protons pour les analytes [¹⁵⁰ Ren *et al.*, 2005]. Il a également été démontré la possibilité d'immobiliser les CNTs à la cible MALDI *via* un adhésif en polyuréthane pour s'affranchir totalement des problèmes rencontrés par la dispersion des CNTs dans le vide de la source [¹⁵² Ren *et al.*, 2005].

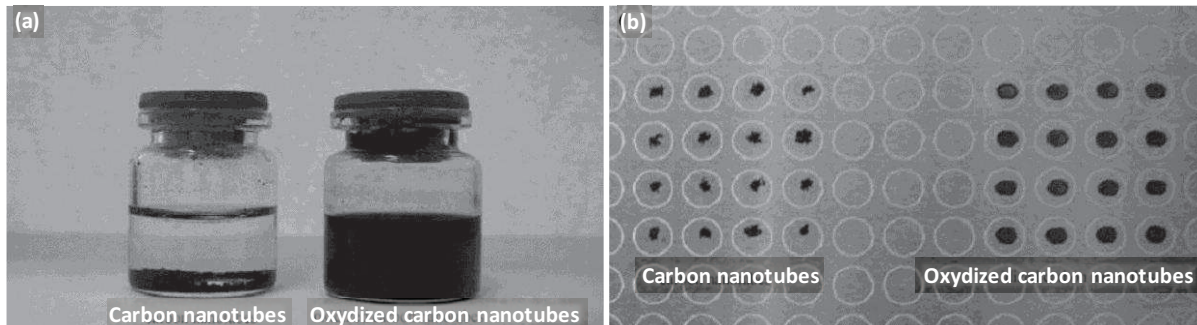


Figure A-26. D'après [¹⁵⁰ Ren *et al.*, 2005], comparaison (a) de la solubilité des CNTs et des CNTs oxydés dans l'eau (b) des dépôts de CNTs et de CNTs oxydés sur la plaque en acier.

A ce stade, d'autres équipes de recherche ont entrepris de modifier le profil et la structure de ces matériaux en vérifiant leur viabilité comme support LDI pour l'analyse de biomolécules. Chen et ses collaborateurs ont employé un autre mode de synthèse pour générer, à partir d'un masque constitué d'une membrane poreuse d'alumine anodisée (AAO pour Anodic Aluminium Oxide), des CNTs plus larges (250 nm de diamètre) pour une longueur de 60 μm [¹⁵³ Chen *et al.*, 2004]. L'intérêt de ses travaux a surtout résidé dans l'utilisation de ces CNTs comme sonde d'affinité pour extraire et concentrer des molécules cibles en amont de l'analyse LDI. Pour cela, des CNTs traités à l'acide citrique ont été générés pour développer un support possédant des charges négatives en surface, afin d'établir des interactions électrostatiques avec des analytes chargés positivement en ajustant le

pH. Pour limiter l'ionisation majoritaire sous forme cationisée observée avec les CNTs développés par l'équipe de Xu, des ajouts de solutions de tampon d'acide citrique/citrate d'ammonium ont été utilisés comme adjuvant. D'un autre côté, l'objectif de Gholipour a consisté à étudier plusieurs conditions opératoires différentes pour juger de l'efficacité des SWNTs dans l'analyse de sucres issus de tissus de plantes [¹⁵⁴ Gholipour *et al.*, 2008]. Pour cela, des SWCNTs commerciaux de faibles diamètres externes (10-30 nm) ont été sélectionnés parmi d'autres catégories de taille, en raison de leur capacité à former un dépôt plus homogène. L'analyse des sucres a été menée de différentes façon : (1) *in situ* par LDI-MS avec des CNTs déposés sur le tissu ou sous le tissu (2) *in situ* par MALDI-MS avec des matrices organiques traditionnelles (DHB, HCCA, norharmane) (3) sur des extraits de tissus en solution par LDI-MS avec les CNTs comme matrice inerte. Le principal avantage des CNTs provient de leur grande robustesse par rapport aux matrices organiques dont le potentiel LDI peut être désactivé en raison d'interactions avec le tissu. Cependant, les auteurs ont indiqué que le succès de la méthodologie était fortement dépendant de la pureté des CNTs. En revanche, les deux méthodes d'analyse *in situ* ont démontré une certaine complémentarité en termes de nature et d'intensité des signaux détectés. Récemment, Hsu *et al.* ont également employé des MWNTs de différentes tailles (≤ 8 nm, 10-30 nm, 20-30 nm et 40-70 nm) pour des stratégies d'enrichissement et d'analyse en LDI d'acides gras présentant de longues chaînes carbonées (20 à 26 carbones) [¹⁵⁵ Hsu *et al.*, 2010]. Cette approche leur a permis de mener des analyses quantitatives et des expériences PSD sur des acides gras issus du plasma dérivatisés avec des ammoniums quaternaires. Mais, à l'encontre des conclusions présentées précédemment, les meilleurs résultats ont été obtenus avec les CNTs ayant le diamètre externe le plus grand (40-70 nm). Il semble de fait difficile de conclure sur les effets des dimensions des CNTs et leurs performances dans les études LDI.

En raison de leur usage courant dans les techniques SALDI, mais aussi probablement à cause de leur accessibilité, d'autres structures carbonées à base de graphite ont également fait l'objet de recherches en tant que support LDI. Déjà en 1998, en se basant sur le travail de Sunner, Zenobi et son équipe avaient recyclé la technique originelle en se basant sur un dépôt solide de particules de graphite (2 μm) mais sans ajout de matrice liquide [¹⁵⁶ Zumbuhl *et al.*, 1998]. Avec cette méthode, qualifiée alors de "dry-GALDI", l'étude et la comparaison du vieillissement du à l'exposition UV de triterpènes naturels dans des résines ont pu être menées de façon plus efficace qu'avec des méthodologies traditionnelles MALDI ou SALDI. Il faut noter que l'expression "dry-SALDI" a d'ailleurs aussi plusieurs fois été employée dans la bibliographie pour désigner des méthodes n'usant pas de matrice liquide, mais basées historiquement ou matériellement sur des méthodologies SALDI. Un autre groupe a ensuite utilisé comme supports LDI directement des plaques artisanales de graphite, réalisées avec des particules de 7 μm , pour analyser successivement des poly(méthylsilsesquioxane) [¹⁵⁷ Kim *et al.*, 2000] et des acides gras non dérivatisés, extraits par hydrolyse alcaline de triglycérides,

d'aliments (lait et huile de maïs) et de phosphatidylcholine [158 Park *et al.*, 2001]. Avec cette méthode dénommée GPLDI (pour graphite plate LDI), les composés analysés, présentant des masses inférieures à 500 Da, ont majoritairement été détectés sous la forme d'adduits sodium.

Pour satisfaire à une méthodologie encore plus rapide à mettre en œuvre et peu coûteuse, d'autres équipes ont repris l'utilisation du graphite sous la forme de dépôt réalisé avec des mines de crayon pour analyser des peptides, des polymères et des actinides [159 Black *et al.*, 2006], toute une gamme de 50 petites molécules [160 Langley *et al.*, 2007] ou des polymères fonctionnels [161 Berger-Nicoletti *et al.*, 2007]. Déjà abordé dans la technique TLC-SALDI développée par Chen [56 Chen *et al.*, 1998], le dépôt a été dans ce cas simplement réalisé en crayonnant directement sur la plaque en acier MALDI puis en déposant la goutte d'échantillon sur la couche inerte, constituée en réalité de graphite en mélange avec de la cire et de l'argile. Plusieurs mines de crayon présentant des duretés différentes établies selon leur composition en graphite ont été testées. Logiquement, les mines les plus grasses ont eu plus de facilité à être utilisées pour réaliser les dépôts sur les plaques en acier. Parmi elles, il s'est avéré que la mine 2B permettait d'obtenir les résultats optimums [160 Langley *et al.*, 2007]. Compte tenu du potentiel du graphite dans l'analyse de petites molécules révélé dans ces études LDI, son usage a ensuite intéressé une équipe de recherche travaillant en imagerie MALDI. En utilisant un aérosol commercial diffusant un spray de graphite colloïdal en suspension dans du 2-propanol, des films de matrices carbonées ont été préparés sur des plaques en acier, prêts à être recouverts par les échantillons ou les coupes de tissus à analyser. Une image de cette surface réalisée en microscopie électronique à balayage est présentée en **Figure A-27**. Avec ce protocole, le groupe de Zang a effectué des expériences MS, MS/MS, IMS et IMS/MS en GALDI pour détecter, localiser et identifier différentes petites molécules dont l'accès en MALDI se trouvait être limité : (1) des phospholipides à partir de tissus de cerveaux de rats [162 Cha *et al.*, 2007], (2) des métabolites (acides gras, flavonoïdes et oligosaccharides) issus de coupes de fruit [163 Zhang *et al.*, 2007], et (3) des flavonoïdes de cires cuticulaires de tissus de plantes [164 Cha *et al.*, 2008].

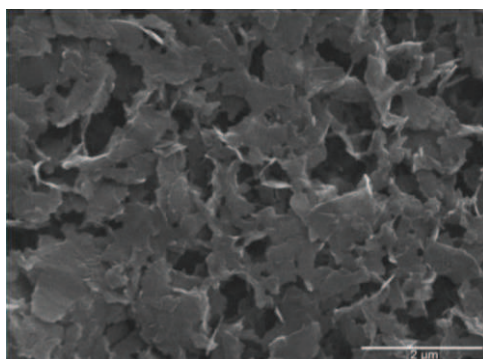


Figure A-27. Image SEM de la surface de graphite colloïdale déposé par nébulisation d'après [162 Cha *et al.*, 2007].

Enfin, une autre approche a consisté en l'utilisation comme support LDI d'un film polymère de graphite hautement orienté (PGS pour Pyrolytic Graphite Sheet) [165 Kawasaki *et al.*, 2009]. LE PGS est

ainsi qualifié car les feuilles de carbone cristallisent selon un ordre planaire dans cette structuration, ce qui conduit à un arrangement horizontal parfaitement aligné des feuilles carbonées. Il en résulte des propriétés d'anisotropie spécifiques qui se traduisent par une capacité de ce matériau à réguler la chaleur, particulièrement dans les espaces confinés, due à une importante conductivité thermique (10 fois supérieure au graphite commun). De plus, ce substrat présente une grande flexibilité et une finesse (100 μm) qui ont contribué à son utilisation dans de nombreux systèmes miniaturisés. Un film commercialisé par l'entreprise Panasonic est présentée en **Figure A-28**. La possibilité de fonctionnaliser la surface de ce substrat (dans ce cas, oxydation et greffage cationique) est également un autre atout qui ont permis de mener des analyses environnementales (e.g. composés perfluorés et benzylés).

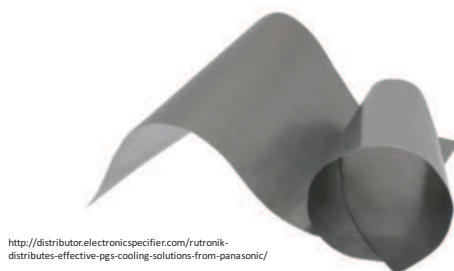


Figure A-28. Photographie d'un film PGS commercialisé par Panasonic.

Plus récemment, le graphène, un cristal bidimensionnel dont l'empilement constitue le graphite, a été expérimenté comme nouvelle surface LDI. Depuis qu'il a été isolé pour la première fois en 2004 par deux chercheurs, A. Geim et K. Novoselov, qui ont d'ailleurs reçu le prix Nobel de physique 2010 pour cette découverte, le graphène fait l'objet de nombreuses recherches liées à ses propriétés physiques exceptionnelles (électroniques, conductrices thermique et électrique, résistance, légèreté, imperméabilité aux gaz...). En 2010, plusieurs équipes se sont simultanément intéressées à l'utilisation du graphène en tant que support LDI pour diverses applications :

- (1) analyser des petites molécules polaires (acides amines, polyamines, médicaments anticancéreux, nucléosides et stéroïdes) et apolaires (cholestérol et squalène) [¹⁶⁶ Dong *et al.*, 2010].
- (2) successivement extraire, pré-concentrer et détecter des molécules d'ADN simple brin et une petite protéine (cytochrome C) en déterminant expérimentalement le support le plus favorable (graphène pour l'ADN et graphène oxydé (GO) pour le cytochrome C). Les résultats ont ensuite été justifiés par la nature des interactions influençant la capacité d'extraction du support (respectivement des interactions π - π et des interactions électrostatiques) [¹⁶⁷ Tang *et al.*, 2010].
- (3) détecter une dioxine portant 8 atomes de chlore (responsables de la stabilité des molécules) avec un film de graphène oxydé et réduit (RGO) pour limiter les imperfections du support en présentant un réseau composé de systèmes conjugués [¹⁶⁸ Zhou *et al.*, 2010].

Compte tenu de ces résultats, d'autres équipes ont cherché à associer le graphène à différents matériaux suivant deux approches différentes :

- soit pour améliorer les performances LDI du substrat, en réalisant des supports multicouches constitués de graphène oxydé et de MWNTs fonctionnalisés, comme présenté en **Figure A-29** [¹⁶⁹ Kim *et al.*, 2011; ¹⁷⁰ Kim *et al.*, 2012],
- soit pour ajouter une propriété magnétique par ajout de particules ferriques afin d'extraire plus facilement les petits substrats de graphène dispersés en solution lors de l'étape d'enrichissement [¹⁷¹ Shi *et al.*, 2012]. Ce concept d'ajouter un caractère magnétique à un substrat assistant la désorption/ionisation laser a été initialement développé par Chen et est discuté dans la partie suivante traitant des supports LDI basés sur le dioxyde de titane [¹⁷² Chen *et al.*, 2005].

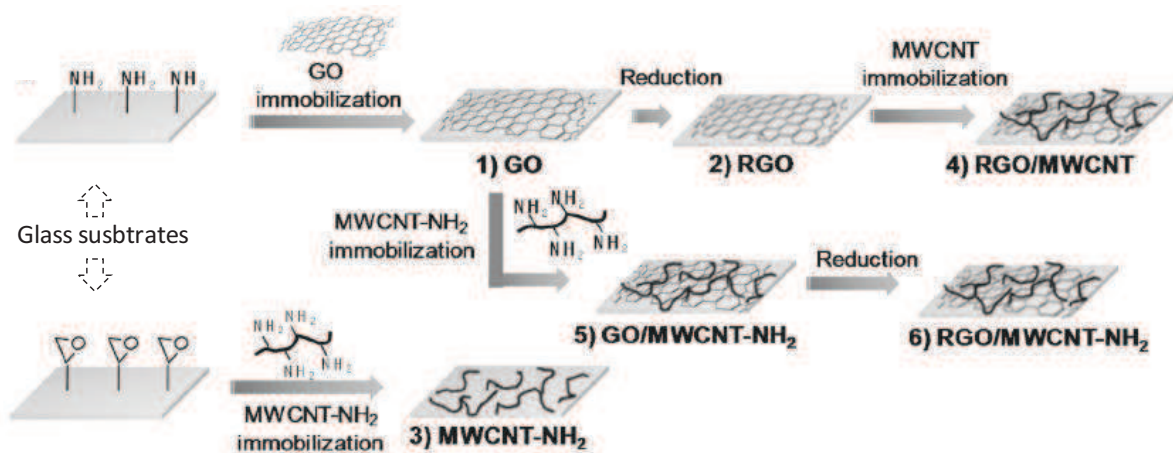


Figure A-29. Schéma de préparation de 6 substrats LDI testés (graphène, MWCNT et graphène/MWCNT) d'après [¹⁷⁰ Kim *et al.*, 2012].

D'autres structures de carbone amorphe ont également été au centre d'applications en LDI, notamment avec l'introduction d'un système innovant et original développé par Bonn en 2008 dans le but de servir simultanément de supports d'analyse LDI et de stockage de données [¹⁷³ Najam-ul-Haq *et al.*, 2008; ¹⁷⁴ Sage, 2008]. Pour cela, un substrat multicouche basé sur le format d'un DVD (Digital Versatile Disk) en polycarbonate, surmonté d'une fine surface de molybdène (30 nm) puis terminé par une couche mince de carbone amorphe (300 nm) a servi de support LDI à l'analyse de différentes petites molécules (peptides, lipides, sucres, métabolites...). Une illustration de ce substrat est présentée en **Figure A-30**. La surface supérieure carbonée forme la plateforme de dépôt. Elle est constituée d'un film de carbone nanostructuré présentant des propriétés similaires à celles du diamant (DLC pour Diamond Like Carbon) du fait de sa structuration qui présente 35 % de carbone hybridé sp^3 (les autres carbones étant dans un état d'hybridation sp^2). Le mécanisme LDI est alors facilité par la nanostructuration et les nombreux espaces vides présents dans le film de DLC qui induisent des propriétés optiques et électriques spécifiques, avec une absorption optimale dans la gamme de longueur d'onde de 305-330 nm. D'autres avantages de cette surface de carbone ont également été mentionnés, tels que sa résistance accrue dans le temps, ou la dispense de fonctionnalisation pour accéder à une large gamme de biomolécules aux caractéristiques différentes.

La couche de molybdène est introduite à la surface DLC pour sceller le DVD, soit le support du stockage, tout en facilitant la diffusion de l'énergie reçue par le laser dans la surface carbonée. Cependant, il faut garder à l'esprit qu'un tel support a nécessité un adaptateur pour être introduit dans la source du spectromètre de masse. Pour éviter cet inconvénient, un système plus classique utilisant un polymère déposé sur une cible MALDI et recouvert d'un film DLC a également été testé par un autre groupe [¹⁷⁵ Winkler *et al.*, 2010].

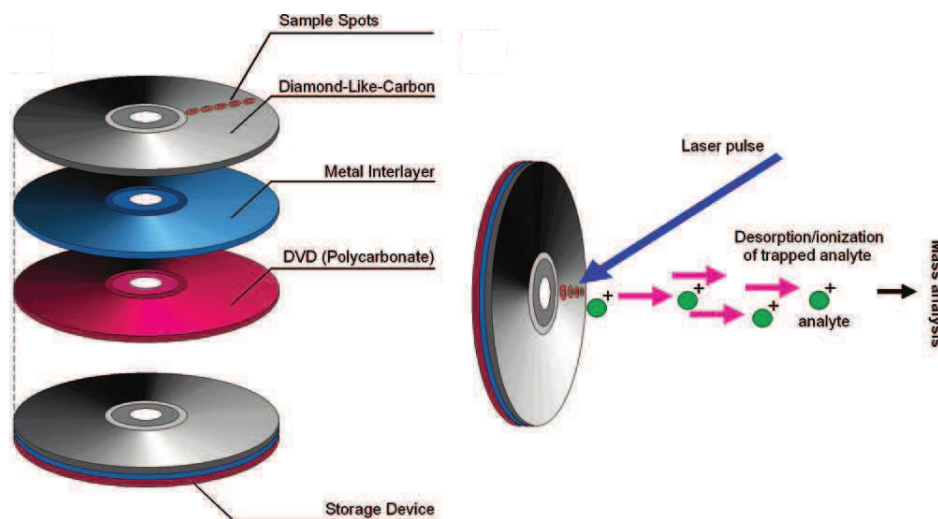


Figure A-30. Schéma du support multicouche terminé par la surface DLC d'après [¹⁷³ Najam-ul-Haq *et al.*, 2008].

Une autre approche utilisant le carbone amorphe a été introduite avec l'utilisation de poudre. Un groupe de recherche a employé en tant que substrat LDI du noir de carbone graphitisé, largement employé dans le cadre de séparations chromatographiques pour leur grande surface spécifique et leur fort potentiel d'absorption [¹⁷⁶ Shariatgorji *et al.*, 2008; ¹⁷⁷ Amini *et al.*, 2009]. Dans leurs études, des particules de noir de carbone, oxydées ou non, de taille inférieure à 38 μm ont servi de phase stationnaire en SPE puis ont été récupérées et directement déposées sur une cible MALDI. Elles ont ensuite été irradiées par le laser pour directement désorber/ioniser les composés piégés. Bien qu'une large gamme de molécules ait été détectée, les composés analysés ont plutôt présenté un caractère hydrophobe ce qui semble en cohérence avec les capacités du noir de carbone qui présente un caractère de même nature [¹⁷⁶ Shariatgorji *et al.*, 2008; ¹⁷⁷ Amini *et al.*, 2009]. Après avoir étudié l'analyse d'un composé modèle avec plusieurs matrices carbonées (charbon actif, carbone vitreux et nanopoudre de carbone), un second groupe a également opté pour l'utilisation de carbone amorphe sous forme d'une surface réalisée avec du charbon actif de dimension 100-400 mesh pour analyser des stéroïdes [¹⁷⁸ Guild *et al.*, 2010].

Plus récemment, la structuration diamant du carbone a elle aussi fait l'objet d'investigations au travers de l'application de nanofils de diamant dopés au bore, synthétisés par gravure sèche (RIE pour Reactive Ion Etching), comme supports LDI pour l'analyse de peptides [¹⁷⁹ Coffinier *et al.*, 2012].

Les résultats obtenus avec ces nanofils présentant des fonctionnalisations hydrophobes (OTS) ont donné matière à supposer que le mécanisme d'ionisation permettant d'accéder à la désorption/ionisation des molécules sur ce support était d'origine thermique. Ainsi, il a été envisagé que les nanofils de diamant dopés au bore absorbaient l'énergie du laser et la dissipent ensuite sous forme de recombinaisons non-radiatives menant à un confinement de la chaleur, ceci étant possible d'une part par la taille des nanofils, qui influent sur leur capacité de conductivité thermique, et d'autre part la couche de silicium oxydé servant de support aux nanofils de diamant, agissant comme un isolant thermique.

Comme il a été discuté dans cette partie, les supports à base de carbone ont abondamment été utilisés en tant que support LDI. A l'origine majoritairement manipulées sous forme de poudres, les matrices LDI carbonées ont peu à peu évoluées vers des supports figés. En effet, les supports carbonés particuliers peuvent être sublimés lors de la désorption laser, et conduire à une pollution du spectromètre de masse par la dispersion des CNTs dans le vide de la source [152 Ren *et al.*, 2005]. Pour éliminer cet inconvénient majeur, deux stratégies différentes ont été mises en pratique. D'un côté, les chercheurs voulant travailler avec des matériaux sous forme de poudres ont tenté d'augmenter l'adhérence du matériau inerte à la plaque MALDI pour réaliser des dépôts double-couches (matrice inerte - échantillon). D'un autre côté, des supports de type surface/film/plaque pour lesquels la matrice constitue elle-même le support ont été développés. Cependant, quelle que soit la nature structurale du support carboné, deux objectifs communs ont animé les études analytiques sur ces matériaux :

- Utiliser la capacité d'adsorption du carbone : dans de nombreuses recherches, il a été utilisé pour réaliser simultanément une extraction sur phase solide d'analytes solubilisés dans des milieux biologiques, puis une analyse LDI *in situ* en se servant du matériel carboné pour assister la désorption/ionisation.
- Analyser des petits composés hydrophobes : bien que d'autres analytes aient été testés, la grande majorité des publications mentionne l'efficacité de ces supports carbonés pour l'analyse de composés apolaires, dont un nombre conséquent appartient à la classe des lipides.

I.3.2.2.3. Les structures à base de dioxyde de titane

Parmi tous les supports LDI, le titane sous sa forme oxydée (TiO_2) a été amplement décrit comme support inerte LDI. Les cristaux de titane sous forme anatase et rutile, correspondent à des architectures de type tétragonale bipyramidale. Dans la nature, la forme rutile est la plus courante (98%). Cependant, dans la plupart des études de spectrométrie de masse, le choix du TiO_2 sous forme anatase a été gouverné par le fait que ce matériau possède des propriétés électroniques qui lui

confèrent une forte capacité d'absorption UV, paramètre ayant un rôle majeur dans le processus LDI. En effet, l'arrachement d'un électron d'une couche externe de la forme anatase nécessite une énergie minimale de 3,2 eV (band-gap) soit 384 nm, ce qui signifie que la lumière incidente émise dans le proche UV entraînera une absorption des photons par le TiO₂.

Si l'emploi de particules de TiO₂ en mélange dans des matrices liquides organiques a été testé dès les années 2000 [⁶² Kinumi *et al.*, 2000; ¹⁸⁰ Crecelius *et al.*, 2002], les premiers travaux basés sur l'utilisation unique d'un support de titane ont été à l'initiative de Chen. Dans la continuité des développements de matrices LDI utilisant des structures sol-gels de silice (**PARTIE A.I.3.2.1.2**), elle a exposé une méthode alternative basée sur des films de dioxyde de titane synthétisés par le procédé sol-gel [¹⁸¹ Chen *et al.*, 2004]. Avec ces polymères de titane, deux approches analytiques ont été mises au point :

- Analyse LDI par dépôt des molécules d'intérêt (*e.g.* bradykinine, insuline, cytochrome C) directement sur le film de TiO₂, en présence ou non de glycérol.
- Reconnaissance moléculaire puis analyse LDI in situ, en utilisant le film de TiO₂ comme support sélectif *via* des cavités préformées par une molécule modèle lors de la synthèse du matériau ("imprinted polymer"). Avec ce polymère, l' α -cyclodextrine (CD) a été sélectivement analysée à partir d'un échantillon liquide comprenant un mélange de α -CD, β -CD et γ -CD.

Cependant, cette méthodologie s'est trouvée limitée en gamme de masse exploitable et a mené à des spectres pollués dans les faibles gammes de masse, tout en nécessitant encore un ajout de glycérol pour parfaire la qualité des spectres. De fait, pour améliorer l'absorption UV de son support, Chen a alors converti par calcination le film de TiO₂ poreux en du TiO₂ cristallin présentant un réseau anatase mésoporeux [¹⁸² Chen *et al.*, 2004]. Dans ces travaux, l'addition d'une source de proton à travers un tampon citrate a également amélioré la détection en augmentant le signal des espèces protonées, tout en réduisant la formation d'espèces cationisées. Ce support a permis d'accéder à une gamme de masse plus étendue, avec aussi bien l'analyse de molécules de hautes masses (24 kDa pour le trypsinogène), que la détection de petits composés en raison du faible bruit de fond du spectre dans la zone des basses masses (*e.g.* digestats tryptiques du cytochrome C).

Une autre morphologie du dioxyde de titane, les nanoparticules (NPs), a également fait l'objet d'utilisations fréquentes dans les méthodologies LDI. Une première application indirecte de particules de TiO₂ en tant que support LDI a consisté en réalité, non pas à promouvoir l'analyse de petites molécules sans matrice organique, mais plutôt à tirer profit des propriétés photocatalytique du TiO₂. Pour illustration, en 2005, Gnaser *et al.* ont cherché à caractériser les réactions intermédiaires de la dégradation photocatalytique du bleu de méthylène sur un film constitué de particules de dioxyde de titane nanocristallin [⁹¹ Gnaser *et al.*, 2005]. Dans ces travaux, le TiO₂ jouait à

la fois le rôle de catalyseur de la réaction mais également de support LDI, puisque les espèces oxydées issues de la photocatalyse étaient directement analysées par désorption/ionisation laser ayant lieu en surface. Des travaux similaires exploitant les propriétés photocatalytiques du TiO_2 ont ensuite été publiés pour étudier la décomposition du nitrobenzène [¹⁸³ Cropek *et al.*, 2008] et de PEG [¹⁸⁴ Watanabe *et al.*, 2009].

Dans le cadre de méthodologies MALDI traditionnelles, il faut mentionner que depuis plusieurs années, les substrats particuliers de TiO_2 ont été amplement employés comme matériel d'extraction et d'enrichissement de molécules cibles, en particulier les phosphopeptides, sous les techniques de chromatographie d'affinité métallique. Effectivement, le TiO_2 présente une chimie de surface qui lui confère des propriétés de sélectivité. Le TiO_2 possède un caractère amphotère qui lui permet à pH acide d'interagir avec des groupements phosphate ou carboxylate *via* des liaisons électrostatiques (TiOH^{2+}) et un caractère complexant entre l'atome de titane (IV), qui se comporte comme un acide de Lewis, et les groupements PO_4^{3-} et COO^- qui sont des bases de Lewis. Très logiquement, ces substrats ont donc été testés pour développer de nouvelles méthodologies LDI permettant d'analyser sélectivement des petites molécules organiques. Dans ce contexte, des nanoparticules composites, associant un noyau métallique d'oxyde magnétique (Fe_3O_4) et une enveloppe de TiO_2 , ont été utilisées pour extraire et analyser en LDI des phosphopeptides à partir d'échantillons de digests tryptiques par Chen. Le protocole de l'analyse est décrit en **Figure A-31** dans un schéma extrait de la publication [¹⁷² Chen *et al.*, 2005].

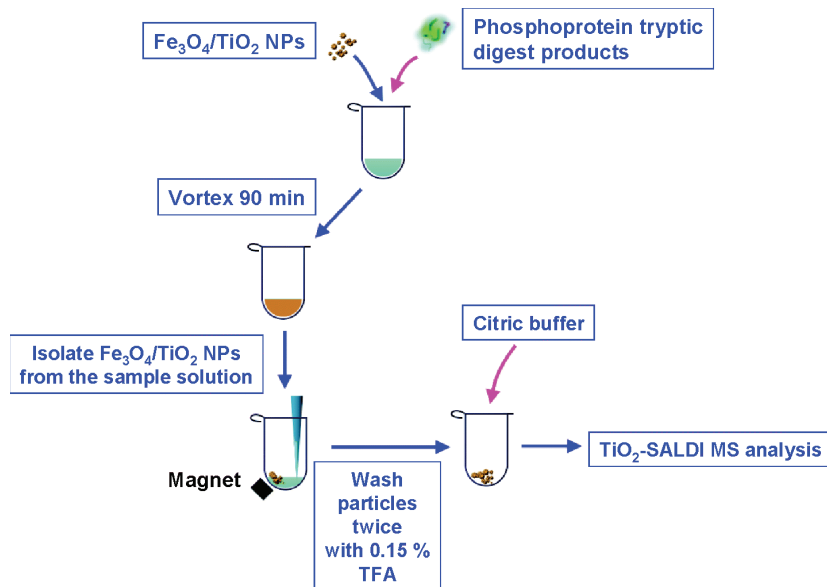


Figure A-31. Principe de l'analyse de phosphopeptides utilisant des NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ d'après [¹⁷² Chen *et al.*, 2005].

Dans cette étude, les particules $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ ont démontré des capacités de sélectivité vis-vis des phosphopeptides au contraire de particules de TiO_2 ou de particules composites de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$, la méthode présentant toutefois des seuils de détection inférieurs à ceux obtenus dans des méthodologies traditionnelles utilisant la chromatographie d'affinité métallique puis l'analyse MALDI.

Pour améliorer la sensibilité de l'analyse, l'ajout de matrice organique DHB sur le dépôt de NPs de TiO_2 a d'ailleurs été effectué dans certaines expériences.

Par la suite, des nanoparticules de TiO_2 anatase de 5 nm synthétisées par un procédé sol-gel ont servi de matériel pour l'extraction, la détection et la quantification en spectrométrie de masse LDI de petits composés organiques présents dans le thé (principalement des catéchines) [¹⁸⁵ Lee *et al.*, 2007]. Une des principales difficultés dans ce type de travaux consiste à trouver le bon compromis entre les concentrations de matrices inertes et d'analytes afin d'obtenir un rendement optimal. Dans ce cas, les auteurs ont indiqué que pour une concentration de 50 μM en catéchine, la concentration optimum de NPs était de 0.24 μM , soit un ratio d'environ 1/200. Une quantité supérieure de NPs entraînait une augmentation des signaux interférents dans les faibles masses et une quantité inférieure ne satisfaisait pas à une désorption/ionisation efficace. Il faut noter que pour ces applications en LDI, les nanoparticules de TiO_2 sont souvent utilisées sous leur forme naturelle cristalline anatase. Une équipe a d'ailleurs comparé les résultats obtenus pour l'analyse de petites molécules modèles (2-chloroaniline, quercétine, caféine et PEG 200) sur des NPs de TiO_2 de différentes formes (anatase, rutile, et un mélange anatase/rutile 70/30) [¹⁸⁶ Castro *et al.*, 2008]. Comme attendu, compte tenu de ses propriétés, notamment électroniques (band gap), la forme anatase a démontré dans cette étude des performances LDI supérieures aux autres formes étudiées. Cette conclusion a également été partagée par un autre groupe qui a étudié l'influence de la forme cristalline d'un film de titane sur l'efficacité de la détection de différents petits composés en LDI (*e.g.* acides aminés, oligopeptides, insuline) en utilisant la méthode de rendement de survie d'ion [¹⁸⁷ Kawasaki *et al.*, 2010]. Dans ces travaux, bien que le TiO_2 de forme rutile ait présenté une absorption UV supérieure aux formes anatase et amorphe étudiées, ce support n'a pas permis d'accéder à des analyses LDI satisfaisantes.

D'autres équipes ont ensuite fait le choix de fonctionnaliser le TiO_2 pour disposer de NPs sélectives. Ainsi, Chiu a par exemple développé sa stratégie d'enrichissement et d'analyse concomitantes de stéroïdes en utilisant des particules de TiO_2 (5 nm) préparées par sol-gel et fonctionnalisées [¹⁸⁸ Chiu, 2011]. En s'inspirant des résultats obtenus par Lee démontrant l'interaction entre les NPs de TiO_2 et les catéchines, il a fait interagir les deux composés pour former des NPs modifiées dont l'absorption à la longueur d'onde du laser utilisé (337 nm) était supérieure à celle de particules nues.

Une autre stratégie a consisté, en plus de la fonctionnalisation, à utiliser le potentiel de photocatalyse pour améliorer les performances LDI du TiO_2 en limitant notamment les problèmes d'interférences spectrales dans les basses masses. Pour cela, des surfaces inertes ont été organisées à partir de particules de TiO_2 amorphes (< 50 nm) fonctionnalisées [¹⁸⁹ Watanabe *et al.*, 2009]. La singularité de ce travail a consisté à utiliser les propriétés photocatalytiques du TiO_2 en irradiant par une lampe UV la surface de TiO_2 pour la nettoyer de ses polluants organiques. Cette approche s'est

aussi différenciée par le choix de la fonctionnalisation qui n'a pas été choisie pour présenter des affinités avec des analytes, mais pour diminuer les interactions possibles avec le tampon citrate utilisé comme adjuvant d'ionisation. En effet, il est logiquement indiqué par Watanabe que les groupements carboxylates des sels de citrate peuvent être complexés par le TiO_2 puis être ensuite désorbés/ionisés en LDI et ainsi saturer le spectre de masse. Pour limiter ces interférences, les auteurs ont sélectionné différents groupements organiques pour modifier les NPs de TiO_2 en surface au travers d'agents de silylation pour introduire des groupements éthoxy, amine, urée et phényle et ainsi empêcher ces interactions. Les meilleures performances LDI ont été obtenues avec les NPs modifiées avec des groupements urées qui ont permis non seulement de diminuer les signaux du tampon citrate, mais également de s'affranchir de sa présence pour désorber/ioniser efficacement les analytes. Les auteurs ont indiqué que dans ce système les groupements fonctionnels jouaient en fait le rôle d'adjuvant. Pour illustrer ce comportement, les spectres de l'angiotensine tirés de la publication de Watanabe, obtenus sur les différents supports concernés avec et sans tampon citrate sont présentés en **Figure A-32**.

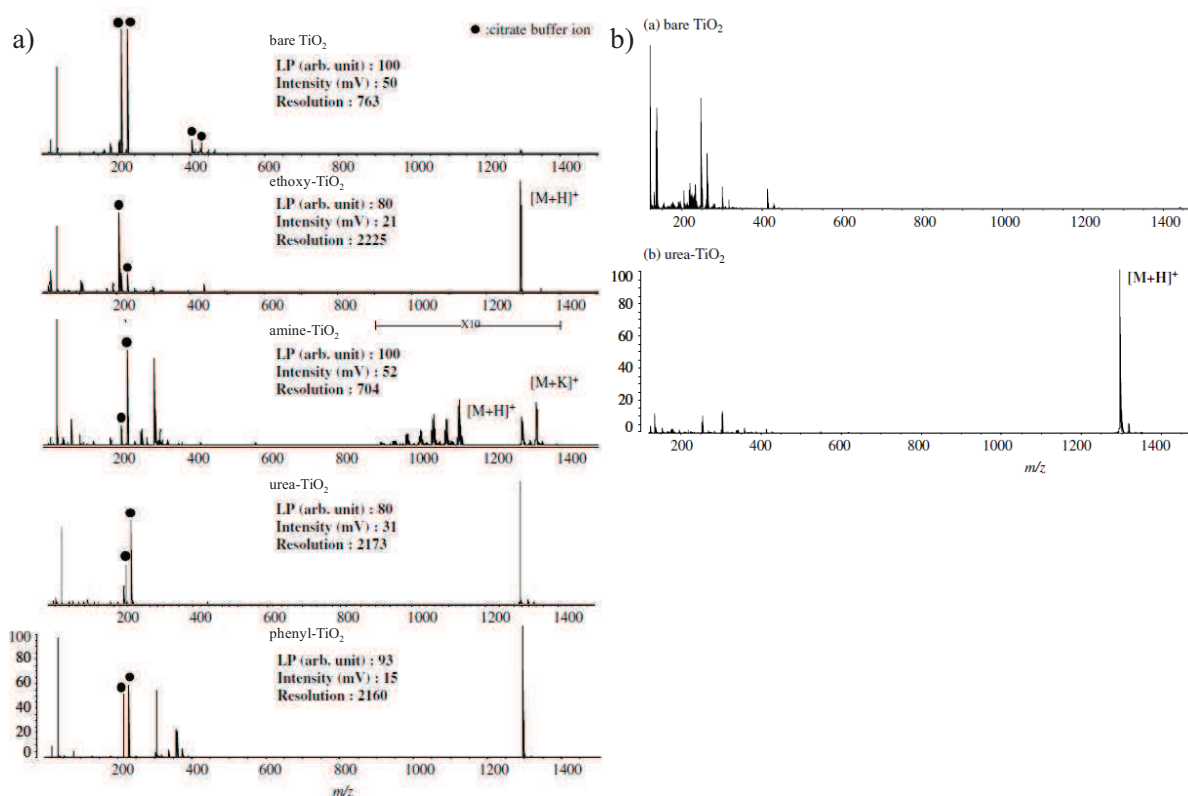


Figure A-32. Spectres de l'angiotensine obtenus avec des NPs de TiO_2 suivant différentes modifications a) avec ajout de tampon citrate et b) sans ajout de tampon citrate d'après [189 Watanabe et al., 2009].

Outre les particules de Fe_3O_4/TiO_2 discutées précédemment [172 Chen et al., 2005], un autre groupe a également utilisé des matériaux composites d'oxyde de titane/tungstène comme matrice inerte LDI. Initialement, le support a été développé sous la forme d'une structure mésoporeuse hexagonale à

deux dimensions très ordonnée de $\text{WO}_3\text{-TiO}_2$ [¹⁹⁰ Yuan *et al.*, 2005]. Dans cette étude, les auteurs ont démontré l'importance de la présence de pore dans la structuration de ce matériau, puisqu'une structure de $\text{WO}_3\text{-TiO}_2$ poreuse permettait d'obtenir des signaux cent fois plus intenses qu'une structure non poreuse. Ce résultat doit toutefois être considéré avec précaution puisque la comparaison n'a porté sur la détection que d'un seul peptide, la gramicidine. Le choix de la matrice inerte a ensuite évolué vers des structures mésoporeuses de WTiO présentant des nanopores de tailles plus faibles [¹⁹¹ Shan *et al.*, 2007]. Les caractéristiques physicochimiques de ces supports étant relativement similaires (surface spécifique $\sim 150 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, taille de pore $\sim 6\text{-}10 \text{ nm}$ et volume de pore $0,28\text{-}0,29 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$), c'est l'effet de la structuration du matériau (1D-"worm-like", 2D-hexagonal et 3D-cage) qui s'est révélée cruciale sur les performances LDI appréciées *via* l'analyse de petits peptides. Il a en effet été montré que les matrices constituées des structures multidimensionnelles ordonnées produisaient des signaux plus intenses que ceux obtenus avec la structure monodimensionnelle non-ordonnée. Les auteurs ont affirmé que la présence de pore était impliquée dans le mécanisme de désorption/ionisation des peptides étudiés dans ces travaux. Si l'organisation de la structure semble effectivement être un paramètre critique sur les performances LDI des supports inertes, il est cependant difficile de conclure quant à la morphologie du matériau et au rôle réel des pores tant il a été déjà discuté de matériaux poreux et non poreux pour lesquels les auteurs indiquaient avoir des résultats significatifs.

En 2009, confronté à la difficulté de régénérer les plaques en acier utilisées pour d'analyse LDI, un groupe a adopté une approche originale basée sur l'utilisation de supports jetables réalisés à partir de feuille d'aluminium et de nanoparticules de TiO_2 [¹⁹² Bi *et al.*, 2009]. Comme illustré dans la **Figure A-33** issue de la publication de Bi, ces supports ont été réalisés par sérigraphie ou par rotogravure de TiO_2 sur une feuille d'aluminium. Des zones de dépôts sous une forme pyramidale inversée ont ensuite été imprimées sur le support, puis les surfaces ont ensuite été passées dans un four afin d'obtenir du TiO_2 mésoporeux. Alors que la rotogravure a conduit à des couches de TiO_2 partielles présentant des microsillons, la sérigraphie a ensuite été préférée car couvrant totalement la surface du spot, elle a présenté des zones de dépôts de TiO_2 plus hydrophobes. En restreignant la zone de dépôt des échantillons aqueux, il a alors été possible de déposer un volume plus important et de maximiser les performances de détection, ces dernières étant appréciées au travers de l'analyse de l'angiotensine. Du fait du potentiel d'extraction du TiO_2 pour les phosphopeptides, des analyses d'enrichissements *in situ* ont également pu être menées directement sur la plaque à partir de digestats tryptiques de la β -caséine de l'ordre de la centaine de femtomole.

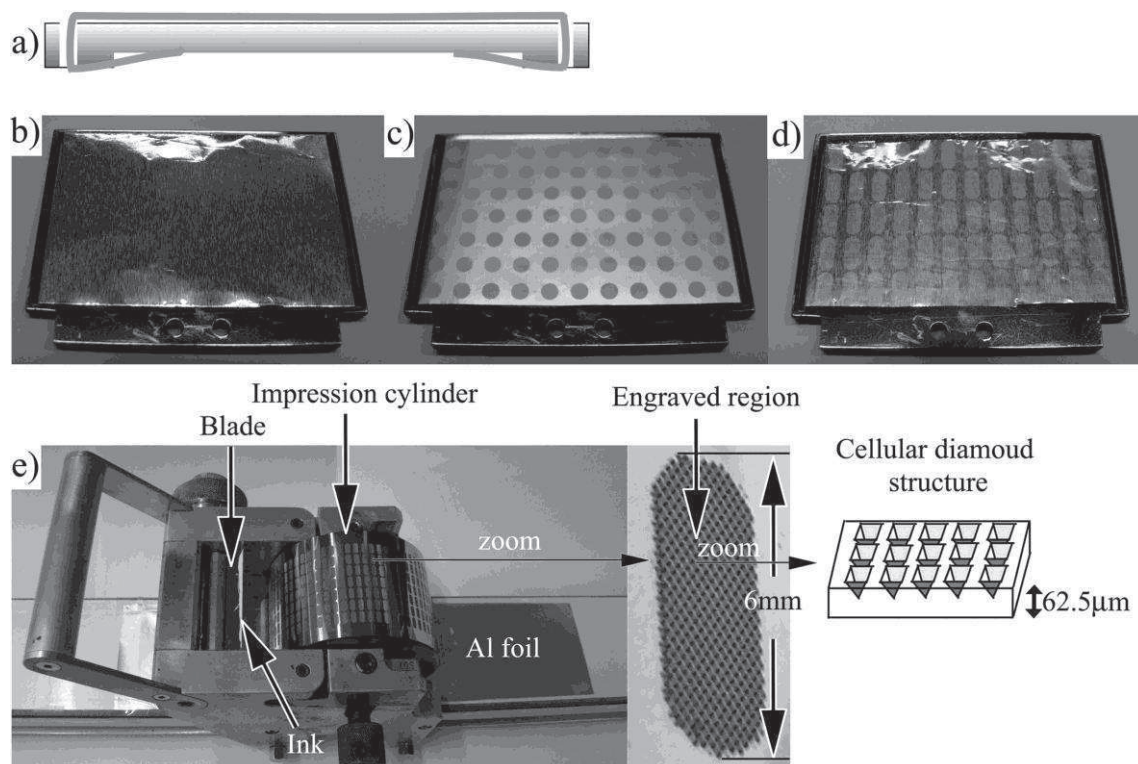


Figure A-33. D'après [192 Bi et al., 2009], a) Schéma de coupe de la plaque modifiée recevant la feuille d'aluminium. Photo de la plaque modifiée b) avec la feuille d'aluminium, c) avec le TiO₂ déposé par sérigraphie sur la feuille d'Aluminium d) avec le TiO₂ déposé par rotogravure sur la feuille d'aluminium. e) Processus de la rotogravure : image de l'appareillage, zoom sur les régions gravées définissant la forme de l'impression et schéma des structures des régions gravées.

Dans le but similaire de disposer d'une surface prête à l'emploi, Sonderegger *et al.* ont déposé une fine couche de TiO₂ (50 nm) non poreuse sur une plaque MALDI traditionnelle par la technique de l'évaporation par faisceau d'électron (Electron Beam Evaporation) [193 Sonderegger *et al.*, 2011]. Cette approche a été utilisée pour analyser un PEG 200, des acides aminés de caractères différents, des sucres et des extraits de feuilles d'artichauts contenant notamment des flavonoïdes, avec peu d'interférences dans les basses masses du spectre, principalement assignées à des composés d'oxydes de titane. A la différence de la technique précédente, les auteurs ont précisé que leur surface était réutilisable plusieurs fois, sans pour autant spécifier de procédure de lavage et/ou de reconditionnement.

En plus des supports élaborés à partir de NPs, deux autres groupes se sont intéressés à l'utilisation de nanotubes de titane (NTs) qui présentent typiquement une morphologie tubulaire et multicouche s'enroulant en spirale. Ce substrat structuré, qui présente l'avantage d'être directement conçu sous l'aspect d'une surface présentant un alignement régulier des NTs de TiO₂, tend de plus en plus à être utilisé dans des applications diverses (batteries au lithium, photocatalyse, cellules photovoltaïques...).

Dès 2008, l'équipe de Lo a envisagé une stratégie basée sur les NTs de TiO₂ anatase préparés par anodisation d'une feuille de titane et cuisson au four [¹⁹⁴ Lo *et al.*, 2008]. Tout en permettant d'avoir un support présentant une sélectivité vis-à-vis des phosphopeptides, ce substrat présente l'avantage de désorber un nombre réduit d'espèces chargées de type Ti_xO_y (seulement Ti⁺, TiO⁺ dans ce cas) pouvant être observées sur les spectres de masse réalisés dans d'autres travaux basés sur l'utilisation d'un matériau en titane.

Pour valider la méthodologie de détection LDI, outre l'absence d'interférence dans les basses masses du spectre, les performances LDI ont été comparées à celles obtenues par d'autres méthodes sur deux critères : la limite de détection de la bradykinine et la plus haute masse analysable en étudiant 4 protéines : l'anhydrase carbonique (29 kDa), le trypsinogène (24 kDa), le cytochrome C (12,3 kDa) et l'insuline (5,7 kDa). En présence de tampon citrate comme adjuvant d'ionisation, les résultats obtenus sur l'analyse de la bradykinine avec cette technique (6 fmol) ont été comparables en sensibilité à ceux acquis sur d'une part un film de TiO₂ synthétisé par sol-gel (7 fmol) [¹⁸² Chen *et al.*, 2004], et d'autre part, un substrat de silicium poreux (2 fmol) [¹⁹⁵ Northen *et al.*, 2007]. En revanche, l'analyse de l'anhydrase carbonique n'a été possible qu'avec les NTs de TiO₂ (les trois autres protéines sont détectées avec le film de TiO₂ tandis que la surface de silicium poreux ne permet d'accéder qu'à la détection de l'insuline). L'affinité envers les phosphopeptides a été démontrée à travers l'analyse d'un échantillon de digestat tryptique de la β-caséine. Il faut mentionner qu'en pratique, la feuille exhibant les NTs de TiO₂ a été scotchée à une plaque MALDI traditionnelle. De plus, des cerclages de SiO₂ ont été effectués sur le substrat de titane pour contenir les gouttes d'échantillons déposées à l'intérieur de zones définies. Dans l'objectif d'améliorer les performances LDI, la seconde équipe a utilisé des NTs de TiO₂ anatase fonctionnalisés à l'OTS, ce qui a eu pour effet de rendre la surface très hydrophobe, et donc de s'affranchir de l'utilisation des anneaux de SiO₂ [¹⁹⁶ Piret *et al.*, 2012]. Pour obtenir des performances optimales, l'équipe a étudié l'influence de différents protocoles d'anodisation modifiant la structure (anatase ou amorphe) et les dimensions des NTs de TiO₂ sur l'analyse de petits peptides. Au final, des NTs de TiO₂ anatase de 100 nm de diamètre pour 500 nm de longueur ont permis d'obtenir les meilleurs résultats, même si les auteurs ont estimé que la dépendance du phénomène LDI vis-à-vis de la longueur des NTs n'était pas évidente à percevoir, au contraire de leur morphologie directement induite par les conditions électrochimiques choisies.

I.3.2.2.1. Les structures à base d'autres éléments métalliques ou métalloïdes

Au travers de la bibliographie, d'autres oxydes métalliques ont également été étudiés pour accéder à la désorption/ionisation laser de petites molécules. A ce titre, l'alumine poreuse fait parti des matériaux expérimentés dans les développements de supports LDI. Pour cela, Okuno *et al.* ont d'abord étudié les conditions nécessaires d'une surface de silicium et d'une surface d'acier pour

promouvoir la désorption/ionisation avec la plus faible intensité laser [¹⁹⁷ Okuno *et al.*, 2005]. De ces résultats expérimentaux, ils ont conclu que l'orientation des structures vis-à-vis de l'angle de l'irradiation laser était corrélée, et que la taille submicrométrique des structures était un facteur clé. Dans l'objectif de trouver une méthode alternative, ils ont alors développé des substrats d'alumine poreuse préparés par anodisation d'une feuille d'aluminium. Cependant, la structure poreuse d'alumine seule nécessitant une puissance laser élevée pour analyser les composés testés (polymères, réserpine et angiotensine), l'ajout d'une couche métallique d'or ou de platine (50 nm) a été nécessaire pour modifier la conductivité électrique et accéder à une désorption/ionisation efficace. Dans un second temps, l'équipe a étendu ses recherches à l'optimisation des structures d'alumine poreuse en ajustant les paramètres d'anodisation [¹⁹⁸ Wada *et al.*, 2007]. Différentes géométries de la structure d'alumine, incluant la densité et le diamètre des pores, ainsi que l'influence de la nature de la surface métallique (Ta, Au, Pt, Pd) ont été étudiés. Finalement, c'est la fusion du métal en surface sous l'impact du laser qui a été supposée être impliquée dans la génération des ions, tandis que l'alumine a semblé agir comme un isolant thermique. Le substrat double-couche basé sur l'association d'alumine et de platine présentant des rangées de pores a permis d'accéder à la désorption/ionisation de petites molécules et de protéines de masses allant jusqu'à 20 kDa. L'utilisation de l'alumine poreuse a ensuite été reprise par le groupe de Knapp qui a examiné l'effet de la taille des substrats inertes sur la désorption/ionisation laser de peptides pour aboutir à un support optimal d'alumine poreuse de 600 nm d'épaisseur comprenant des pores de 100 nm de profondeur et superposé d'une couche d'or de 90 nm [¹⁹⁹ Nayak *et al.*, 2007]. Dans un second temps, cette technique a même été appliquée par le groupe pour réaliser une détection combinée en Désorption Ionisation par Electrospray (DESI pour Desorption Ionization Electrospray) et en LDI sur le support nanoporeux d'alumine [²⁰⁰ Nayak *et al.*, 2008].

Outre les oxydes de titane et d'aluminium, d'autres substrats métalliques ont suscité un fort intérêt dans les développements de techniques LDI alternatives ne reposant que sur l'utilisation d'un substrat inerte. Ces approches se révèlent être plus récentes que celles déjà discutées et nous disposons de moins de recul vis-à-vis de ces méthodologies. De fait, au contraire des autres supports employés dans les stratégies discutées précédemment, ces matériaux n'ont pas fait partie des investigations menées ni dans le cadre de la thèse précédente, ni dans le cadre de cette thèse. Cependant, il a quand même été choisi de présenter brièvement dans cette introduction certaines méthodes afin de disposer d'une vue d'ensemble des méthodologies publiées. Parmi ces structures, deux métaux à savoir l'or et l'argent, ont plus particulièrement été employés comme substrats inertes pour extraire des composés de milieux biologiques puis promouvoir la désorption/ionisation. Si les deux substrats ont été employés sous la forme de suspensions colloïdales de nanoparticules, l'or a aussi été utilisé sous forme de surfaces.

Les nanoparticules d'or sont impliquées dans de nombreuses méthodologies analytiques en raison des spécificités de leurs propriétés :

- physiques : elles disposent de propriétés électroniques intermédiaires entre celles d'un atome ou d'une petite molécule, et celles du métal massif,
- chimiques : elles possèdent une réactivité chimique qui se traduit par une activité en catalyse *via* leur sites de coordination, et une sélectivité importante vis-à-vis des composés soufrés et aminés qui permettent de fonctionnaliser les particules par d'adsorption,
- optiques : elles sont soumises à un phénomène de résonance lorsqu'elles sont soumises à un champ électromagnétique dont la longueur d'onde est beaucoup plus grande que la taille des particules.

En se basant sur ces propriétés, Russell et son équipe furent les premiers à développer une approche basée sur l'utilisation unique de nanoparticules d'or (AuNPs) pour assister la désorption/ionisation en 2005 [²⁰¹ McLean *et al.*, 2005]. Dans cette étude, des nanoparticules d'or (AuNPs) de 2, 5 et 10 nm ont été employées comme matrice pour détecter des peptides en modes positif et négatif. L'exemple de la substance P est présenté en **Figure A-34**. Pour valider la méthodologie, différents échantillons peptidiques ont été étudiés, parmi lesquels des phosphopeptides. Dans cette catégorie, les nanoparticules ont démontré une ionisation préférentielle des peptides contenant des phosphotyrosines au détriment de ceux contenant des phosphosérines ou des phosphothréonines, ce qui illustre la sélectivité de ce support.

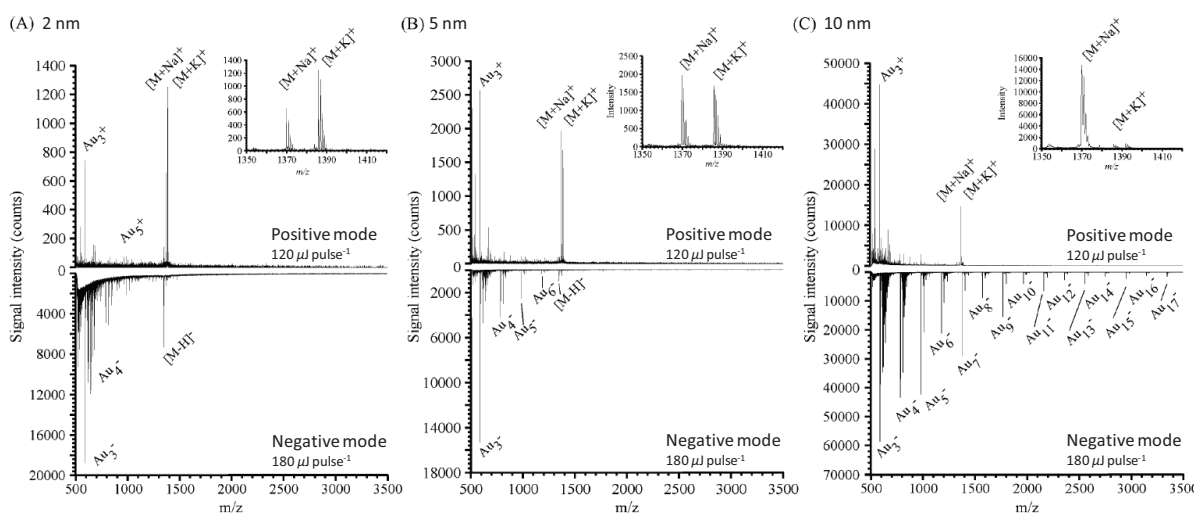


Figure A-34. Spectres de masses LDI-MS de la substance P obtenus avec la matrice AuNPs d'après [²⁰¹ McLean *et al.*, 2005].

Suite à ces travaux, Huang et Chang ont repris l'utilisation de nanoparticules d'or (AuNPs) présentant des molécules de colorant "rouge du Nile" (NR pour Nile-Red) adsorbées à leurs surfaces [²⁰² Huang *et al.*, 2006]. Ces particules NR-AuNPs sont généralement utilisées dans le cadre d'analyses de composés contenant des thiols *via* des études de fluorescence. Lorsque les thiols s'adsorbent à la surface des nanoparticules, des molécules de NR sont libérées et entraînent une augmentation

importante de la fluorescence qui peut être mesurée. Dans cette étude, les auteurs ont utilisé la spectrométrie de masse comme une méthode complémentaire à ces mesures de fluorescence en utilisant les NR-AuNPs pour extraire et analyser des composés aminosulfurés (glutathion, cystéine et homocystéine). Ils ont ensuite appliqué la méthodologie à l'analyse du glutathion dans les globules rouges et la cystéine dans le plasma. Par la suite, plusieurs études ont repris la stratégie d'extraction sélective et d'analyse successive, en utilisant des AuNPs souvent fonctionnalisées justement par l'intermédiaire de thiols. Certaines méthodes sont citées dans le **Table A-3**.

Systèmes AuNPs/fonctionnalisation	Applications	Référence
NR-AuNPs (14 nm)	Analyse de composés aminosulfurés (glutathion, cystéine et homocystéine) puis application à la détection du glutathion dans les globules rouges et la cystéine dans le plasma.	[²⁰² Huang <i>et al.</i> , 2006]
AuNPs (3,5 et 14 nm)		[²⁰³ Chiang <i>et al.</i> , 2009]
AuNPs (13 nm) Apt-AuNPs = Aptamères	Analyse du glutathion et de l'adénosine triphosphate (ATP) dans des extraits de cultures cellulaires	[²⁰⁴ Huang <i>et al.</i> , 2007]
AuNPs (12 nm) Citrate-AuNPs (13 nm) DDAB-AuNPs (bromure de didodecyltriméthylammonium (14 nm) Glucose-AuNPs (9 nm)	Analyse de glucides neutres de petites masses (ribose, glucose, cellobiose et maltose), application au dosage de glucose dans l'urine	[²⁰⁵ Su <i>et al.</i> , 2007]
AuNPs (12 nm)	Analyse d'oligosaccharides cycliques en déposant l'échantillon en premier puis les nanoparticules ("sample first method")	[¹³⁵ Wu <i>et al.</i> , 2007]
4-MBA-monolayer-AuNPs (monocouche d'acide 4-mercaptobenzoïque)	Observation de l'augmentation du signal avec la fonctionnalisation au MBA dans l'analyse de peptides (C-telopeptide et angiotensine)	[²⁰⁶ Castellana <i>et al.</i> , 2008]
β-cyclodextrine-AuNPs	Extraction et détection de peptides (C-telopeptide et bradykinine) dans des milieux contenant des fortes concentrations en sels	
AuNPs (2, 5 et 10 nm) Thiols-AuNPs	Etude de l'influence sur l'ionisation de peptides en présence d'espèces anioniques halogénés (ne changent pas ou diminuent le signal) et oxyanions (augmentent le signal)	[²⁰⁷ Stumpo <i>et al.</i> , 2009]
AuNPs (13 nm)	Détection de petites molécules (peptides, glucides, médicaments...) dans des milieux contenant des fortes concentrations en sels	[²⁰⁸ Wu <i>et al.</i> , 2009]
DDTC-AuNPs (dopamine dithiocarbamate)	Quantification de petites molécules d'acides aminés, de peptides et de médicaments	[²⁰⁹ Kailasa <i>et al.</i> , 2012]

Table A-3. Récapitulatif des méthodes utilisant les nanoparticules d'or fonctionnalisées pour successivement extraire et analyser des composés organiques.

Mis à part les suspensions colloïdales, d'autres approches mettant en œuvre des surfaces ont également été développées à partir de l'or. Dans ce cadre, deux équipes ont impliqué des substrats d'or dans un contexte de films, composés de multicouches auto-assemblées, préparés par la technique LBL (Layer-by-Layer). Cette méthode consiste à produire un film mince formé par dépôt de couches alternées de matériaux de charges opposées. Dans les premiers travaux, sur un substrat de silicium, des couches de nanoparticules d'or stabilisées au citrate ont été associées avec des couches de poly(chlorhydrate d'allylamine) (AuNPs/PAHC) [²¹⁰ Kawasaki *et al.*, 2008]. Cette stratégie a ensuite été reprise par un autre groupe qui a alterné un substrat d'or avec un film de silicate calciné [²¹¹ Duan *et al.*, 2010]. Ce type d'approche permet de combiner des propriétés utiles à la désorption/ionisation en un seul substrat. Par exemple, les auteurs du second système ont indiqué que l'or jouait un rôle dans l'absorption d'énergie du laser, tandis que le film de silicate permettait le confinement de la chaleur, ce qui impliquait un mécanisme de désorption thermique à la surface de ce substrat. Outre les capacités brutes des matériaux utilisés dans ces matrices LDI, une des principales difficultés consiste tout de même à trouver le bon ratio entre les deux couches (couche_{1x}/couche_{2y}) pour obtenir une analyse en spectrométrie de masse LDI la plus performante possible. Récemment, des surfaces d'or plus architecturées ont également été adaptées comme matrices LDI pour analyser des biomolécules. Par exemple, des films d'or nanostructurés par des procédés électrochimiques et fonctionnalisés par des couches monomoléculaires auto-assemblées (SAM) hydrophobes (terminaison méthyl) ou hydrophiles (terminaison carboxy) ont été utilisés par Nayak et Knapp pour analyser des peptides commerciaux et des digestats tryptiques [²¹² Nayak *et al.*, 2010]. Des films nanoporeux de différentes morphologies ont été ensuite employés par un autre groupe pour analyser une série de petits composés sur une gamme de masse de 150 à 3 500 Da (*e.g.* acides aminés, peptides, polyéthylène glycol) [²¹³ Liu *et al.*, 2011]. Pour ces films, des modifications organiques ont également été introduites pour augmenter le rendement d'ionisation (avec les réactifs aminobenzène-thiol et acide 3-mercaptopropanoïque). Au final, une fonctionnalisation par des cystéines a permis d'obtenir les spectres présentant le moins d'interférences et les signaux les plus intenses.

Comme mentionné antérieurement, l'argent, essentiellement sous forme de nanoparticules (AgNPs), a également été employé dans des stratégies d'extraction et d'analyse consécutives par différents groupes. Sous l'effet d'agents stabilisant chargés négativement, les AgNPs peuvent exhiber des charges négatives en surface. Elles peuvent interagir avec des composés chargés positivement par des interactions électrostatiques et il est donc possible de capturer des molécules cibles. Dans un second temps, dans la source LDI, les AgNPs reçoivent l'énergie du laser qui induit la dissociation des AgNPs et des molécules agrégées. Ces dernières peuvent alors être détectées en spectrométrie de masse. Cette approche est relativement récente puisqu'un premier groupe a entrepris d'utiliser des

AgNPs de 160 nm en 2007 pour détecter sélectivement des peptides commerciaux (bradykinine et angiotensine) dans des milieux chargés en sels et des peptides issus de digestats de protéines en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) [²¹⁴ Hua *et al.*, 2007]. Ces échantillons sont parfois difficilement analysables avec des stratégies MALDI traditionnelles car le SDS détériore le signal. Avec les nanoparticules d'argent, les auteurs ont conclu à la limitation de cet effet en s'affranchissant des ions issus du surfactant, ceci permettant d'obtenir un spectre plus clair et une ionisation des peptides plus efficace. Dans ces approches d'extraction sélective, il faut préciser que certains facteurs peuvent être déterminants sur l'efficacité de la méthode, en particulier le pH. En effet, selon la fonctionnalisation adoptée, le pH va conduire à la présence d'espèces chargées négativement ou positivement afin d'établir des interactions sélectives entre les nanoparticules et les composés cibles. La stratégie extraction/analyse avec un unique matériau a aussi été déclinée par plusieurs groupes de recherches pour l'analyse sélective d'oléfines [²⁰⁶ Castellana *et al.*, 2008; ²¹⁵ Sherrod *et al.*, 2008], d'œstrogènes [²¹⁶ Chiu *et al.*, 2008], ou encore de composés sulfurés [²¹⁷ Shrivastava *et al.*, 2008]. Un groupe a également synthétisé des nanoparticules composites d'or recouvertes d'argent (Au@AgNPs) pour analyser des aminoglycosides dans des échantillons de plasma [²¹⁸ Wang *et al.*, 2009]. Une autre approche a consisté à combiner la méthodologie DIOS avec l'utilisation de nanoparticules d'argent par procédé "electroless plating" [²¹⁹ Yan *et al.*, 2009]. Dans cette méthode de dépôt, les ions Ag⁺ en solution sont en fait réduits par les espèces hydrosiliconées pour former des particules neutres d'argent de 20 à 60 nm dans le réseau (pores et surface) du silicium poreux. Pour augmenter l'efficacité d'ionisation de polymères synthétiques et de petits peptides étudiés, la modification de ces nanoparticules avec des couches monomoléculaires auto-assemblées (SAM) d'adénosine triphosphate (4-ATP/AgNPs) a également été essayée.

Plus récemment, d'autres éléments métalliques ont été employés comme matrices LDI pour assister la désorption/ionisation de petites molécules. Parmi les méthodologies publiées, quelques exemples sont présentés dans la **Table A-4** ci-dessous.

Matrice LDI	Dimensions	Applications	Référence
Nanofleurs de platine (fines projections sur une surface de platine)	10-40 nm	Analyse de biomolécules (peptides et phospholipides)	[²²⁰ Kawasaki <i>et al.</i> , 2007; ²²¹ Kawasaki <i>et al.</i> , 2010]
Film de platine	d'épaisseur		
Nanoparticules d'oxydes ferriques modifiées par des groupements hydroxyles et amines	3,7 nm de diamètre	Analyse de lipides et de peptides par imagerie en spectrométrie de masse [nano-PALDI pour nanoParticle-Assisted LDI]	[²²² Taira <i>et al.</i> , 2008]

Nanoplots de germanium (GeND pour Germanium Nanodots) développés sur un substrat de silicium cristallin	150-200 nm de large par 50 nm de hauteur	Analyse de peptides (e.g. angiotensine et insuline) et de polymères [223 Seino et al., 2007]
Nanoparticules d'oxyde de Zn avec des formes variées (cubes et/ou parallélépipèdes)	20-200 nm	Analyse de petits composés organiques (e.g. vérapamil, testostérone) et de polymères synthétiques (polyéthylène glycol, polystyrène et polyméthyl-méthacrylate) [224 Watanabe et al., 2008]
Fine couche de cobalt recouvrant un substrat de silicium	60-70 nm d'épaisseur	Analyse de petites molécules (acides aminés et peptides) [225 Yalcin et al., 2009]
Nanoparticules d'oxyde de manganèse (MnO ₂ et Mn ₂ O ₃) fonctionnalisées par des groupements OH et NH ₂	5,6 nm de diamètre	Analyse de peptides, de médicaments et de protéines (< 5 000 Da) [nano-PALDI] [226 Taira et al., 2009]

Table A-4. Présentation de quelques méthodes LDI récemment développées basées sur l'utilisation d'éléments métalliques et métalloïdes.

Il est à noter que le germanium avait déjà été utilisé dans la conception de cibles commerciales développées par la société NanoHorizons, Inc. et commercialisées en collaboration avec une filiale de Shimadzu, Corporation [227 NanoHorizons, 2005]. Ces cibles, appelées Quickmass™ Target, étaient composées d'une couche de germanium non-poreuse nanométrique produite par dépôt physique en phase vapeur (PVD pour Physical Vapor Deposition). Etant uniquement utilisables sur les spectromètres de masse MALDI proposés par Shimadzu, peu de résultats ont été publiés dans la bibliographie à partir d'analyses LDI réalisées avec ce support. De plus, en 2010, une étude comparative des cibles Quickmass™ et DIOS™ menée par Law a révélée que le substrat de silicium présentait une efficacité supérieure dans les performances LDI, due à sa porosité et à sa fonctionnalisation perfluorée [228 Law, 2010]. Les propos ont cependant été nuancés par le fait que le support de germanium présentait l'avantage d'être moins sensibles aux interférences dues aux oxydations de surface en proposant un mécanisme d'auto-nettoyage, les oxydes de germanium étant dissous par la présence d'eau.

1.3.3. Conclusion sur les nouvelles stratégies douces LDI

Au cours de cette introduction bibliographique, il a été résumé une grande partie des très nombreuses techniques LDI développées ces vingt dernières années en tant que méthodes d'ionisation douces alternatives à l'ionisation MALDI. Pour essayer de satisfaire à une discussion constructive et surtout compréhensible, il a été tenté de présenter de façon concise et précise les

travaux les plus marquants et les plus pertinents, en choisissant d'effectuer une restitution chronologique des faits, tout en regroupant les méthodologies proposées selon la nature des différents matériaux utilisés. La revue de ces techniques LDI assistées par des matériaux inertes a révélé les difficultés rencontrées lors la rédaction de cette partie de part le nombre de travaux publiés dans cette thématique et les nombreux substrats différents utilisés en tant que matrice inerte pour promouvoir la désorption/ionisation de petites molécules et biomolécules.

Bien qu'il soit possible d'apprécier la pertinence de certaines stratégies, il est cependant évident à ce stade qu'il est très difficile de juger de la réelle performance de toutes ces méthodes tant les axes d'études sont nombreux et variés. En effet, la majorité des travaux présente une appréciation des performances des méthodes décrites basée sur les limites de détection atteintes pour un groupe d'analyte généralement bien choisi. Cependant, il est souvent impossible de rationaliser les résultats obtenus tant les échantillons utilisés comme références sont nombreux. On peut d'ailleurs reprocher à certains articles de ne faire mention que d'un nombre très restreint de molécules cibles pour apprécier les performances analytiques d'une matrice inerte dans une stratégie LDI. Il est donc logique de se demander si de telles méthodes seraient efficaces pour d'autres composés, ou si elles ont connu un développement limité et que seules les molécules ayant été détectées à des seuils de concentration satisfaisant font l'objet de la discussion. De plus, les résultats obtenus dans ces thématiques ne sont pas systématiquement comparés à des résultats obtenus *via* des analyses MALDI qui selon nous, constitue la technique de référence à laquelle il faut toujours se rapporter. Il est effectivement possible de comparer une nouvelle stratégie LDI à une déjà publiée, encore faut-il que cette dernière ait également réellement été appréciée en détail. En effet, comme il a été présenté, peu de matrices inertes ont fait l'objet jusqu'à présent d'investigations très poussées permettant de juger de réelles capacités en tant qu'agent efficace assistant le processus LDI. Dans ce contexte, quelques études mécanistiques visant à estimer l'énergie interne des ions ont été menées principalement sur les matrices siliciques nanostructurées, notamment par les groupes de Vertes et Alimpiev. Cependant, ces études ne peuvent être généralisées à l'ensemble des méthodologies LDI encore une fois en raison de la diversité des supports utilisés. Il est probable que certains processus soient communs à toutes ces méthodes quelques soient les matrices employées, telles que les processus thermiques, mais il est très difficile de juger la contribution des différents facteurs sur le mécanisme LDI. Ainsi, tout comme en MALDI où les processus régissant la désorption/ionisation laser font encore l'objet d'investigations, il reste difficile de comprendre finement les phénomènes se déroulant lors de la désorption/ionisation de ces méthodes alternatives. Pour une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu et pour pouvoir améliorer les méthodes LDI alternatives développées, des travaux doivent donc être menées dans cette direction.

De plus, une autre difficulté provient du fait qu'il n'existe pas réellement de qualifications ou de normes publiées permettant à une technique de désorption/ionisation laser assistée par une matrice inerte d'être qualifiée de méthode d'ionisation douce. Nous avons pu voir que les méthodologies SALDI, SEND, et SELDI entraînent dans la nomenclature définie par l'IUPAC. Cependant, les définitions données restent peu précises et ces acronymes sont applicables à des travaux assez différents les uns des autres. Il a également été démontré dans cette introduction que de très nombreux autres sigles étaient utilisés, rendant la tâche de classement encore plus compliquée. De plus, aucune proposition n'a été faite pour généraliser les méthodes LDI et définir efficacement les qualifications requises pour une méthode LDI douce. Si des tentatives de définition de critères ont été approchées, notamment par Law pour définir les points clefs permettant de dénommer une technique SALDI, il n'existe pas de standardisation permettant d'apprécier réellement les capacités d'une méthode. On peut donc regretter l'absence de telles normes, car elles permettraient non seulement d'estimer réellement le potentiel d'une méthode mais également de comparer les performances des méthodes entre elles, donc de les classer. Il serait par exemple possible d'imaginer, à la manière des approches de validation de méthodes, une procédure détaillant une liste de molécules à analyser seules et en mélange, pour lesquelles des valeurs seuils devraient être obtenues sur différents critères tels que la limite de détection, la résolution du signal, ou les déviations standards dans des études de répétabilité.

En somme, il reste compliqué de discerner une méthode qui est réellement une technique d'ionisation LDI douce comparable en termes de rendement d'ionisation à la technique MALDI d'une énième tentative de développements méthodologiques qui n'aboutira pas à des poursuites d'investigation par manque de réel potentiel.

CHAPITRE II. OBJECTIFS ET ENJEUX

Compte tenu de la diversité des méthodes LDI proposées ces vingt dernières années, il est évident qu'il n'a pas été envisagé de mettre en place lors de cette thèse toutes les stratégies existantes. Selon la bibliographie, beaucoup de techniques semblent efficaces, robustes, sensibles...Cependant, peu d'études sont réalisées sur un grand nombre d'échantillon, la majorité des publications se reposant même sur l'analyse de quelques peptides ou petites molécules connues pour répondre facilement en LDI. Si bien que parfois, ces analytes utilisés dans les développements et les validations des méthodes se trouvent être les molécules commercialisées dans les échantillons de calibration des temps de vol. Par exemple, des peptides tels que l'angiotensine, la bradykinine, la substance P, ou des petites protéines comme l'insuline ou le cytochrome C sont très souvent employés comme composés modèles dans les développements de méthodologies LDI. De plus, malgré le nombre d'articles scientifiques ayant été publiés sur le sujet, cette thématique suscite toujours autant de recherches comme en témoigne le nombre de publications parues récemment ([Graphe A-1](#)). On peut donc en conclure que les supports développés n'ont semble-t-il pas encore répondu à toutes les attentes des chercheurs et que le développement de techniques LDI alternatives constitue toujours un objectif de recherche majeur dans l'analyse de petites molécules et de biomolécules.

Au laboratoire, cette thématique a été initiée dès 2006 par N. Shenar, sous la direction du professeur Christine Enjalbal. Au cours de la thèse de N. Shenar, le potentiel de différents substrats inertes comme matrice LDI a été évalué pour la détection de peptides modèles. Ce travail a d'ailleurs fait l'objet de deux publications présentant les résultats obtenus d'une part sur des supports d'alumine poreuse et de silice poreuse [²²⁹ Shenar *et al.*, 2008], et d'autre part sur la comparaison des performances accessibles avec différentes matrices inertes (silicium poreux, cibles NALDITM, poudre de carbone, et silice poreuse) [²³⁰ Shenar *et al.*, 2009]. De plus, d'autres substrats tels que la feuille d'aluminium ou les cibles MassPREPTM DIOS-TargetTM ont également fait l'objet d'études. Ces travaux ont démontré tout l'intérêt des méthodologies LDI dans l'analyse de peptides de faibles masses pour lesquels des difficultés pouvaient être rencontrées dans des stratégies classiques MALDI. Parmi les matrices inertes étudiées, les substrats siliciques se sont avérés particulièrement efficaces aussi bien en termes de mise en œuvre, de reproductibilité ou encore de sensibilité à travers l'analyse d'une grande palette de peptides. De fait, nous avons logiquement décidé d'orienter prioritairement nos études vers des matrices basées sur des substrats de silice. Nous nous sommes dirigés vers deux grandes stratégies, des substrats de type poudre et des substrats de type surface, pour lesquels différentes structurations ont été étudiées. Des collaborations avec le Docteur Jean-Olivier Durand (ICG Montpellier) et avec les Docteurs Yannick Coffinier et Rabah Boukherroub (IEMN, IRI, Lille) ont été mises en œuvre pour disposer de supports innovants. Par ailleurs, une collaboration avec le

docteur Anne Roemer-Hazane nous a permis de disposer de supports à base de titane, élargissant ainsi nos domaines d'exploration.

Pour développer ces méthodologies de désorption/ionisation laser assistées par des matrices inertes, nous avons choisi comme échantillons modèles les peptides synthétiques pour plusieurs raisons. Tout d'abord, ils correspondent parfaitement à la gamme de masse visée dans le cadre des approches LDI sur substrat inerte. Ils présentent des structures chimiques variées, et donc des comportements hétérogènes, dus à leur composition en acides aminés possédant des caractères différents notamment en terme d'hydrophobie et de basicité. Par ailleurs, les peptides sont au cœur des stratégies d'identification en protéomique, spécialement dans les approches Bottom up, où ils font encore aujourd'hui l'objet de nombreux travaux, tant pour leur identification que pour leur caractérisation de séquences d'acides aminés permettant de remonter à des protéines voire des protéomes nouveaux. Enfin, les peptides sont également la base de recherches, appliquées mais aussi fondamentales, sur leurs comportements en phase gazeuse, principalement en spectrométrie de masse en tandem, ou les mécanismes de fragmentation suscitent encore l'intérêt de la communauté. De plus, en évoluant au sein d'un institut spécialisé dans la chimie des biomolécules, la synthèse peptidique constitue un point fort du laboratoire. En s'appuyant sur cet atout, travailler avec des peptides nous permet donc de concevoir et réaliser à façon notre propre matériel d'analyse, mais également de profiter d'une peptidothèque interne à l'équipe, comportant plus de 300 séquences peptidiques, élaborées par les précédentes doctorantes L. Mouls [² Mouls, 2005] et N. Shenar [¹ Shenar, 2008]. Compte tenu de l'expérience acquise dans la détection et le séquençage de peptides en spectrométrie de masse conventionnelle (ESI-MS/MS et MALDI-MS/MS) [²³¹ Mouls *et al.*, 2007; ²³² Shenar *et al.*, 2009], une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu en LDI peut être envisagée avec ces analytes.

L'objectif de ce travail de thèse a donc consisté dans le développement de méthodes de désorption/ionisation laser assistées par une matrice inerte pour l'analyse de biomolécules de faibles masses moléculaires. Pour cela, l'optimisation des protocoles, puis l'évaluation des performances à travers notamment des critères de sensibilité, de reproductibilité ou de polyvalence vis-à-vis de la nature des échantillons ont dû être menés. Pour pouvoir entreprendre des analyses LDI-MS et LDI-MS/MS sur les peptides modèles sélectionnés, il était également indispensable d'évaluer leur comportement en spectrométrie de masse en tandem selon des techniques conventionnelles. Les peptides synthétiques ont donc fait l'objet d'études approfondies de séquençage en spectrométrie de masse impliquant les sources d'ionisation MALDI et ESI.

PARTIE B. *MATERIELS ET*
METHODES

"Il n'y a pas une méthode unique pour étudier les choses."

Aristote

CHAPITRE I. SPECTROMETRIE DE MASSE : LES DIFFERENTES CONFIGURATIONS

Parmi la variété d'équipements proposés par les constructeurs, une grande diversité de technologies s'offre aux chercheurs. Dans ce cadre, l'Institut des Biomolécules Max Mousseron dispose de plusieurs spectromètres de masse pour caractériser les échantillons organiques. Lors de cette thèse, deux types de techniques d'ionisation douce associées à des analyseurs variés ont été utilisées : la désorption/ionisation (DI) et l'ionisation à pression atmosphérique (API). En effet, différents équipements disposant de ces sources DI et API ont été employés pour mener à bien les analyses de spectrométrie de masse et de spectrométrie de masse en tandem. Dans cette gamme d'équipement, certains instruments font partie du Département des acides aminés, peptides et protéines (DAPP), localisés à l'Université Montpellier 1 (ESI-Q, ESI-QqQ), d'autres sont situés au Laboratoire de Mesures Physiques (LMP) de l'université Montpellier 2 mais disponibles en libre accès (ESI-QqTOF, MALDI-LIFT-TOF-TOF) et enfin, deux appareillages ont été utilisés dans le cadre de collaboration (MALDI-CID-TOF/TOF, et ESI-Orbitrap pour lesquels les résultats ne sont pas mentionnés). Les paramétrages utilisés pour ces spectromètres de masse sont répertoriés en [Annexe 1](#).

Dans ce chapitre, nous allons donc détailler le choix des techniques employées en lien avec leurs caractéristiques propres. Les deux spectromètres de masse MALDI-CID-TOF/TOF et MALDI-LIFT-TOF/TOF ont été utilisés dans le cadre des développements méthodologiques LDI assistés par des matrices inertes, ainsi que pour l'étude du séquençage de peptide. Le spectromètre de masse ESI-Q en couplage avec la chromatographie en phase liquide a été utilisé pour le contrôle qualité des synthèses de peptide. Les spectromètres ESI-QqQ et ESI-QqTOF nous ont également permis d'étudier le séquençage de nos peptides, puis de les confronter à ceux résultants des analyses effectuées en MALDI-TOF/TOF. En effet, selon la technologie utilisée pour la mise en œuvre de la spectrométrie de masse en tandem, à savoir la méthode d'activation et le type d'analyseur employé, nous avons souhaité en étudier les conséquences sur le type de fragments détectés et/ou leurs intensités. Par ailleurs, toutes les données de MS/MS ont constitué une référence pour toutes nos expériences de LDI-MS/MS qui ont été mises au point lors de ce travail de thèse.

I.1. Les méthodes d'ionisation DI : les techniques MALDI-MS et MALDI-MS/MS

Malgré la mise sur le marché de nombreux appareillages de spectrométrie de masse, la technique d'ionisation MALDI reste toujours une méthode analytique couramment utilisée notamment du fait des avantages qu'elle présente vis-vis d'autres techniques plus lentes et plus difficiles à mettre en œuvre. En effet, le MALDI est une méthode d'ionisation douce qui permet de façon relativement

simple et surtout très rapide d'accéder à l'analyse d'une grande variété de molécules, produisant principalement des ions monochargés avec peu ou pas de fragmentation. La désorption/ionisation étant réalisée par irradiation de l'échantillon avec un laser pulsé, le couplage entre la source MALDI et un temps de vol est ainsi facilité et permet l'accès à une gamme de masse très étendue et à une résolution très correcte sur les faibles masses ($m/z < 5000$ uma). Cependant, bien que les appareillages MALDI-TOF reposent sur un principe commun, des variantes apparaissent dans la conception des instruments. Ces différences concernent principalement le système d'introduction de la plaque MALDI, le laser, le système de lentilles accélératrices, la disposition du temps de vol (axiale ou orthogonale) ou encore le réflectron. Cette problématique devient encore plus cruciale lorsqu'on s'attache à suivre les technologies développées pour la spectrométrie de masse en tandem puisque dans ce cas, chaque constructeur a mis en place une configuration spécifique qui permet d'accéder aux données MALDI-MS/MS.

Dans notre cas, la totalité des expériences MALDI-MS et MS/MS mais aussi LDI-MS et MS/MS a été réalisée sur un MALDI Ultraflex III commercialisé par Bruker Daltonics. C'est dans l'objectif d'évaluer la reproductibilité de nos résultats que nous avons alors entrepris de dupliquer certaines de nos expériences sur un second appareil, le MALDI 4800 plus, proposé par la société AB Sciex. De plus, ce second appareillage a également été utilisé pour effectuer des analyses complémentaires en MALDI-MSI (Mass Spectrometry Imaging). Cette technique d'analyse n'étant pas au cœur du sujet de thèse, le principe de l'imagerie MALDI sera toutefois brièvement décrit dans cette partie. Parmi les divergences de configuration, trois différences de conception pourront avoir un impact sur les investigations menées lors d'analyses LDI-MS et MS/MS : le système d'introduction de la plaque échantillon, le laser et la conception des expériences de spectrométrie de masse en tandem. Ces points clefs seront discutés dans les parties concernées.

I.1.1. La source d'ionisation MALDI

Comme détaillé dans la première partie, la technique MALDI a été introduite par Karas et Hillenkamp [¹⁵ Karas *et al.*, 1988] pour détecter des molécules de hautes masses moléculaires. C'est une méthode d'ionisation douce habituellement utilisée pour analyser les biomolécules telles que les peptides et les protéines. La technique repose sur la désorption/ionisation par un laser pulsé d'un mélange échantillon/matrice co-cristallisé sur une cible en acier. En pratique, l'échantillon en solution est déposé, habituellement sur une plaque MALDI en acier inoxydable, en présence d'une matrice en large excès constituée par un composé organique de faible masse moléculaire possédant des propriétés d'absorbance. Après évaporation du solvant, le système matrice/échantillon co-cristallisé forme alors le dépôt MALDI dans lequel la matrice a pour rôle d'assurer la protection de l'analyte pour minimiser sa dégradation (et donc sa fragmentation) tout en permettant sa vaporisation et son ionisation. Le dépôt est ensuite introduit dans la source sous vide de l'appareil, puis soumis à un

bombardement laser qui induit la désorption/ablation (soit un passage en phase gazeuse) des molécules d'échantillon, puis l'ionisation (soit la formation d'espèces chargées). Par des jeux de tensions, les ions sont alors envoyés de la source à l'analyseur où ils seront triés et détectés.

Pour satisfaire à une ionisation MALDI de qualité, plusieurs paramètres critiques sont à prendre en considération, parmi lesquels la préparation de l'échantillon, au travers de la composition de la matrice et du mode de dépôt choisi, ainsi que les caractéristiques du laser. Comme pour toute méthode de détection, il faut noter que l'efficacité de l'analyse dépend avant tout des caractéristiques de l'échantillon de départ. Outre la capacité de l'analyte à être vaporisé et à s'ioniser, il faut que l'échantillon dans son ensemble soit compatible avec l'analyse par spectrométrie de masse. Dans ce contexte, les conditions de solvant, la présence de tensio-actifs, de tampons, de sels inorganiques, sont autant de facteurs qui peuvent nuire à l'ionisation et/ou à la réalisation du dépôt. Une étape préalable de préparation d'échantillon peut être mise en œuvre pour purifier l'échantillon à analyser. La technique MALDI est rarement couplée à une technique séparative, cependant, dans le cas où il est nécessaire d'analyser un échantillon très complexe, une procédure offline de couplage avec la chromatographie peut être mise en œuvre. L'éluant en sortie de la chromatographie est alors prélevé et déposé sur la plaque MALDI par un robot échantillonneur. En revanche, des protocoles de couplage online sont directement accessibles à partir de source AP-MALDI.

I.1.1.1. Le choix de la matrice

Un dépôt MALDI repose sur la cristallisation entre un analyte et une petite molécule organique appelée communément matrice. Pour ce faire, l'échantillon doit être mélangé avec une matrice organique en excès et ainsi créer un dépôt composite solide qui pourra être soumis à la désorption/ionisation laser. Afin de permettre ce phénomène, la matrice choisie doit posséder certaines caractéristiques essentielles :

- Etre soluble dans le système de solvant utilisé pour solubiliser l'échantillon,
- Etre capable d'incorporer et d'isoler l'analyte,
- Présenter une forte absorption à la longueur d'onde du laser utilisé (généralement dans l'UV),
- Etre de faible masse moléculaire afin de faciliter la vaporisation et entraîner la co-désorption, tout en étant stable durant la préparation de l'échantillon ou lors de son introduction dans le spectromètre,
- Promouvoir l'ionisation de l'analyte en agissant comme un accepteur/donneur de proton pour favoriser les échanges matrice/analyte et permettre l'ionisation.

Comme il a déjà été discuté, plusieurs molécules pouvant être utilisées comme matrice MALDI sont répertoriées dans la bibliographie, le choix de la matrice idéale restant cependant empirique. En

pratique, compte tenu de la rapidité de l'analyse, plusieurs matrices sont souvent testées pour un même échantillon, et il est déterminé expérimentalement quelle matrice permet d'obtenir le spectre de meilleure qualité. Dans le cas d'échantillons constitués de composés en mélange, l'utilisation de plusieurs matrices est recommandée car les analyses peuvent se révéler complémentaires. De très nombreuses matrices existent aujourd'hui pour répondre à différentes problématiques analytiques. Le choix de la matrice peut aussi se révéler important dans le contrôle de la fragmentation. Ainsi, les matrices sont parfois qualifiées de matrices "chaudes" (HCCA) ou de matrice "froide" (DHB) selon leur propension à induire ou non la fragmentation métastable [28 Zenobi *et al.*, 1998; 30 Dreisewerd, 2003]. Il faut néanmoins mentionner que ce comportement peut être modifié par les conditions expérimentales (énergie du laser et nature de l'analyte étudié) [233 Luo *et al.*, 2002]. Pour information, un document mis en ligne par Sigma présente une liste de matrices organiques associées aux catégories de biomolécules analysables en MALDI [234 SIGMA-ALDRICH, 2001]. Pour ce projet de thèse, qui m'a amené à étudier en détails des peptides, les matrices les plus employées ont été l'HCCA (ou CHCA) et le DHB. Ces matrices sont représentées dans la **Figure B-1**.

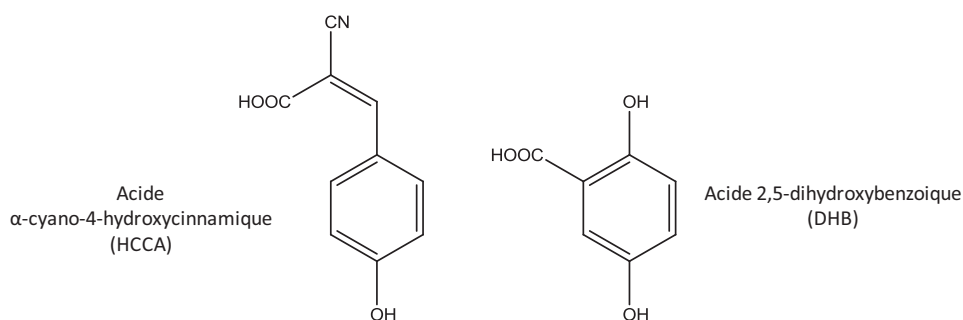


Figure B-1. Structures chimiques de quelques matrices utilisées dans la technique MALDI.

I.1.1.2. Les différents protocoles de préparation d'échantillon

Pour la technique MALDI, les méthodes de dépôt sont très nombreuses et conditionnent également la qualité de la préparation, notamment à travers l'homogénéité du dépôt. [234 SIGMA-ALDRICH, 2001]. Pour les résultats présentés dans ce mémoire, la méthode de la goutte séchée a été exclusivement utilisée. Les autres modes de dépôt ne sont donc pas présentés. Pour les méthodologies LDI assistée par des matériaux inertes, après des études d'optimisation, deux protocoles ont été employés : un dépôt double couche et un dépôt direct.

Principes des dépôts utilisés :

- La goutte séchée (dried droplet) implique le mélange d'une solution de matrice et d'une solution d'analyte, suivi du dépôt d'une goutte de ce mélange sur la cible MALDI. Les solvants sont évaporés par séchage à l'air ou sous vide et il en résulte un dépôt solide. Il existe une méthode dérivée consistant à réaliser le mélange sous forme de goutte directement sur la cible. Cette technique présente une mise en œuvre très rapide et est bien adaptée à l'analyse de petites molécules et peptides. Elle conduit cependant à un dépôt relativement

hétérogène qui peut poser des problèmes de reproductibilité et de "hot-spot" (ou "sweet-spot"), c'est-à-dire de zones où l'analyte sera plus concentré comparé à d'autres zones où il sera plus difficile à localiser. Pour les études MALDI utilisant les matrices HCCA et DHB, nous avons employé exclusivement la technique de dépôt de la goutte séchée.

- Le dépôt double couche s'inspire du dépôt MALDI en couche mince (thin layer). Ce dernier consiste à déposer dans une première étape une goutte de la matrice en solution dans un solvant très volatil (typiquement l'acétone) sur la cible. Ceci permet d'obtenir une couche de matrice homogène. Après évaporation, une goutte d'échantillon est déposée sur la première couche de matrice. Ce dépôt double couche a été employé pour nos études LDI basée sur l'utilisation de matrices inertes LDI se présentant sous forme de suspension colloïdales. Dans un premier temps, le matériau inerte particulaire a été déposé en solution aqueuse puis laissé sécher à l'air libre de manière à former une couche de matériau inerte. Dans un second temps, la goutte d'échantillon a été déposée sur cette couche inerte. Ce dépôt est utilisé, discuté et illustré dans l'[Article 3: Silica nanoparticles pre-spotted onto target plate for LDI mass spectrometry analyses of peptides](#).
- Dans le cas des supports LDI présentés sous forme de surface, le dépôt ne pose pas de problème : une goutte unique d'échantillon est déposée sur le support. Ce protocole est utilisé et discuté dans l'[Article 4: Investigation of silicon-based nanostructure morphology and chemical termination on LDI-MS performance](#) et l'[Article 5: Laser desorption ionization mass spectrometry of protein tryptic digests on nanostructured silicon plates](#).

En analyse MALDI, il faut mentionner qu'en plus du mode de dépôt, la nature du solvant intervient également dans le couple échantillon/matrice. Dans notre cas, les échantillons peptidiques ont été solubilisés dans un mélange eau/acétonitrile (ratio ajusté selon les concentrations en peptide). Pour les approches LDI utilisant des surfaces, il n'y a évidemment pas de problématique de conditionnement de la matrice puisque le support constitue la matrice. En revanche, pour les approches de type poudre, il a été choisi de conditionner les matrices dans l'eau. L'eau permet en effet de garder une goutte confinée lors du dépôt d'une suspension de matrice sur les cibles MALDI en acier inoxydable. La couche mince formée est alors restreinte, ce qui permet d'obtenir une plateforme de dépôt réduite, tout en limitant la concentration nécessaire de la solution de matrice pour obtenir une couche inerte homogène. Bien que le temps d'évaporation soit plus important comparé à l'utilisation de solvants organiques, ces matériaux sont stables pendant le temps de séchage. Ce dernier est de plus minimisé par l'emploi de petits volumes de dépôt.

I.1.1.3. Le Laser

Depuis le développement de la technique MALDI, une grande partie de la gamme de longueur d'onde UV et IR a été testées pour irradier l'échantillon. Les longueurs d'onde émises sont dépendantes du système laser utilisé (laser à gaz, laser solide...) (une liste des lasers utilisables en MALDI est également répertoriée par Sigma [²³⁴ SIGMA-ALDRICH, 2001]). Les caractéristiques du laser constituent des paramètres cruciaux du processus LDI. Le laser est un système relativement figé sur les appareillages commerciaux, puisqu'il n'émet en général que dans une seule longueur d'onde et que son angle d'incidence est fixe et dépend du choix du constructeur. Ainsi, pour un processus MALDI ou LDI efficace, il faut donc adapter la matrice organique ou inerte au laser, et non l'inverse.

Outres les caractéristiques propres du laser utilisé, différents paramètres vont influencer sur le phénomène d'irradiation.

- La longueur d'onde du laser : elle doit être en accord avec la matrice organique utilisée en MALDI. Cette dernière doit avoir un spectre d'absorption dont le maximum est proche de la longueur d'onde du laser, afin de pouvoir optimiser le phénomène d'absorption des photons incidents et la redistribution de l'énergie au réseau environnant. La longueur d'onde est fixe et dépend du modèle de laser utilisé,
- La fluence du faisceau laser : elle est ajustable dans une certaine gamme de travail. En général, les spectromètres de masse MALDI permettent de travailler avec des fluences laser de l'ordre de 20-200 J m⁻² en jouant sur un atténuateur qui permet de moduler la puissance du laser. Elle va agir sur l'ensemble du phénomène de désorption/ionisation et sur la production d'ions métastables,
- La durée d'irradiation (impulsion laser/fréquence) : de la même façon, elle est ajustable dans une gamme de fréquence qui dépend du module laser utilisé (les fréquences peuvent aller de 100 à 1 000 Hz pour les appareillages les plus récents),
- La taille de la zone irradiée par le faisceau laser : elle peut être modifiée en réglant des paramétrages correspondant à des modifications des lentilles sur le trajet du laser. Elle va impacter la résolution spatiale de l'irradiation laser et la quantité d'ions désorbés/ionisés.

Comme pour les autres constituants de l'appareil, chaque constructeur dispose généralement de sa propre technologie (développée au sein de son activité de recherche ou achetée). Si certains paramètres sont communs et modulables dans une certaine mesure, d'autres caractéristiques sont fixes et sont propres à chaque instrument, comme l'orientation du laser. Effectivement, le MALDI Ultraflex II est constitué d'un laser smartbeam ITM [²³⁵ Bruker.Daltonics, 2008] qui est un laser Nd:YAG fonctionnant à une longueur d'onde de 355 nm et qui permet de travailler avec une fréquence de 200 Hz. Comme pour tous les spectromètres de masse MALDI proposés par Bruker Daltonics, le laser

est orienté d'un angle de 30° par rapport à la cible échantillon, le constructeur considérant que l'angle de laser n'influence pas la trajectoire des ions. Les ions sont ensuite extraits par le système "gridless ion optics" qui permet la transmission du maximum d'ion (**Figure B-2**). Au contraire, la société AB Sciex a, quant à elle, fait le choix d'utiliser une irradiation normale (incidence orthogonale à la cible) sur ses appareils, justifiant le fait que cela diminuait la dispersion des ions du "plume" et donc que cela favorisait la collecte des ions pour le passage vers l'analyseur. Dans ce cas, des processus en phase gazeuse entre le laser et le plume sont possibles pendant le temps de l'irradiation. Ainsi, sur le MALDI 4800 plus, le laser Optibeam™, bien que présentant des caractéristiques semblables (355 nm, 200 Hz) est disposé à 90° par rapport à la cible, directement aligné avec l'analyseur.

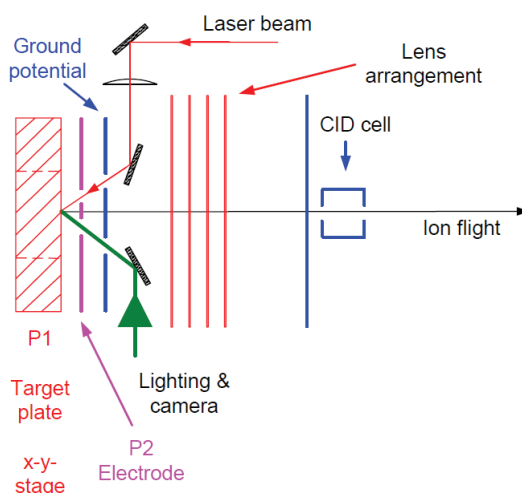


Figure B-2. Schéma de la source du MALDI Ultraflex III (d'après "Ultraflex III User Manual").

I.1.1.4. Système d'introduction de la plaque échantillon

Le système d'introduction de la plaque MALDI est un point crucial pour la réalisation d'analyses LDI assistées par des matériaux inertes. En effet, selon le matériau utilisé, des difficultés d'adhérence à la plaque peuvent devenir un obstacle à la mise en œuvre de l'analyse. Sur le MALDI Ultraflex III, le dispositif employé pour introduire la plaque consiste en l'association mécanique de la plaque MALDI et du support de plaque puis de la disposition de l'ensemble sur un bras porteur horizontal (**Figure B-3.(a)**). Ce dernier va assurer la rotation douce de 90° pour placer la plaque à la verticale et la translation à l'intérieur de la source. Ce procédé permet l'insertion de la plaque dans la source MALDI sans choc ou tremblement. Dans le cas du MALDI 4800 plus, la plaque que nous avons utilisée est positionnée sur un support magnétique, puis l'assemblage est disposé à l'horizontale, toujours de façon magnétique, dans la chambre de chargement (**Figure B-3.(b)**). Si a priori ce système présente moins de possibilité de coulures ou de pertes d'adhérence du dépôt, il a été observé des difficultés de mise en œuvre pour certaines de nos méthodologies LDI. En effet, lorsque le dépôt présente suffisamment d'adhérence à la plaque, comme un dépôt MALDI classique, ce système ne présente aucun inconvénient. En revanche, lorsque le dépôt d'échantillon associé à la matrice inerte est plus

sensible aux vibrations, la secousse entraînée par la fixation magnétique devient une limitation. Le dépôt, moins adhérent, peut alors être détérioré et entraîner une diminution voire une disparition du signal attendu lors de l'analyse.

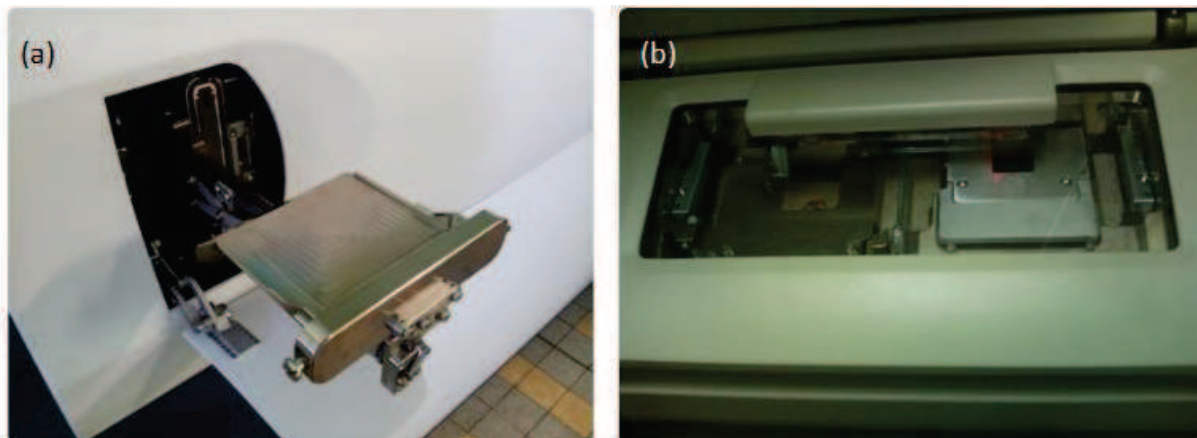


Figure B-3. Système d'introduction de la plaque sur (a) le MALDI Ultraflex III (Bruker) et (b) le MALDI 4800 plus (AB Sciex).

I.1.2. L'analyseur à temps de vol

I.1.2.1. Analyse en mode MS

I.1.2.1.1. MALDI-TOF en mode linéaire

Brièvement, l'analyseur à temps de vol (Time-Of-Flight, TOF) sépare les ions dans une zone libre de champs appelée tube de vol. Les ions formés dans la source sont accélérés par une différence de potentiel appliquée entre l'électrode constituée par la cible MALDI et la grille d'extraction. Les ions de masse m et de charge z sont accélérés par un potentiel E sur une même distance, ils possèdent donc tous la même énergie cinétique E_c (1). Une fois sortie de cette zone d'accélération, ils entrent dans le tube de vol, acquièrent un mouvement rectiligne uniforme et vont avoir une vitesse v constante associée à leur rapport masse/charge (m/z) (2). La longueur du tube de vol, la charge de l'électron e ($1,602 \cdot 10^{-19}$ C) ainsi que le potentiel E étant des paramètres constants, les ions vont pouvoir être séparés et détectés selon ce rapport m/z en fonction de l'équation (3). Autrement dit, plus le rapport m/z est faible, plus un ion va atteindre le détecteur rapidement.

$$(1) E_c = zeE = \frac{1}{2} mv^2$$

$$(2) v = \frac{L}{t} = \sqrt{\left(\frac{2zeE}{m}\right)}$$

$$(3) t^2 = \frac{m}{z} \left(\frac{L^2}{2eE}\right)$$

Il est à noter que le temps d'accélération n'est pas pris en compte dans ces équations.

I.1.2.1.2. L'extraction retardée (DE pour Delayed Extraction)

En MALDI-TOF, la résolution en masse est affectée par le temps et la distance de vol des ions. Lorsque le mode continu d'extraction des ions est utilisé, c'est-à-dire que les ions formés dans la source sont immédiatement extraits par application permanente de la tension entre la plaque et la grille d'extraction, une dégradation de la résolution peut être constatée. En effet, plusieurs facteurs peuvent créer une dispersion en énergie cinétique des ions possédant le même rapport m/z :

- La distribution temporelle : deux ions identiques, de même position initiale et de même vitesse initiale, peuvent être éjectés à des temps différents pendant la durée de l'impulsion laser. Les ions vont alors posséder la même vitesse, la même durée de temps de vol, mais vont être détectés à des temps différents.
- La distribution spatiale : en raison des irrégularités de la surface du dépôt MALDI, deux ions de même rapport m/z peuvent être localisés à des distances différentes de la grille d'extraction. Il en résulte une différence de durée d'accélération et donc une vitesse différente dans le tube de vol.
- La distribution en énergie cinétique : deux ions identiques n'ont pas forcément la même vitesse initiale (selon leur composante de vitesse lors de la formation dans l'expansion gazeuse). Sous l'effet du champ d'accélération, ils vont avoir des vitesses différentes et donc des temps de vol différents.

Pour réduire la dispersion en énergie cinétique des ions possédant le même rapport m/z , il a été proposé de mettre en œuvre un délai entre l'impact du laser et leur extraction de la source. En utilisant ce mode, il est possible de focaliser les ions en les maintenant dans une région libre de champs pendant un certain temps. La distribution temporelle est donc compensée, la distribution spatiale est minimisée, et la distribution en énergie cinétique est contrebalancée par l'impulsion d'extraction qui permet de transmettre une énergie plus importante lors de l'accélération des ions qui initialement possédaient moins d'énergie cinétique.

Dans notre cas, nous avons constamment utilisé le mode d'extraction pulsée, avec une valeur moyenne de 30 ns.

I.1.2.1.3. MALDI-TOF en mode réflectron

Pour améliorer la résolution, un système agissant sur le temps de vol a été mis au point : le réflectron ou réflecteur ou miroir électrostatique. Le réflectron est constitué d'une grille et d'une série d'électrodes annulaires présentant des potentiels croissants qui créent un champ électrique de sens opposé à la trajectoire des ions. En pratique, après leur accélération, les ions arrivent dans le tube de vol avec une vitesse définie, ils sont ralentis jusqu'à être arrêtés par le champ électrique du réflectron, et sont renvoyés par ce dernier vers le détecteur. Selon leur vitesse, et donc selon leur énergie cinétique initiale, les ions vont s'enfoncer plus ou moins loin dans le réflectron. Des ions avec

un rapport m/z identique mais qui possèdent des énergies cinétiques différentes vont parcourir des distances plus ou moins importantes à l'intérieur de ce miroir électrostatique. Les ions avec une énergie cinétique moindre s'enfonceront moins profondément que les ions avec une énergie cinétique plus élevée. A la sortie du réflectron, les ions sont réaccélérés en fonction de leur énergie cinétique initiale. Ainsi, ce système permet d'une part de refocaliser sur le détecteur des ions de même rapport m/z qui présentaient une dispersion en énergie cinétique. D'autre part, il permet de rallonger le temps de vol et donc d'améliorer la séparation. Ce mode n'est utilisable que pour des masses inférieures à 10 000 Da. Au-delà, il faut basculer en mode linéaire. Cependant, dans notre cas, les analyses ayant été réalisées sur des échantillons présentant des ions inférieurs à 3 000 m/z , nous avons utilisé exclusivement ce mode réflectron.

I.1.3. Deux conceptions différentes de la spectrométrie de masse en tandem

Avant de détailler le principe de la spectrométrie de masse en tandem qui a été mise en œuvre durant ce projet de thèse, il faut brièvement rappeler les deux méthodes antérieures aux développements des technologies TOF/TOF permettant d'obtenir des informations structurales.

I.1.3.1. La dissociation en source

Le terme "dissociation dans la source" (ISD pour In Source-Decay) est utilisé pour qualifier les fragmentations des ions ayant lieu dans la source avant la zone d'accélération. En effet, les ions qui ont acquis une énergie interne suffisante peuvent se fragmenter. Ceux dont la durée de vie est plus courte que le temps de séjour dans la source vont alors se dissocier avant l'accélération, et induire la formation d'espèces de masses différentes (les ions fragments). Lorsque l'accélération intervient, les ions sont alors extraits de la source et ensuite triés dans le tube de vol selon leur rapport masse/charge (m/z) et sont détectés séparément.

I.1.3.2. La dissociation post-source

Le terme "dissociation post-source" (PSD pour Post Source Decay) est utilisé pour qualifier les fragmentations des ions ayant lieu après la source dans les zones libres de champs. En fonction de leur énergie interne, des ions peuvent avoir une durée de vie supérieure au temps de séjour dans la source, mais inférieure au temps de vol. Ils vont alors se fragmenter dans le tube de vol. Mais dans ce cas, l'ion précurseur se fragmente après l'accélération en source, et donc l'ion précurseur et les ions fragments possèdent sensiblement la même vitesse. Dans le mode linéaire, ils sont donc détectés en même temps. L'introduction du réflectron permet en revanche de séparer ces ions, puisque les ions fragments, bien qu'ayant la même vitesse sur la première partie du parcours, ont ensuite des énergies cinétiques différentes. Les ions fragments vont donc être séparés dans la partie du tube de vol post-réflectron et atteindre le détecteur en fonction de leur rapport m/z . Ce protocole, qui

permet donc de détecter les ions métastables obtenus par dégradation entre la source et le réflectron pendant leur temps de vol, n'est néanmoins pas applicable sur toute la gamme spectrale. En effet, il est nécessaire de réduire la fenêtre de détection pour se focaliser sur des ions possédant des énergies similaires ($\delta < 30\%$), soient des temps de vol similaires. Pour cela, il faut scinder l'analyse en petites portions de spectres pour obtenir un signal assez bien résolu et donc une mesure de masse suffisamment précise des ions fragments métastables. De fait, cette technique est longue et fastidieuse à mettre en place puisque le spectre final résulte de la concaténation de plusieurs spectres obtenus par des expériences réalisées sur de gammes de m/z restreintes.

I.1.3.3. Configuration MS/MS : des ions métastables aux ions activés par collision haute énergie

Un autre point de divergence entre les appareils de spectrométrie de masse équipés de la source MALDI concerne la conception et la réalisation d'expérience de spectrométrie de masse en tandem, bien qu'elle soit décrite par le même acronyme. Avant le développement de ces technologies, la seule méthode permettant d'accéder à des informations de structure sur les appareillages MALDI-TOF était de réaliser des expériences PSD (Post-Source Decay). Depuis quelques années, d'autres systèmes ont vu le jour dans le but de pouvoir accéder de manière plus simple et directe à des informations de structure. C'est dans ce contexte que les constructeurs ont adopté des configurations différentes. Les deux configurations utilisées respectivement dans le MALDI-CID-TOF/TOF (AB Sciex) et le MALDI-LIFT-TOF/TOF (Bruker) sont illustrées dans les **Figure B-4** et **Figure B-5** à partir de schémas extraits d'une publication de Cotter [²³⁶ Cotter *et al.*, 2005].

I.1.3.3.1. MALDI-CID-TOF/TOF

Ainsi, sur le MALDI 4800 plus d'AB Sciex (**Figure B-4.(a)**), la mise en œuvre de la spectrométrie en tandem repose sur la présence d'une cellule de collision située sur le trajet des ions dans le temps de vol [²³⁷ Medzihradszky *et al.*, 1999]. Les ions, de haute énergie à la sortie de la source (+20 keV), commencent leur trajet sur un temps de vol linéaire. Ils passent alors une fenêtre de sélection, le Time Ion Selector (TIS) qui permet de sélectionner précisément les ions précurseurs choisis. Comme illustré dans la **Figure B-4.(b.)**, ces derniers sont alors décélérés à travers un jeu de lentilles ("deceleration stack") pour abaisser leur contenu énergétique à 1-2 keV afin de pouvoir contrôler les fragmentations qui ont lieu ensuite dans la cellule de collision remplie d'Hélium. Les ions produits par collision avec le gaz inerte sont ensuite extraits et ré-accélérés de façon pulsée par les lentilles dans la "région source 2" à 20 keV vers le réflectron. L'énergie de collision est contrôlée par l'opérateur de 0 à 2 keV. Dans cette approche, la décélération des ions précurseurs réduit l'énergie transférée lors des collisions, ce qui peut induire un spectre MS/MS moins abondant en ions fragments. De plus, tous les ions métastables éventuellement formés ne peuvent en théorie atteindre la cellule CID en

raison du champ ralentisseur. Cela signifie que le mécanisme CID contribue très majoritairement à la fragmentation des ions précurseurs.

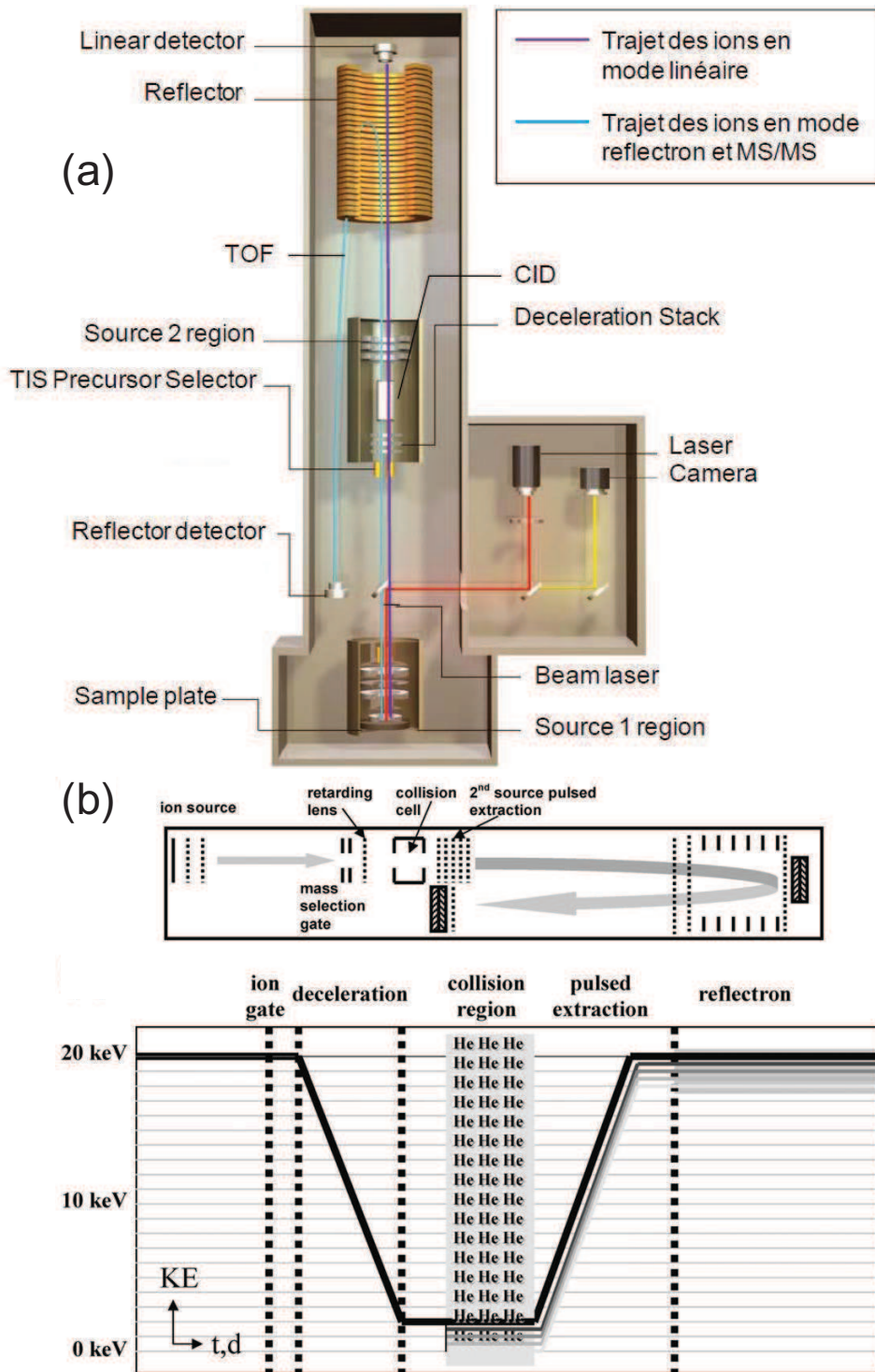


Figure B-4. Schéma (a) du spectromètre de masse MALDI 4800 plus (AB Sciex) et (b) de la spectrométrie de masse en tandem MALDI-CID-TOF/TOF d'après un schéma publié par Cotter [236 Cotter et al., 2005].

I.1.3.3.2. MALDI-LIFT-TOF/TOF

Le MALDI Ultraflex III utilise la technologie LIFT [²³⁸ Suckau *et al.*, 2003] qui permet de réaliser des analyses de dissociation induite par le laser (LID) et pseudo-CID/LID (**Figure B-5.(a)**). Cette appellation LID, proposé par le constructeur de cet instrument, s'apparente à la technique PSD car elle repose sur la génération d'ions métastables. Après l'accélération en source, des fragmentations peuvent avoir lieu dans la zone de drift et donner naissance à des ions fragments qui possèdent alors la même vitesse que les ions parents. Dans la configuration proposée par Bruker, la technique LIFT se décompose en réalité en trois étapes à travers des modules disposés sur le trajet des ions pour réaliser la spectrométrie de masse de tandem. En amont de la cellule LIFT, un sélecteur, le PCIS (Precursor Ion Selector), permet de filtrer spécifiquement un ion parent et ses ions fragments métastables associés possédant la même vitesse parmi un mélange d'ions. Puis les ions sélectionnés passent dans "un ascenseur à potentiel", la cellule LIFT, tel que représenté dans la **Figure B-5.(b)**. La technique consiste à augmenter les énergies cinétiques des ions (+ 19 KeV) afin que la différence d'énergie entre l'ion parent et les ions fragments n'excède pas 30 %, ce qui permet au détecteur de pouvoir refocaliser l'ensemble des ions en une seule étape. Ainsi, quand l'énergie de l'ion parent est amené à 27 KeV (8 KeV + 19 KeV), les ions fragments devront avoir une énergie minimum 18,9 KeV pour pouvoir être détectés ($27 \text{ KeV} - 30\% \times 27 \text{ KeV}$). Un second sélecteur, le PLMS (Post LIFT Metastable Suppressor), permet ensuite de dévier d'une part l'ion parent et d'autre part les fragments métastables formés après l'accélération dans la cellule LIFT. Par ailleurs, une cellule CID remplie d'argon a été placée en sortie de source pour permettre des dissociations induites par collision et ainsi augmenter l'intensité des ions fragments de faibles masses obtenus par LID/PSD. En pratique, l'analyse se déroule en deux étapes. D'abord, le spectre unique de l'ion parent est obtenu (PCIS ON, LIFT OFF, PLMS OFF), puis les ions fragments sont ensuite détectés dans une seconde partie de l'analyse (PCIS ON, LIFT ON, PLMS ON). La concaténation des deux modes (parent et fragment) permet d'obtenir le spectre MS/MS reconstitué (présentant simultanément sur le spectre l'ion parent et les ions fragments). De fait, l'abondance relative de l'ion parent par rapport aux abondances relatives des ions fragments est arbitraire et est laissé à l'appréciation de l'opérateur. Par ailleurs, il n'est pas possible de régler une énergie de collision en LID, ni même en CID, et ainsi d'ajuster l'intensité du parent contrairement au mode d'activation CID contrôlé qui est à disposition sur le MALDI 4800 plus.

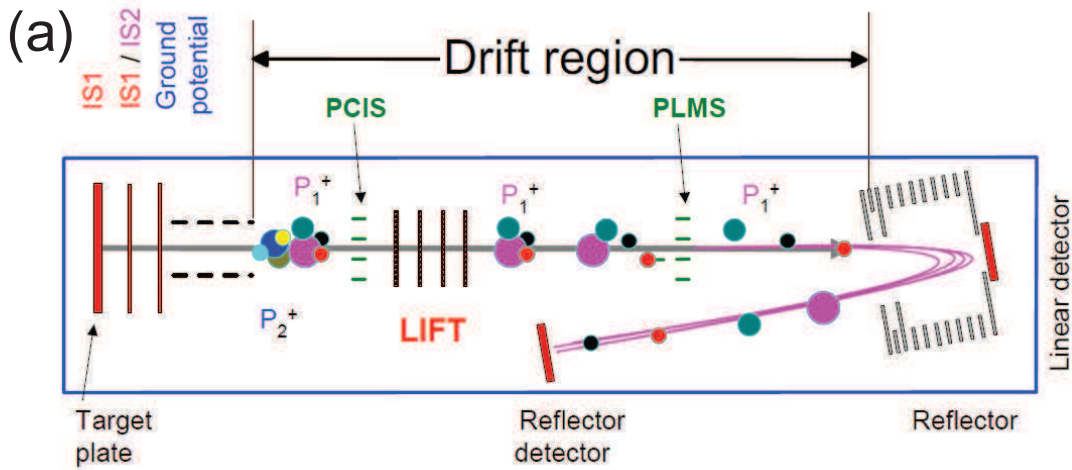


Figure B-5. Schéma (a) du spectromètre de masse MALDI Ultraflex III (d'après "Ultraflex III User Manual") [²³⁶ Cotter *et al.*, 2005].

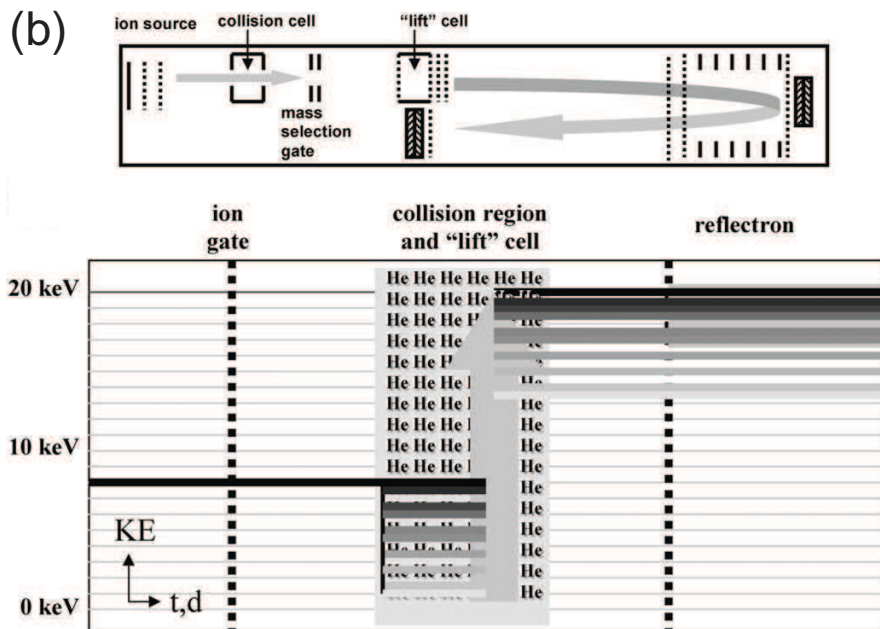


Figure B 5 (suite). Schéma (b) de la spectrométrie de masse en tandem MALDI-LIFT-TOF/TOF d'après un schéma publié par Cotter [²³⁶ Cotter *et al.*, 2005].

I.1.4. L'imagerie MALDI-MSI

L'imagerie par spectrométrie de masse avec la source MALDI a été utilisée pour caractériser l'uniformité des dépôts LDI réalisés à partir de matrices siliciques sous forme de poudre (Nanoparticules de silice plus particulièrement). Les résultats sont discutés dans l'[Article 3: Silica nanoparticles pre-spotted onto target plate for LDI mass spectrometry analyses of peptides](#).

Le principe de l'imagerie en spectrométrie de masse consiste à détecter et localiser des composés d'intérêt sur un échantillon présenté sous la forme d'une surface. Dans notre cas, la technique utilisée pour produire les ions à partir de cet échantillon est l'ionisation MALDI. Ainsi, le faisceau laser

est utilisé de manière à réaliser des analyses MALDI-MS point par point directement sur l'échantillon. A chaque point (dont les dimensions sont définies préalablement en fonction de la précision souhaitée et des capacités du laser) correspond une analyse et donc un spectre de masse. En extrayant ensuite les ions souhaités des spectres de masse, il est possible de cartographier un échantillon en fonction de la localisation de l'espèce sélectionnée sur l'ensemble de la surface. Le principe de l'imagerie MALDI est illustré en **Figure B-6** par un schéma provenant d'un article du groupe d'I. Fournier [²³⁹Wisztorski *et al.*, 2007].

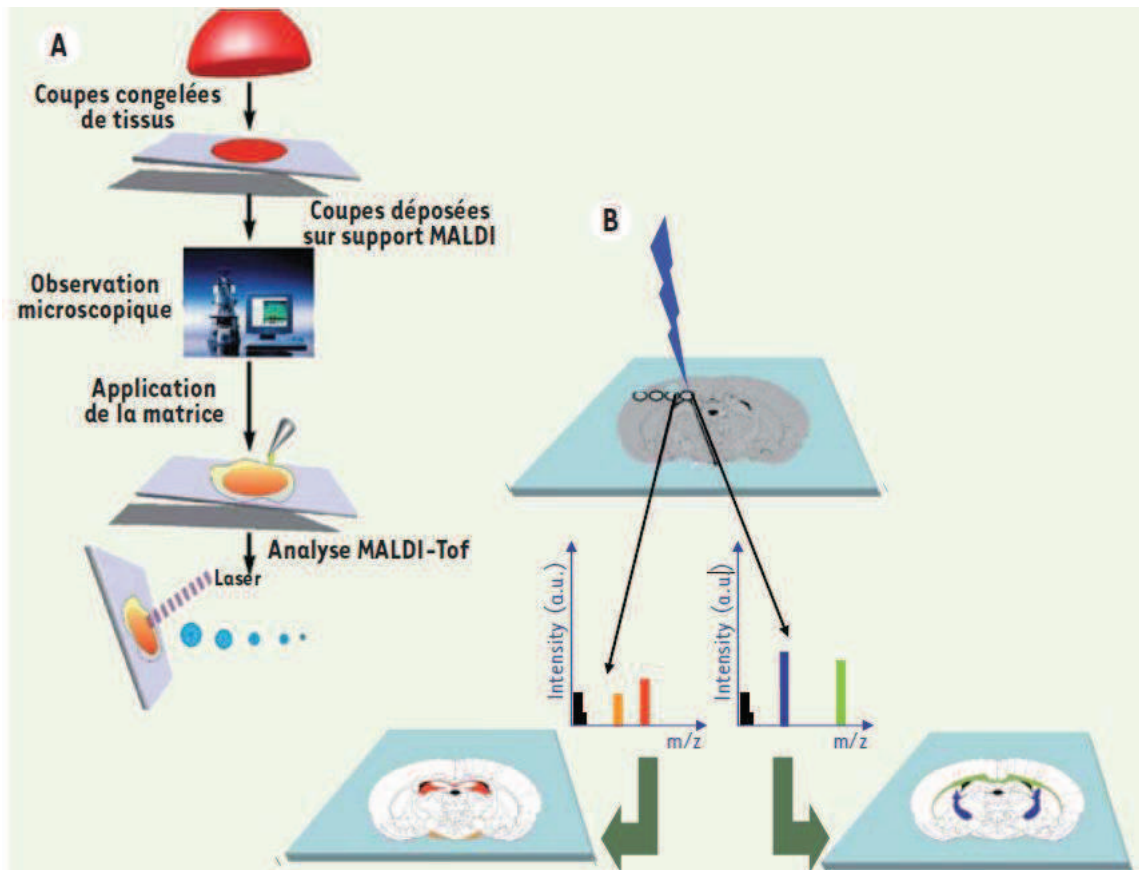


Figure B-6. Principe de l'imagerie MALDI-TOF [²³⁹Wisztorski *et al.*, 2007].

En pratique, l'échantillon à imager est déposé sur un support approprié, en général une plaque de verre surmontée d'une surface conductrice ITO (Oxyde d'indium-étain) (A). L'échantillon est recouvert de matrice MALDI puis est introduit au moyen d'un adaptateur dans le spectromètre MALDI-TOF. L'analyse consiste à balayer point par point la surface de l'échantillon avec le laser (B). Un logiciel informatique permet ensuite de reconstituer une image bidimensionnelle de la répartition des molécules en fonction de l'abondance des espèces dans les spectres de masse correspondant à chaque point analysé.

I.2. Les méthodes d'ionisation API : les techniques ESI-MS et ESI-MS/MS

Les techniques de nébulisation constituent l'autre grande famille de méthodes d'ionisation douce offrant la possibilité de produire des ions à pression atmosphérique à partir de molécules non

volatiles et (ou) thermolabiles. Parmi elles, l'Electrospray demeure la référence notamment en raison de sa capacité à permettre l'analyse à pression atmosphérique sans fragmentation d'une grande variété de biomolécules de faibles, moyennes et hautes masses par la formation d'ions mono- et surtout multichargés. De plus, l'ESI peut être facilement couplée en amont avec les méthodes séparatives de chromatographie, et en aval avec une variété d'analyseurs différents (Quadripôle, piège d'ion, analyseurs à transformée de Fourier, hybride Quadripôle-TOF...).

En caractérisation de biomolécules synthétiques ou naturelles, et plus particulièrement dans le domaine des peptides, l'ESI se révèle indispensable à travers des appareillages types LC-ESI-QqTOF développés depuis les années 2000. En protéomique, l'ESI est également au cœur des stratégies d'identification qui, depuis peu, reposent souvent sur des stratégies analytiques de type Shotgun réalisées sur des appareillages ESI-Orbitrap. De ce fait, nous nous devons d'utiliser cette source d'ionisation pour nos échantillons. Dans ce cadre, nous disposons de trois appareillages de spectrométrie de masse accessibles (ESI-Q, ESI-QqQ et ESI-QqTOF) sur lesquels l'ensemble de nos séquences peptidiques a été détecté et/ou caractérisé.

1.2.1. La source Electrospray

Les deux spectromètres utilisés sont tous issus de la gamme commercialisée par le constructeur Waters. Ils sont équipés d'une source ESI qui présente une géométrie Z-spray™, dont une illustration est présentée en **Figure B-7**.

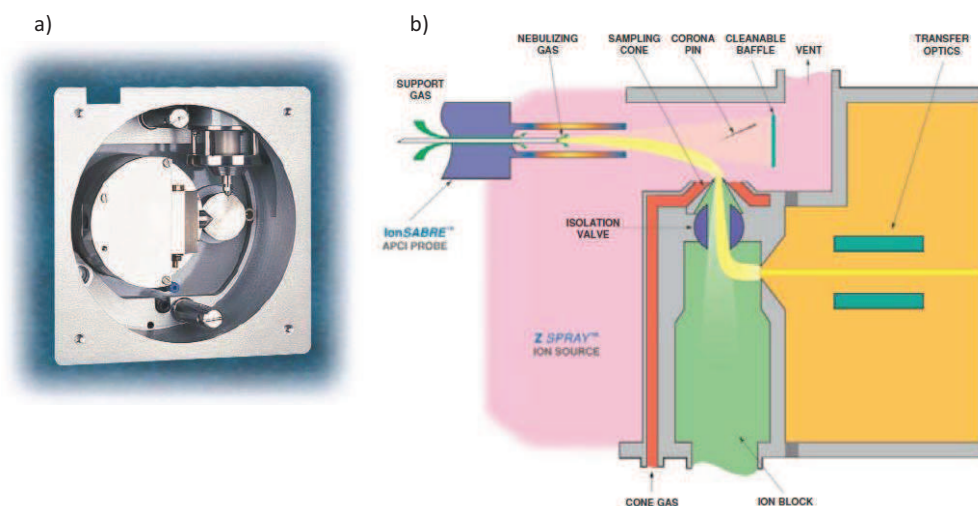


Figure B-7. La source Z-spray™, a) vue photographique de face et b) représentation schématique de coupe.

La différence pouvant intervenir entre les analyses réalisées sur ces appareillages est donc liée à l'analyseur associé. En théorie, les espèces formées par l'ionisation Electrospray devraient être les mêmes sur les deux spectromètres de masse. De même, pour les deux spectromètres mettant en œuvre la technologie de spectrométrie de masse en tandem, les ions fragments formés et détectés dépendent directement de l'analyseur. Bien que les deux appareillages aient un mécanisme

d'activation commun, il a été intéressant de vérifier les similitudes (ou les différences) entre les spectres MS/MS issus des mêmes molécules.

Le principe de l'Electrospray consiste à ioniser et désolvater à pression atmosphérique des analytes en solution (**Figure B-8**). En pratique, l'échantillon liquide, issu en amont d'une technique séparative ou d'une injection directe, est introduit dans la source par un capillaire de faible diamètre. Par une différence de potentiel entre ce capillaire et une contre-électrode, un champ électrique va induire la migration des espèces chargées (positivement ou négativement selon la polarité choisie) et provoquer la formation d'un spray (ou aérosol) de gouttelettes chargées *via* la formation du cône de Taylor. Dans la source, sous l'effet de la température et des gaz (rideau et désolvatation), les gouttes subissent des fissions/évaporations de solvant qui aboutissent à la formation de gouttes plus petites. La diminution de leur taille entraîne une augmentation de la densité de charge en surface. Lorsque les forces de répulsions sont supérieures aux tensions de surface de la goutte, il se produit alors une fission des gouttelettes, ou explosion coulombienne qui résulte *in fine* en la libération des ions en phase gazeuse qui sont extraits de la source par le gradient électrique. Pour ce phénomène, deux théories principales ont été discutées. Dans le modèle de Dole (ou modèle du résidu chargé), une série d'explosion coulombienne conduit à des gouttelettes comportant pour une molécule d'analyte une ou plusieurs charges. Dans le modèle d'Iribarne et de Thomson (ou modèle d'évaporation ionique), les ions peuvent être directement extraits et émis en phase gazeuse à partir de microgouttelettes.

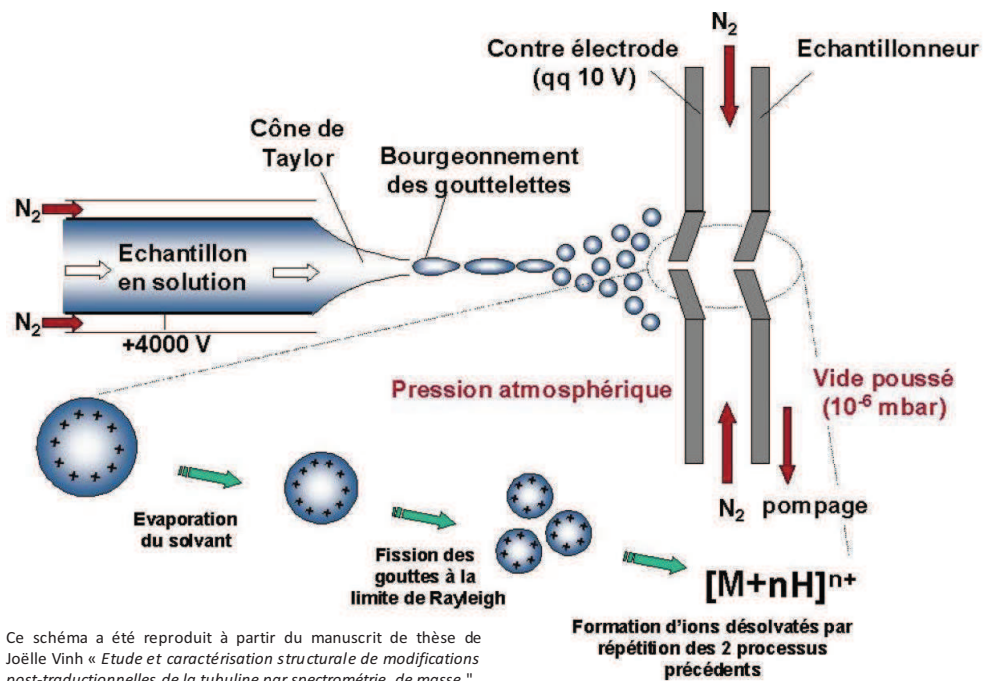


Figure B-8. Principe de l'Electrospray d'après un schéma de [240 Vinh, 1999].

En Electrospray, l'analyse dépend fortement de la qualité de l'ionisation qui résulte de la stabilité et de la régularité de l'aérosol, mais également de la bonne désolvatation à partir de la solution.

L'efficacité de l'analyse (rendement d'ionisation) va alors directement être impactée par le processus d'électronébulisation. Différents facteurs interviennent dans ce phénomène parmi lesquels la composition du solvant, la nature de l'échantillon, mais aussi les paramètres géométriques de la source d'ionisation. La source Electrospray disposée sur ces appareillages a été conçue de manière à optimiser ce processus, tout en favorisant le transfert des espèces chargées de la source à l'analyseur par un jeu de lentille permettant de s'affranchir efficacement de la présence des autres espèces (molécules neutres).

1.2.2. Les analyseurs

L'analyseur associé à la source ESI a un rôle important car il va déterminer d'une part les performances de la technique (gamme de détection, sensibilité, résolution), mais il va également impacter directement les analyses de spectrométrie de masse en tandem puisque c'est dans cette partie de l'appareillage que se joue la fragmentation des espèces ciblées. Dans ce contexte, les associations ESI-triple quadripôle et ESI-Hydrure Quadripôle/Temps de vol ont été utilisées pour effectuer le séquençage de peptides.

1.2.2.1. Quadripôle et Triple quadripôle

Le quadripôle est un analyseur qui utilise la stabilité des trajectoires dans un champ électrique oscillant pour séparer les ions selon leur rapport m/z . Pour ce faire, il est constitué de quatre électrodes parallèles, de section cylindrique ou hyperbolique, qui sont soumises deux à deux à des potentiels. Ces potentiels, qui résultent de la combinaison d'une tension continue et d'une tension alternative, créent un champ électrique radial qui va influencer le trajet des ions circulant entre les quatre électrodes. Les trajectoires oscillantes obéissent aux équations de Mathieu. Il faut retenir que selon les valeurs des tensions, les ions vont alors avoir soit une trajectoire stable, auquel cas ils pourront passer à travers l'analyseur et être détectés, ou alors se trouver dans des régions instables, et dans ce cas ils seront collectés par le barreau dont la charge est opposée à la leur. Pour chaque rapport m/z , une zone de stabilité peut être définie, ce qui permet d'effectuer des balayages pour éjecter séquentiellement les ions les uns après les autres en fonction leur rapport m/z .

La source ESI a dans notre cas été utilisé en association avec un simple quadripôle, et également à un analyseur composé de deux quadripôle en série (triple quadripôle, QqQ). Comme illustré sur la **Figure B-9**, le triple quadripôle consiste en l'association de deux analyseurs quadripolaires en série séparés par une cellule de collision qui est constituée par un hexapôle. En spectrométrie de masse, les ions formés dans la source sont triés dans le premier quadripôle puis continuent leur trajet jusqu'au détecteur en étant simplement focalisés pendant leur transfert à travers les deux autres systèmes. En spectrométrie de masse en tandem, le premier quadripôle permet de sélectionner les

ions précurseurs (ou ion parents) avec un rapport m/z donné parmi l'ensemble des espèces chargées produites en source. Un avantage du quadripôle utilisé comme filtre de masse par rapport à d'autres systèmes de sélection d'ion réside dans la précision de la fenêtre de sélection. Il est par exemple possible de sélectionner un des ions du massif isotopique. Ces ions sont ensuite fragmentés dans la cellule de collision remplie de gaz inerte (argon). Le second quadripôle permet ensuite de trier les ions fragments (ou ions fils) qui vont ensuite atteindre le détecteur.

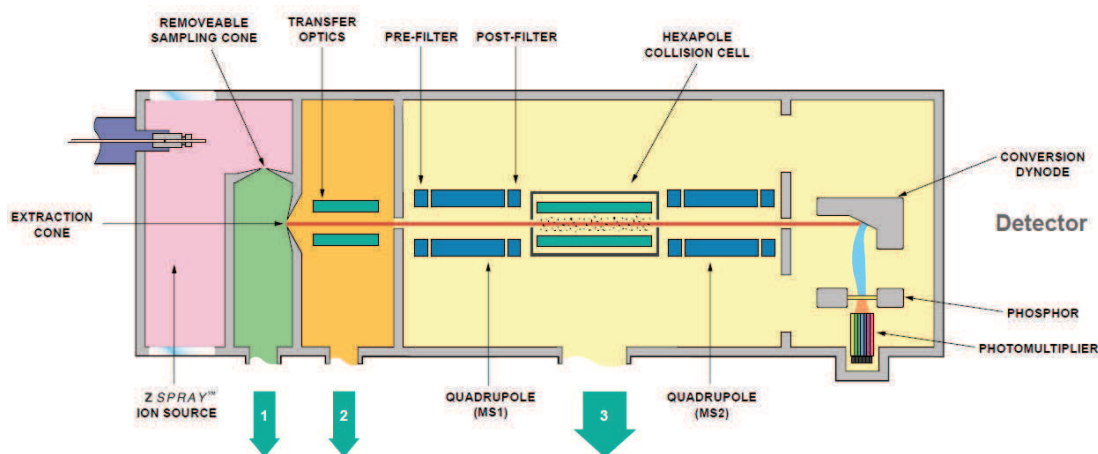


Figure B-9. Schéma du spectromètre de masse ESI-QqQ (QUATTRO Micro 1).

Si le quadripôle se révèle moins sensible et moins résolutif que d'autres analyseurs, il présente des avantages intéressants qui se traduisent par une efficacité de collision et de transmission des ions lorsqu'il est utilisé comme cellule de collision. Ainsi, l'association de trois quadripôles en série (configuration triple quadripôle), permet l'utilisation de plusieurs modes d'acquisition parmi lesquels le mode MRM, pour Multiple Reaction Monitoring, très utilisé dans le cadre d'analyses quantitatives. Ce mode permet en effet de suivre simultanément les transitions entre un ion précurseur d'un rapport m/z donné et un des ions fragments qui lui sont associés. De part cette double sélectivité, ce mode de balayage présente une grande sensibilité et c'est encore aujourd'hui la technique de choix pour développer des approches de quantification de petites molécules organiques mais aussi de petits peptides en protéomique.

1.2.2.2. Hybride Quadripôle/Temps de vol (Q-TOF)

Tel que présenté en **Figure B-10**, cet appareil hybride est constitué d'un premier analyseur quadripolaire, d'une cellule de collision (hexapôle) et d'un analyseur à temps de vol. L'association des deux analyseurs permet de combiner les performances du temps de vol (sensibilité, résolution et rapidité de détection) avec l'efficacité de la mise en œuvre de la MS/MS apportée par les analyseurs quadripolaires. En spectrométrie de masse, le premier quadripôle sert alors uniquement de guide d'ions et le temps de vol est utilisé comme analyseur. Les hybrides Q-TOF permettent donc de travailler avec une sensibilité et une résolution bien supérieure à celle obtenue avec un triple quadripôle (pour des spectromètres de masse de même génération). L'avantage du TOF se traduit

aussi à travers la possibilité d'enregistrer tout les ions produits sans recourir à un balayage tel qu'il existe dans le quadripôle. En spectrométrie de masse en tandem, le quadripôle est utilisé comme un filtre de masse qui permet de sélectionner les ions précurseurs. Les ions sont ensuite fragmentés dans l'hexapôle, puis analysés dans le temps de vol. Ces appareillages combinent une bonne sélection de l'ion précurseur, l'efficacité de collision, de transmission des ions et une bonne résolution des ions fragments.

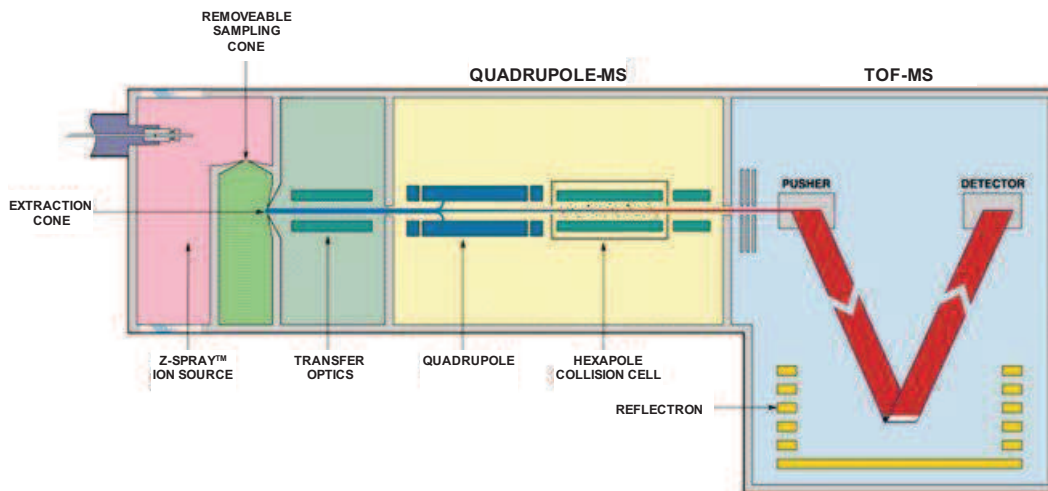


Figure B-10. Schéma du spectromètre de masse ESI-QqTOF (QToF 1 Waters).

1.2.1. Méthode d'activation disponible

La spectrométrie de masse en tandem repose sur le principe de dissociation par un apport d'énergie d'ions stables sélectionnés. Tous les appareillages de spectrométrie de masse utilisant la source d'ionisation ESI ont en commun d'utiliser le procédé d'activation des ions le plus classique, à savoir la collision avec un gaz chimiquement inerte, l'hélium, l'azote ou plus souvent l'argon, appelé Collision-Induced Dissociation (CID) ou encore Collisionally Activated Dissociation (CAD).

Les ions précurseurs sont autorisés à entrer en collision avec les molécules neutres. Il faut distinguer les processus d'activation dits basse énergie, qui impliquent de nombreuses collisions rehaussant de façon progressivement le contenu de l'énergie interne de l'ion précurseur. A l'inverse, les processus dits de haute énergie induisent peu de collisions qui chacun génère une très forte augmentation du contenu énergétique de l'ion sélectionné. Dans la collision, une partie de l'énergie cinétique est convertie en énergie interne ce qui entraîne une rupture de liens covalents et la fragmentation de l'ion moléculaire en sections plus petites, des ions fragments, qui sont ensuite triés selon le rapport m/z et détectés. A la différence de la technique MALDI-TOF/TOF, la mise en œuvre de la fragmentation des ions sur les spectromètres de masse couplés à l'ESI est accomplie par des processus CID de basse énergie. En effet, l'énergie de collision mise en jeu n'est "seulement" que de l'ordre de 20-200 eV, soit 100-1 000 fois inférieure à celle utilisée dans une technique MALDI-TOF/TOF. Contrairement à la méthode MALDI-LIFT-TOF/TOF, où la fragmentation est induite

uniquement par la modulation de la puissance du laser, la fragmentation repose sur la valeur de l'énergie de collision (de la même façon que pour le MALDI-CID-TOF/TOF). Il est effectivement possible d'augmenter l'énergie cinétique des ions sélectionnés en ajustant la différence de potentiel dans la cellule de collision. De fait, la nature des fragments observés pour le séquençage de peptide ainsi que leurs abondances peut être différente entre les deux techniques.

CHAPITRE II. SELECTION DES MATERIAUX INERTES

Comme il a été discuté précédemment au travers de la bibliographie, de nombreux substrats inertes ont été utilisés dans le cadre de développement de méthodologies LDI. Dans notre cas, nous avons expérimenté avec plus ou moins de succès divers supports présentant différentes structurations pour lesquels nous envisagions la possibilité d'accéder à l'analyse directe par désorption/ionisation laser. Pour cela, nous nous sommes d'une part appuyés sur l'expérience acquise au laboratoire lors de la thèse de N. Shenar (2005-2008) [¹ Shenar, 2008]. D'autre part, nous avons mis en place des collaborations avec des chimistes des matériaux pour tenter d'aboutir à des supports permettant de réaliser notre objectif. Parmi les techniques développées, nous avons choisi de distinguer 2 grandes catégories de support, correspondant à leur physionomie, qui sont présentés soit sous forme de poudre, soit sous forme de surface. Pour chaque catégorie, nous avons classé les substrats selon la structure, la nature, et l'accessibilité du matériau employé (matériau commercial, matériau de synthèse facile à produire, matériau de synthèse nécessitant une technologie spécifique).

II.1. Matériaux type poudre

Les matériaux regroupés sous cette appellation poudre possèdent tous une caractéristique commune. Quelque soit leur nature, leur taille, leur propriété, ils se présentent sous la forme de particules qui peuvent être pesées, mises en suspension et aliquotées. Nous avons choisi de regrouper ces substrats car la manipulation du matériau est un point clef en LDI. En effet, pour un matériau qui se présente sous une structure type poudre, on peut envisager une utilisation directe du substrat en tant que matrice inerte en lieu et place d'une matrice organique conventionnelle en analyse MALDI. Pour cela, le matériau doit satisfaire quelques pré-requis comme d'une part pouvoir être échantillonné, déposé sur la plaque métallique MALDI, et d'autre part adhérer et rester immobilisé à la plaque MALDI quelque soit la manipulation de cette dernière (y compris lors de la mise sous vide de la source). De plus la notion de performance mise à part, un autre point important des méthodologies LDI est la facilité d'obtention du support, qui passe par son élaboration et/ou son coût selon que le support soit synthétique ou commercial. C'est dans cette optique que nous avons sélectionné des supports type poudres qui sont généralement peu coûteux à produire et dont le protocole de fabrication est maîtrisé et reproductible. Dans certaines publications, la communauté fait même parfois appel à la dénomination "low-cost" pour qualifier ces supports.

A travers la bibliographie détaillée dans le premier chapitre, différents matériaux ont été fréquemment utilisés en tant que support à la désorption/ionisation laser pour leurs différentes propriétés. Parmi ceux là, nous avons choisi d'en étudier principalement deux : le silicium et le titane. L'avantage d'utiliser ces deux matériaux réside en le fait qu'ils sont accessibles commercialement

sous leur forme la plus simple (oxydée) à un faible coût et qu'ils sont également à la base de matériaux plus élaborés de part leur chimie relativement connue et maîtrisée.

II.1.1. Produits commerciaux

II.1.1.1. Gel de silice (SiO₂)

Le gel de silice utilisé est un matériau poreux peu coûteux très répandu dans les laboratoires de chimie pour son utilisation dans les séparations chromatographiques. Il se présente sous forme de grain de silice amorphe, formé par des atomes de silicium reliés à des atomes d'oxygène selon un motif tétraédrique, avec des groupements silanol en surface lui conférant un caractère hydrophile marqué. Dans la bibliographie, il a été démontré que le gel de silice pouvait être un support approprié pour la détection de biomolécule en LDI. En effet, il possède une très grande surface spécifique (~500 m²/g), et une forte absorbance dans la gamme UV, qui sont des paramètres indispensables à la désorption ionisation laser assistée par des matériaux inertes. Pour ces raisons, le gel de silice a fait l'objet d'expérimentations approfondies au laboratoire dans la détection de peptides en LDI lors de la thèse précédente [1 Shenar, 2008]. En reprenant les conditions opératoires optimisées (choix du gel de silice, fonctionnalisation de la silice, protocole de préparation, mode de dépôt...), le gel de silice 60 (Gerduran®) a constitué donc non seulement le point de départ de notre étude, mais aussi la référence en technique LDI assistée par des matériaux inertes sous forme de poudres siliciques. Ce matériau se compose de microparticules (63-200 µm) et présente les caractéristiques d'un substrat poreux (pores de 8 ml/g de volume et 6 nm de diamètre).

II.1.1.2. Nanoparticules de dioxyde de titane

Comme il a été déjà été présenté, le dioxyde de titane constitue également un substrat très étudié en tant que support LDI, notamment en raison de ses propriétés d'absorbance en UV déjà décrit dans l'introduction. De la même manière que pour le gel de silice, les particules de dioxyde de titane constituent un matériau facile d'accès puisqu'il est commercial et peu onéreux. Pour réaliser nos études, nous avons utilisé du dioxyde de titane Degussa P-25 sous forme de poudre qui se compose de 80 % de titane anatase et de 20% de rutile. Le diamètre des particules se situe entre 25 nm et 35 nm, et leur surface spécifique est d'environ 55 m²/g.

II.1.2. Substrats synthétiques

Les supports disponibles commercialement et présentant des capacités cohérentes avec les conditions nécessaires à l'analyse LDI ayant pour la plupart été testés, soit au travers de la bibliographie, soit directement au laboratoire, le développement de nouvelles méthodologies est fortement dépendant de la mise au point de supports synthétiques artisanaux ou "home-made".

Les résultats empiriques obtenus ces dernières années pour les analyses LDI nous ont démontré que, en plus de la nature, la structuration du matériau influait fortement sur le rendement d'ionisation. De fait, il était important d'évaluer pour des matériaux de même nature chimique, des structurations et des propriétés physico-chimiques différentes. Logiquement, nous avons opté pour le développement de matériaux à base de silice et de titane puisque ces deux matériaux constituaient des substrats de références dans la bibliographie LDI.

II.1.2.1. Particules de silice

Au travers de la bibliographie, nous avons observé que la présence de pores est un sujet qui fait débat, certains auteurs mentionnant leur nécessité, d'autres affirmant que leur assistance dans le phénomène LDI n'était pas justifiée et qu'ils n'étaient pas indispensables. Pour notre part, nous avons eu l'opportunité de nous faire notre propre avis en comparant au laboratoire des résultats obtenus sur silice poreuse (DIOS et gel de silice [²³⁰ Shenar *et al.*, 2009]), mésoporeuse, et non poreuse (**Table B-1**), pour en conclure que la présence de pore ne nous permettait pas d'améliorer nos performances LDI. Parmi les différents systèmes particuliers de silice utilisés, nous avons choisi de présenter dans ce manuscrit les résultats obtenus à partir d'une silice présentée sous forme de nanoparticules non poreuses.

Description	Synthèse	Modification	Terminaison	Article correspondant
NPs SiO ₂ non poreuses	Sol-gel (Stöber)	/	Si-OH	Article 3
NPs SiO ₂ modifiées avec l'HCCA	Sol-gel (Stöber)	HCCA	Si-HCCE	non publié
NPs SiO ₂ modifiées avec le DHB	Sol-gel (Stöber)	DHB	Si-DHB	non publié
SiO ₂ mésoporeuse	MCM-41	/	Si-OH	non publié
SiO ₂ mésoporeuse modifiées à l'HCCA	MCM-41	HCCA	Si-HCCE	non publié

Table B-1. Poudres de silice synthétiques utilisées comme support LDI dans le cadre de cette thèse

II.1.2.1.1. Nanoparticules de silice non poreuse nues

Afin d'évoluer vers des approches utilisant des matériaux plus structurés, bien que présentés sous forme de poudre, nous nous sommes tournés vers l'utilisation de nanoparticules de silice non poreuses. Pour cela, la méthode proposée par Stöber [²⁴¹ Stöber *et al.*, 1968] nous a permis d'accéder à des particules sphériques monodisperses présentant généralement une surface active relativement importante (300-400 m²/g). La méthode, basée sur le procédé sol-gel, consiste en l'hydrolyse catalysée en milieu ammoniacal du tétraéthoxysilane (TEOS) suivie de la condensation des espèces en solution. Les nanoparticules ont été synthétisées sous l'encadrement du Dr. J-O Durand de

L'Institut Charles Gerhardt de Montpellier (ICGM) conformément à la méthode de synthèse sol-gel décrite dans une publication de Tang [²⁴² Tang *et al.*, 2005]. Le détail de la synthèse est présenté en *Annexe 2*. Les nanoparticules de silice ont ensuite été caractérisées en diffusion dynamique de la lumière (DLS pour Dynamic Light Scattering) et en microscopie électronique à transmission (TEM). Elles présentent une forme sphérique, une distribution monodisperse et une taille comprise entre 100 et 200 nm selon les lots de synthèse. Les résultats LDI obtenus avec l'utilisation de ces nanoparticules de silice non poreuses nues ont fait l'objet d'un article dans lequel sont discutés la mise en œuvre et les performances de la méthode (*Article 3: Silica nanoparticles pre-spotted onto target plate for LDI mass spectrometry analyses of peptides*). Cet article comporte également les données expérimentales correspondant aux caractérisations des nanoparticules effectuées en DLS et TEM.

II.1.2.1.2. Nanoparticules de silice avec greffage et encapsulation de matrice

Dans l'objectif d'améliorer les performances obtenues à partir de nanoparticules nues, nous avons tenté de fonctionnaliser les particules avec des matrices organiques utilisées traditionnellement en MALDI. Pour ce faire, nous avons utilisé trois approches :

- Une première approche d'encapsulation de molécules de matrices, développée par Tang [²⁴² Tang *et al.*, 2005] : cette approche consiste à rajouter les molécules à encapsuler dans le procédé sol-gel pour aboutir à un réseau de silice emprisonnant des molécules organiques. Malheureusement, cette méthodologie ne nous a pas permis d'aboutir à une encapsulation assez efficace. Il n'a pas été possible de s'assurer de la présence de molécules de matrice à l'intérieur des nanoparticules probablement en raison du faible taux d'encapsulation. Malgré tout, les nanoparticules ont tout de même été testées en qualité de matrice LDI,
- Une seconde approche de fonctionnalisation en surface de nanoparticules : pour cela, deux matrices MALDI possédant une fonction acide ont été sélectionnées, l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique et l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque. Nous avons souhaité greffer ces molécules organiques en surface des nanoparticules de silices non poreuses précédemment détaillées en utilisant une synthèse en deux étapes :
 - Une première étape consistant à greffer une fonction amine sur les nanoparticules *via* l'aminopropyltriéthoxysilane,
 - Une seconde étape impliquant les réactifs utilisés en couplage peptidique pour former une liaison amide entre la fonction amine greffée sur les nanoparticules et la fonction acide des molécules de matrice sélectionnées.

Cependant, dans les conditions testées, nous avons observé une importante agglomération des particules de silice lors de la première étape. La seconde étape de synthèse n'a ensuite

pas été concluante. Nous nous sommes alors tournés vers la troisième voie de synthèse envisagée.

- La troisième approche a consisté à fonctionnaliser la molécule de matrice (HCCA ou DHB) par l'aminopropyltriéthoxysilane. Cette entité est ensuite directement introduite dans le protocole de synthèse sol-gel. Ce dernier est ensuite réalisé dans des conditions similaires à celle de la synthèse classique. Le schéma de synthèse est donné en [annexe 2](#). Cette troisième approche nous a permis d'incorporer les matrices organiques HCCA et DHB dans des réseaux de silice. La présence de ces molécules a été mise en évidence en spectrométrie UV, en RMN ^{29}Si et en analyses élémentaires différentielles entre des nanoparticules nues et des nanoparticules modifiées (%C et %N) (résultats non discutés). Les particules ont ensuite été caractérisées en diffusion dynamique de la lumière (DLS pour Dynamic Light Scattering) et en microscopie électronique à transmission (TEM).

II.1.2.2. Nanotubes d'oxydes de titane

Comme il a été mentionné dans l'introduction, la structuration du matériau se trouve être un élément clef dans les performances LDI. Pour preuve, les récents développements proposés sur les matrices inertes LDI font de plus en plus appel aux supports nanostructurés et architecturés tels que les nanofils et les nanotubes. Pour pouvoir établir des comparaisons de performance, nous avons donc souhaité opposer les résultats obtenus à partir des nanoparticules de dioxyde de titane avec un substrat plus élaboré. Pour cela, nous avons utilisé des nanotubes composites de dioxyde de titane/tungstène. Les nanotubes de titanate ont été fournis par le Dr. A. Roemer-Hazane. Ils sont préparés par traitement hydrothermal selon un protocole détaillé en [Annexe 2](#).

II.2. Matériaux type surface

Outre les poudres, une autre méthodologie a consisté en l'utilisation de surfaces, encore appelées puces ou chips dans la bibliographie, comme support à la désorption/ionisation laser. Cette seconde approche présente des avantages différents de l'usage de matériaux type poudre, mais révèle aussi une mise en œuvre plus délicate. De fait, compte tenu du format du support utilisé, une conception différente du système analytique a été envisagée. Les matériaux type surfaces sont des supports rigides, plans avec des dimensions bien définies. Ils possèdent une épaisseur généralement contraignante pour les fixer directement sur une plaque MALDI classique sans modifier trop fortement la distance de vol et donc entraîner une dérive trop importante de la mesure de masse générée. La différence de trajet à parcourir ne pouvait être rattrapée lors de l'étape d'étalonnage de l'appareil. Le but de nos expérimentations étant de pouvoir comparer rigoureusement des méthodes alternatives LDI entre elles et avec la technique MALDI, nous souhaitons garder une méthode d'acquisition commune à toutes nos analyses. Or, un support disposé sur le dessus d'une

plaque classique MALDI impliquerait la mise en place d'une méthode spécifique avec un réajustement complet de tous les paramètres des éléments du trajet des ions. Pour parer à cette problématique, une alternative possible est de mettre à niveau le matériau servant de support à l'analyse en l'incorporant à la plaque MALDI traditionnelle. C'est d'ailleurs la solution employée par le constructeur Bruker qui a mis sur le marché des cibles basées sur des matériaux nanostructurés en utilisant en guise de plaque un dispositif spécifique permettant d'inclure le support NALDI™ dans un logement approprié. Nous avons donc également opté pour cette approche en faisant usiner des cibles MALDI de manière à pouvoir accueillir des supports de différentes dimensions (**Figure B-11**). Ces adaptateurs ont été réalisés par la société Meca Inov' (Rioz) par l'intermédiaire de W.Boireau (Institut Femto-ST).

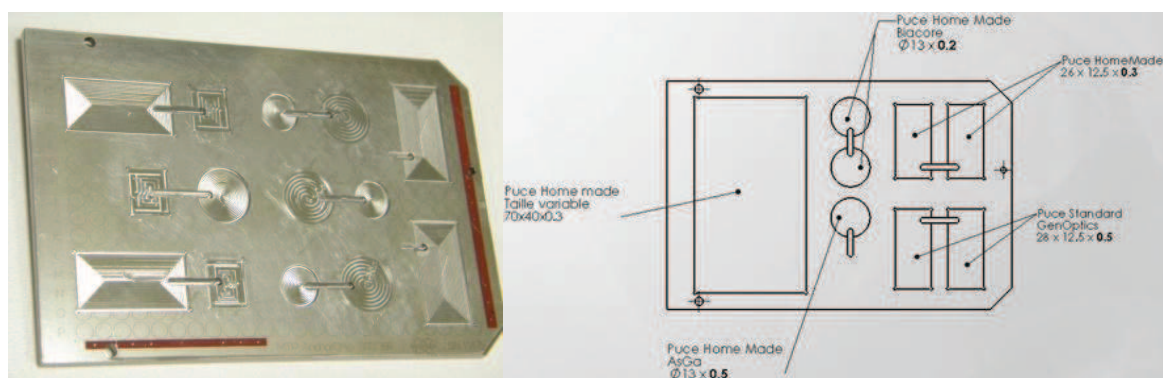


Figure B-11. Photo de l'adaptateur 1 et schéma de l'adaptateur 2 spécialement conçus pour les études LDI.

Des emplacements de géométries et tailles variées ont été creusés par mécanique laser, avec différentes profondeurs permettant de s'adapter au support choisi, afin de respecter la consigne fixée au départ, c'est-à-dire que le support soit au même niveau que le reste de la plaque MALDI.

II.2.1. Support commercial : plaques NALDI™

Les plaques NALDI™ (Nanostructured Assisted Laser Desorption Ionization) constituent la technique référence des méthodes LDI utilisant un substrat inerte. Parmi les supports proposés par les constructeurs ces dernières années (DIOS™ par Waters, QuickMass™ par Shimadzu et NALDI™ par Bruker), il est le seul à être encore commercialisé et donc à être au centre d'investigations dans les recherches LDI. Des illustrations de la cible NALDI™ sont représentées en **Figure B-12**.

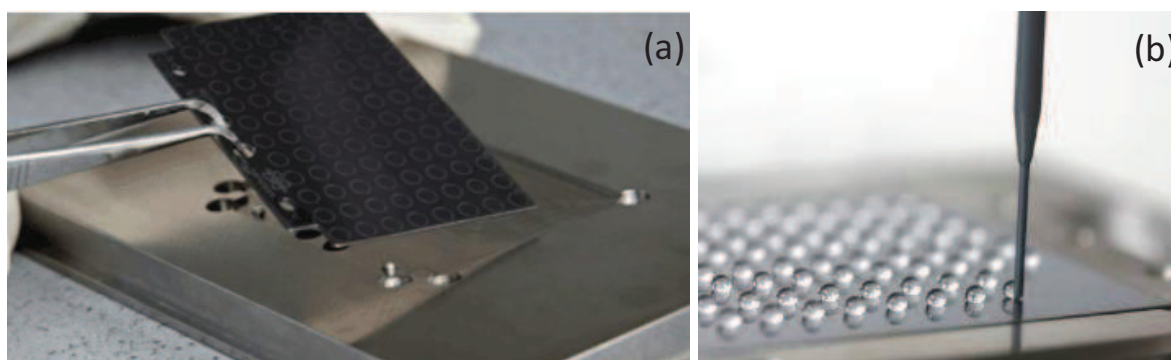


Figure B-12. Photo de (a) la cible NALDI™ et son adaptateur et (b) de dépôts sur la cible NALDI.

Le détail des cibles NALDI™ est discuté dans la partie introduction (**PARTIE A.1.3.2.1.2**). Pour rappel, les cibles NALDI™ sont constituées de nanofils de silicium vraisemblablement fonctionnalisées avec des fonctions perfluorées. Dans l'*Article 4: Investigation of silicon-based nanostructure morphology and chemical termination on LDI-MS performance*, nous avons confronté les performances LDI de ce support commercial avec celle des surfaces synthétiques étudiées.

II.2.2. Surfaces synthétiques

Les nombreux travaux publiés dans la bibliographie des supports inerts ainsi que la commercialisation de la technologie NALDI™ ont démontré toute la compétitivité des supports nanostructurés de silicium pour l'analyse par désorption/ionisation laser. Dans le cadre d'une étroite collaboration avec une équipe de l'Institut d'Electronique de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN) de Lille, nous avons eu l'opportunité d'étudier le potentiel de plusieurs surfaces de silicium pour développer des méthodologies d'analyse LDI. Parmi ces supports, on distingue deux grandes familles :

- Des substrats nanostructurés (NanoSi) préparés selon une approche top-down, par une technique de gravure chimique,
- Des substrats nanostructurés (SiNWs) préparés selon une approche bottom-up, par une technique de croissance ascendante (croissance VLS pour Vapor-Liquid-Solid).

Les deux processus de synthèse ont été brièvement décrits à l'aide des procédés technologiques détaillés dans le manuscrit de thèse de Florian Lapierre [²⁴³ Lapierre, 2011]. L'ensemble des surfaces testées est présenté en **Table B-2**. L'étude du potentiel LDI de ces surfaces a fait l'objet d'une publication dans laquelle sont comparées et discutées les performances obtenues à partir de la surface commerciale NALDI™ et de différentes surfaces synthétiques. Cet article est inséré dans la partie **PARTIE C (Résultats et Discussions)** en tant qu'*Article 4: Investigation of silicon-based nanostructure morphology and chemical termination on LDI-MS performance*. Les protocoles des synthèses sont également détaillés dans l'article.

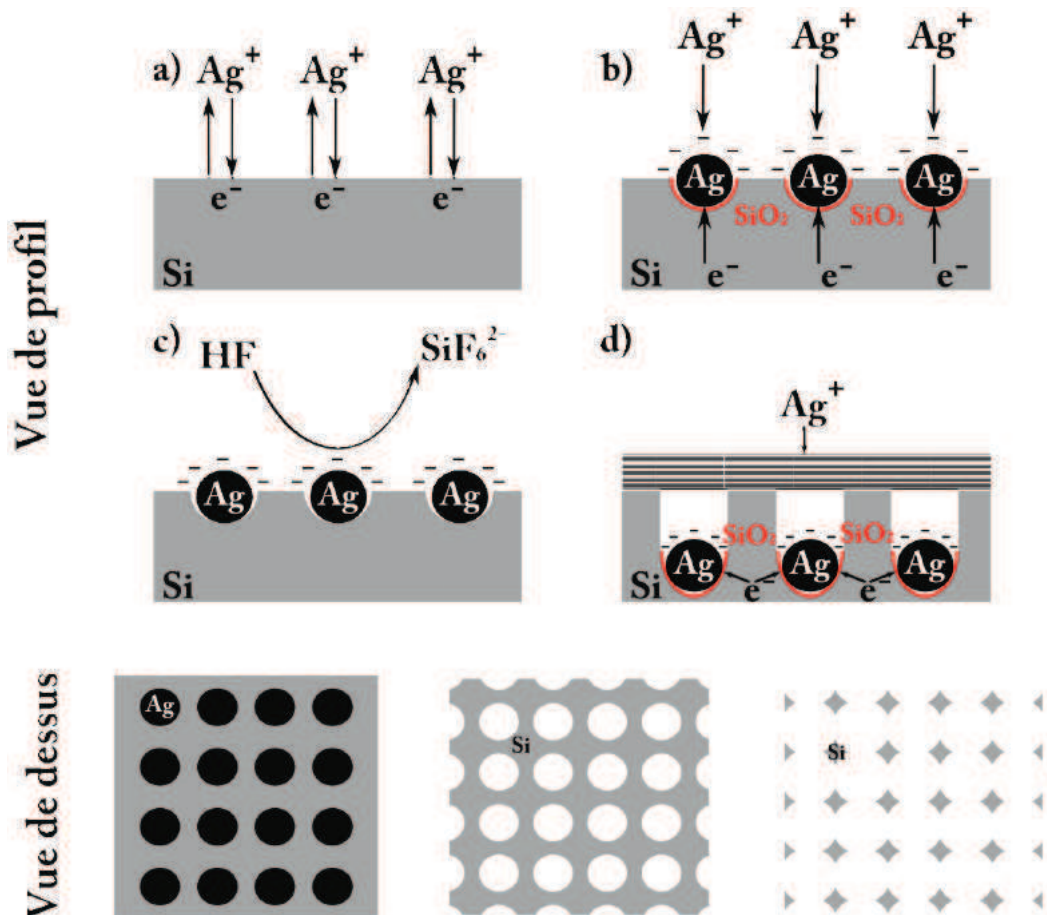
Description	Substrat	Resistivité du substrat	Technique de synthèse	Reactifs	Modification	Terminaison	Traitement	Angle de contact	Article correspondant
NanoSi A - OTS	Si type-p très dopé	0.009-0.01 Ohm.cm	Gravure chimique	HF/AgNO ₃	OTS	CH ₃	UV/Ozone	120-130°	article 4
NanoSi A - OTS	Si type-p très dopé	0.009-0.01 Ohm.cm	Gravure chimique	HF/AgNO ₃	OTS	CH ₃	aucun traitement	160°	non publié
NanoSi A - PFTS	Si type-p très dopé	0.009-0.01 Ohm.cm	Gravure chimique	HF/AgNO ₃	PFTS	CF ₃	UV/Ozone	120-130°	article 4
NanoSi A - PFTS	Si type-p très dopé	0.009-0.01 Ohm.cm	Gravure chimique	HF/AgNO ₃	PFTS	CF ₃	aucun traitement	160°	non publié
NanoSi A - COOH	Si type-p très dopé	0.009-0.01 Ohm.cm	Gravure chimique	HF/AgNO ₃	Undecylenic acid	COOH	aucun traitement	60-80°	non publié
NanoSi A - HCCE	Si type-p très dopé	0.009-0.01 Ohm.cm	Gravure chimique	HF/AgNO ₃	HCCE	HCCE	aucun traitement	0° / 50°	Pas de résultats
NanoSi B - OTS	Si type-p très dopé	0.009-0.01 Ohm.cm	Gravure chimique	NH ₄ F/HNO ₃ /AgNO ₃	PFTS	CF ₃	UV/Ozone	120-130°	articles 4 et 5
NanoSi B - PFTS	Si type-p très dopé	0.009-0.01 Ohm.cm	Gravure chimique	NH ₄ F/HNO ₃ /AgNO ₃	OTS	CH ₃	UV/Ozone	120-130°	articles 4 et 5
NanoSi C - OTS	Si type p	>10 Ohm.cm	Gravure chimique	HF/AgNO ₃	OTS	CH ₃	UV/Ozone	120-130°	non publié
SINWs 1	Si type-p très dopé	0.009-0.01 Ohm.cm	Croissance CVD (VLS)	SiH ₄ 40sccm; 20 min; 500°C; 0,4Torr	OTS	CH ₃	UV/Ozone	125°	article 4
SINWs 2	Si type-p très dopé	0.009-0.01 Ohm.cm	Croissance CVD (VLS)	SiH ₄ 40sccm; 40 min; 500°C; 0,4Torr	OTS	CH ₃	UV/Ozone	125°	non publié
SINWs 3	Si type n	5-10 Ohm.cm	Croissance CVD (VLS)	SiH ₄ 40sccm; 60 min; 500°C; 0,1Torr	carbonisation 520°C + OTS	CH ₃	UV/Ozone	125°	non publié
SINWs 4	Si type n	5-10 Ohm.cm	Croissance CVD (VLS)	SiH ₄ 40sccm; 60 min; 500°C; 0,1Torr	carbonisation 820°C + OTS	CH ₃	UV/Ozone	125°	non publié

Table B-2. Surfaces nanostructurées testées pour des analyses de peptides par LDI.

II.2.2.1. Surfaces nanostructurées de silicium (NanoSi)

Les substrats, dénommés surfaces NanoSi, ont été formés par gravure chimique assistée par métal (HF/AgNO₃). Ce procédé de synthèse consiste à préparer à partir de wafer de silicium vierge des nanostructures de silicium par une approche top-down en plongeant le substrat dans une solution qui va l'attaquer. La formation des nanostructures sont en réalité la conséquence de deux réactions simultanées comme illustré dans la **Figure B-13** :

- Une réduction des ions argent Ag⁺ en nanoparticules d'argent (réaction cathodique) par capture des électrons de la bande de valence du silicium (a). Les nanoparticules d'argent forment un dépôt métallique à la surface du silicium qui entraîne une oxydation excessive du silicium par transfert d'électron (b).
- Une oxydation du silicium (réaction anodique) : le silicium oxydé formé sous la particule est gravé par l'acide fluorhydrique (HF) (c) ou par un mélange de fluorure d'ammonium (NH₄F) et d'acide nitrique (HNO₃). La particule descend dans la cavité formée et le cycle se répète (d).



Ce schéma a été reproduit à partir du manuscrit de thèse de Florian Lapiere "Electromouillage sur diélectrique (EWOD) : Conception et réalisation de dispositifs microfluidiques originaux sur surfaces superhydrophobes"

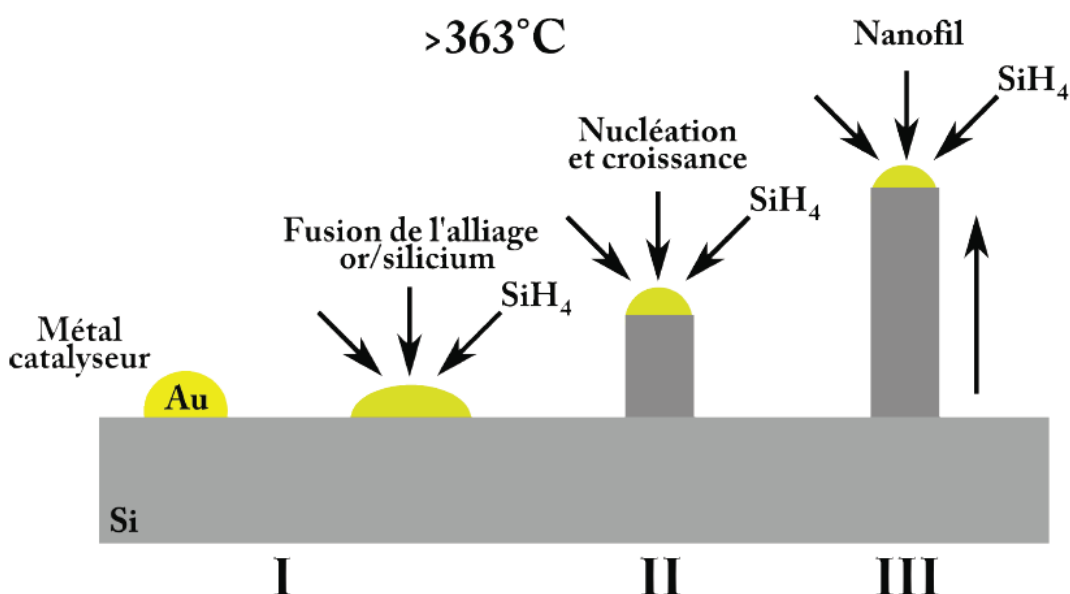
Figure B-13. Schéma de principe de fabrication des nanostructures sur silicium par gravure chimique assistée par métal, reproduit d'après la thèse de Florian Lapiere [243 Lapiere, 2011].

La réaction globale s'écrit : $4 Ag^+ + Si^0 + 6 F^- \rightarrow 4 Ag^0 + SiF_6^{2-}$.

Suite à la création de nanostructures, les surfaces sont ensuite fonctionnalisées et traitées à l'UV/ozone. Les caractéristiques de ces processus en lien avec les méthodologies LDI font l'objet de discussions dans l'[Article 3: Silica nanoparticles pre-spotted onto target plate for LDI mass spectrometry analyses of peptides](#) (NanoSi A et B) et dans l'[Article 5: Laser desorption ionization mass spectrometry of protein tryptic digests on nanostructured silicon plates](#) (NanoSi B). Un schéma résumant le protocole de synthèse et de fonctionnalisation est présenté dans l'[article 5](#) pour les NanoSi B.

II.2.2.2. Nanofils de silicium (SiNWs)

Les nanofils de silicium ont été synthétisés par une approche VLS (Vapor-Liquid-Solid) schématisée en **Figure B-14**. Des nanoparticules sont déposées par évaporation thermique sur un substrat de silicium (I), puis sont chauffées à 500 °C, soit au dessus de leur température eutectique (température de fusion de l'alliage or/silicium). En présence de gaz réactif, le silane (SiH_4), le silicium précipite à l'interface goutte/substrat (II) (phénomène de nucléation du silicium). L'apport en silane permet la croissance progressive des nanofils (III).



Ce schéma a été reproduit à partir du manuscrit de thèse de Florian Lapierre "*Electromouillage sur diélectrique (EWOD) : Conception et réalisation de dispositifs microfluidiques originaux sur surfaces superhydrophobes*"

Figure B-14. Schéma du processus de croissance VLS d'un nanofil de silicium d'après la thèse de Florian Lapierre [²⁴³ Lapierre, 2011].

De la même façon que les surfaces NanoSi, l'utilisation des nanofils de silicium est discuté dans l'[Article 3: Silica nanoparticles pre-spotted onto target plate for LDI mass spectrometry analyses of peptides](#).

CHAPITRE III. ECHANTILLONS MODELES : SELECTION ET SYNTHÈSE

Comme il a été décrit précédemment, l'objectif des ces techniques LDI utilisant comme matrice des substrats inertes consiste à suppléer la matrice organique pour la détection et la caractérisation de petites molécules. Ces analytes, situés dans une gamme de masse inférieure à 1000 Dalton, peuvent être très difficilement analysables en MALDI. Dans le but d'élargir cette zone d'intérêt, nous nous sommes pour notre part intéressés à des molécules présentant des masses inférieures à 2000 Da. Pour cela, différents échantillons de peptides modèles ont fait l'objet d'études approfondies.

III.1. Peptides synthétiques

III.1.1. Préparation des peptides

III.1.1.1. Conception des séquences

Pour élaborer nos séquences peptidiques, plusieurs variables ont été prises en compte :

- La taille des séquences,
- La composition en acides aminés de la chaîne polyamide,
- Le choix des acides aminés en positions terminales,
- La faisabilité des couplages en synthèse sur support solide semi-automatisée.

Tous les peptides que nous avons synthétisés dans le cadre de cette thèse s'échelonnent sur une gamme de masse comprise entre 500 et 1700 Da et sont des peptides dits acides car étant terminés par une fonction acide carboxylique en position C-terminale. Toutefois, d'autres peptides disponibles dans notre peptidothèque ont été utilisés et élargissent cette gamme de masse de 300 à 2000 Da.

Afin de se rapprocher au mieux de peptides naturels et de faciliter un éventuel transfert de méthode à des études peptidomiques/protéomiques, nous avons choisi de synthétiser des peptides mimant des séquences issues de digestion enzymatique (**Figure B-15**). Pour ce faire, deux classes de peptides ont été établies :

- Des peptides mimant une digestion enzymatique à la trypsine : La trypsine est une endopeptidase présente dans le suc pancréatique et qui a pour rôle de rompre les protéines en peptides. Les résidus basiques constituent les sites de reconnaissance de la trypsine qui entraînent une rupture de la liaison amide, formant ainsi des peptides portant une lysine ou une arginine en position C-terminale. Son accessibilité, son coût, et sa capacité à produire des peptides de tailles variées due à la proportion de lysine et d'arginine au sein des chaînes protéiques (~10%) font d'elle l'enzyme la plus couramment utilisée pour les approches protéomiques,

- Des peptides mimant une digestion enzymatique à la Lys-N : la Lys-N est une métalloendopeptidase issue du champignon japonais *Grifola frondosa*. Elle clive les protéines en position N-terminale de la lysine. La Lys-N est une des protéases qui est utilisée en protéomique en complément de la trypsine afin de renforcer les informations de séquence déterminées par cette dernière. Par abus de langage, ces peptides seront dénommés des peptides Lys-N. Le comportement de ces peptides en fragmentation en spectrométrie de masse en tandem a été particulièrement étudié et les résultats ont abouti à une publication. Ce travail est discuté dans la **PARTIE C (Résultats et Discussions)** sous la forme de la publication originelle intitulée *Article 1: Sequencing Lys-N proteolytic peptides by ESI and MALDI tandem mass spectrometry*.

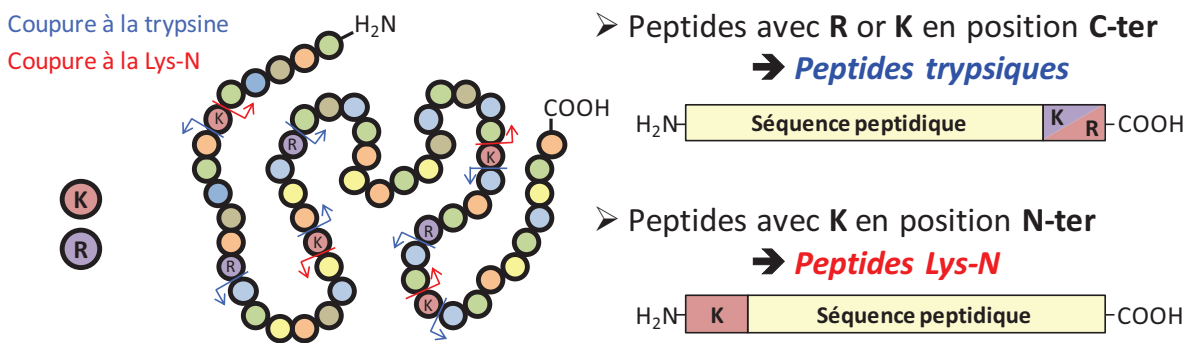


Figure B-15. Représentation schématique des séquences peptidiques "trypsiques" et "Lys-N".

D'autres peptides ont également été synthétisés dans le cadre d'études de séquençage en spectrométrie de masse en tandem pour venir en appoint de séquences déjà disponibles afin de couvrir toute la diversité structurale requise. Ces peptides sont représentatifs en particulier des séquences issus des chaînes C-terminales des protéines n'obéissant à aucune contrainte de digestion et pouvant être constituées d'un enchaînement quelconque d'acides aminés.

Au total, 41 peptides (15 peptides Lys-N et 20 peptides trypsiques, 6 peptides de séquences "aléatoires") ont été synthétisés pendant cette thèse (**Table B-3**) en complément des peptides déjà disponibles au laboratoire. Tous les peptides de la bibliothèque ne pouvant être présentés, chaque article comprend une illustration des séquences peptidiques utilisées dans l'étude correspondante. L'ensemble des séquences peptidiques est récapitulé dans la **Table B-4**.

Peptide	S E Q U E N C E S	M (g/mol)
Lys-N	K G F C L	566,2887
Lys-N	K A F L H G	671,3755
Lys-N	K A F H L G	671,3755
Lys-N	K A F L R G	690,4177
Lys-N	K A F R L G	690,4177
Lys-N	K Y P F E A L	866,4538
Lys-N	K M V N L H I Q	981,5430
Lys-N	K A D F P Q L M V	1047,5423
Lys-N	K E D F P Q L M V	1105,5478
Lys-N	K Y I W L S R A V	1134,6550
Lys-N	K E A H M T I V F C S A	1335,6315
Lys-N	K S W D T L C M A G R F	1413,6533
Lys-N	K W F G M L A D Q A T Y N	1543,7130
Lys-N	K A T C G R V N S A S M Y D A I	1685,7865
Lys-N	K T R Y N G M G E Q W D P D	1695,7311
Trypsique	P I C A K	530,2886
Trypsique	S E G F K	566,2700
Trypsique	F A Q I R	633,3598
Trypsique	D I G L V R	671,3966
Trypsique	T P S S V L K	730,4224
Trypsique	M W A E N K	777,3479
Trypsique	W L I A G D R	829,4446
Trypsique	L G H A P E V R	877,4769
Trypsique	Y D T S I V Q K	952,4865
Trypsique	Y D T S I V Q R	980,4926
Trypsique	C A S H T F L V R	1032,5174
Trypsique	N G F L M C S A L K	1082,5282
Trypsique	V E Y L A S I T L K	1135,6488
Trypsique	G H L P T V S E N A R	1179,5996
Trypsique	A D P N Y H I G E T K	1243,5832
Trypsique	M L Q Y G M F V E R	1272,5994
Trypsique	L E S M G V D F N A N K	1323,6128
Trypsique	A E Q V P L G S Y D T G K	1363,6619
Trypsique	Q L D F G E V L A N T G R	1418,7153
Trypsique	I W D P S N L I A Q P T K	1481,7877
Divers	F P A R V G S	732,3918
Divers	F P A R V G C	748,3690
Divers	F P A R V G Q	773,4184
Divers	F P A R V G E	774,4024
Divers	F P A R V G H	782,4187
Divers	F P A R V G Y	808,4231

Table B-3. Peptides synthétisés dans le cadre de la thèse.

Peptides	Nombre	Categorie	Nombre
		Peptides tryptiques (K/R en position C-ter)	49
		Peptides miscleavages (K/R en C-ter + K/R dans la séquence)	6
C-ter Acide	152	Peptides possédant K ou R dans la séquence	20
		Peptides Lys-N (K en position N-Ter)	15
		Séquences aléatoires	62
C-ter Amide	240		240

Table B-4. Tableau récapitulatif des séquences composant la peptidométhèque interne à l'équipe de spectrométrie de masse.

Pour les peptides tryptiques et Lys-N, nous avons établi les séquences en répartissant de manière aléatoire les 20 acides aminés protéogéniques universels, mais de façon à reproduire globalement les proportions naturelles des classes d'acides aminés retrouvés dans les protéines humaines selon la base de données SwissProt (les acides aminés pyrrolysine et la sélénocystéine n'étant spécifiques qu'à certaines protéines d'organismes particuliers). Cette répartition évite de biaiser le comportement de ces peptides modèles dans les analyses de spectrométrie de masse (acides aminés favorisant l'ionisation) et de spectrométrie de masse en tandem (acides aminés perturbant la fragmentation) (**Figure B-16**).

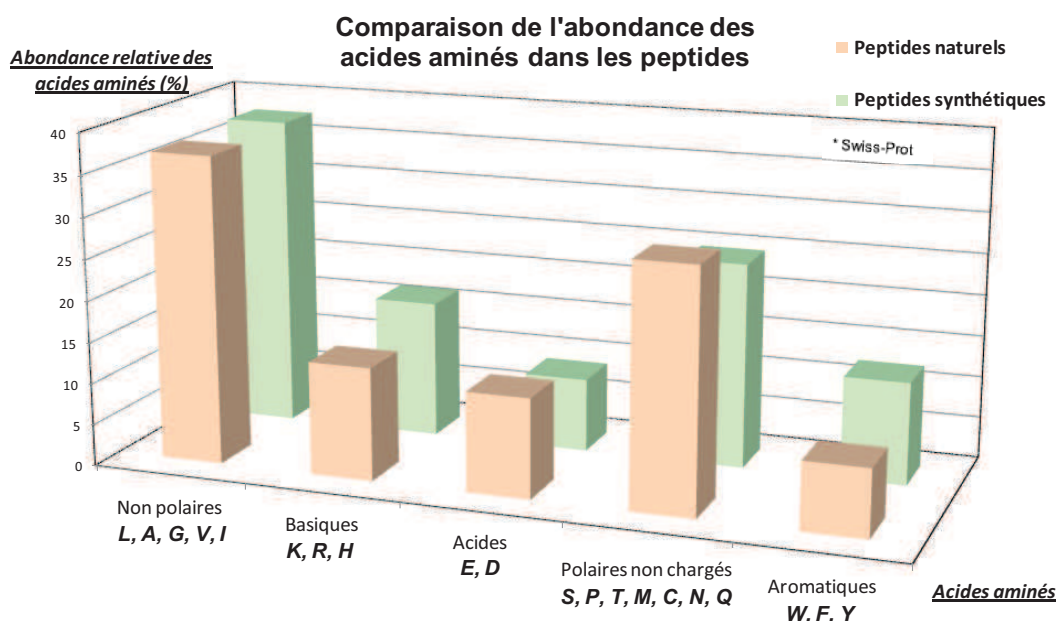


Figure B-16. Occurrences des acides aminés en milieu naturel et dans nos peptides [244 ExPASy].

III.1.1.2. Synthèse sur support solide semi-automatisée

Pour réaliser ces séquences peptidiques, nous avons utilisé la stratégie de synthèse peptidique en phase solide [245 Merrifield, 1963; 246 Stewart *et al.*, 1984] qui permet de simplifier les étapes de purification associées à la synthèse en solution, et ainsi d'automatiser le protocole afin d'accéder à une méthodologie rapide et efficace. La synthèse a été effectuée au sein de l'équipe de l'IBMM "Plate-forme Analyse et Synthèse Automatisée" sous l'encadrement du Dr Pascal Verdié.

Le principe repose sur l'assemblage des acides aminés selon un cycle d'addition qui consiste à construire le peptide de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale (**Figure B-17**). Dans un premier temps, le premier acide aminé prévu en position C-terminale est ancré au bras espaceur d'une résine *via* sa fonction acide carboxylique, puis les acides aminés de la séquence peptidique déterminée sont associés les uns après les autres, suivant un jeu de déprotection et de couplage par activation des fonctions réactives. Une fois la séquence réalisée, le peptide est alors décroché de son support et récupéré en phase homogène. Une analyse par chromatographie liquide haute

performance (HPLC) couplée aux méthodes de détection UV et de spectrométrie de masse (ESI-Q) est ensuite nécessaire pour évaluer les différentes espèces en présence dans l'échantillon. Elle permet également de déterminer le temps de rétention des peptides souhaités, afin de pouvoir mettre en place la méthode de purification par HPLC-MS préparative.

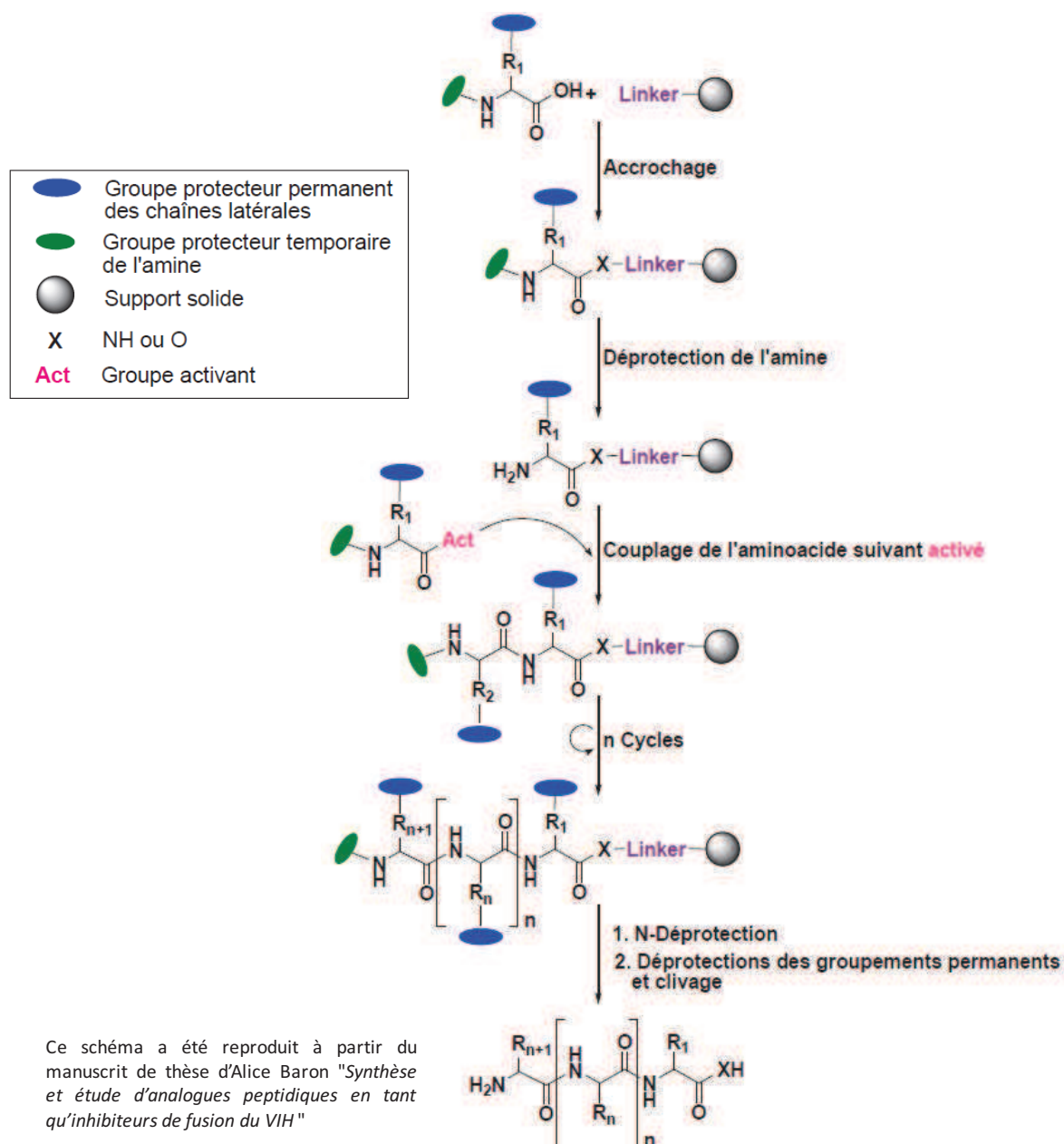


Figure B-17. Schéma du principe de la synthèse sur phase solide, d'après [247 Baron, 2010].

Il faut préciser que certains enchaînements d'acides aminés peuvent être difficiles à réaliser. Les séquences conçues pour la synthèse ont été ajustées à l'aide d'un logiciel qui permet de visualiser les enchaînements difficiles par l'observation de succession d'acides aminés hydrophobes. Dans notre cas, l'ordre des acides aminés dans une séquence donnée n'étant pas un facteur déterminant à l'intérieur du peptide (mis à part les positions N- et C-terminales), nous avons pu le modifier quand le couplage se révélait trop délicat à mettre en œuvre. Le protocole détaillé de la synthèse est présenté en *Annexe 3*.

III.1.1.3. Contrôle de la synthèse par HPLC-UV-MS et purification sur HPLC-MS préparative

Dans un premier temps, les peptides synthétisés sont tout d'abord analysés en chromatographie liquide haute performance (HPLC, Waters Alliance 2695) couplée à la détection UV (Waters 2489) et à la spectrométrie de masse (ESI, Waters ZQ). Les réglages des équipements sont listés dans l'[Annexe 1](#). Afin de s'assurer de disposer d'échantillons modèles d'une grande pureté, les peptides de synthèse sont ensuite purifiés sur un système d'autopurification LC/MS (Waters, ZQ). Le contrôle de la collection des fractions est effectué sur les ions monochargés et dichargés. Les paramétrages sont présentés en [Annexe 1](#).

III.1.1.4. Stockage et conditionnement des échantillons

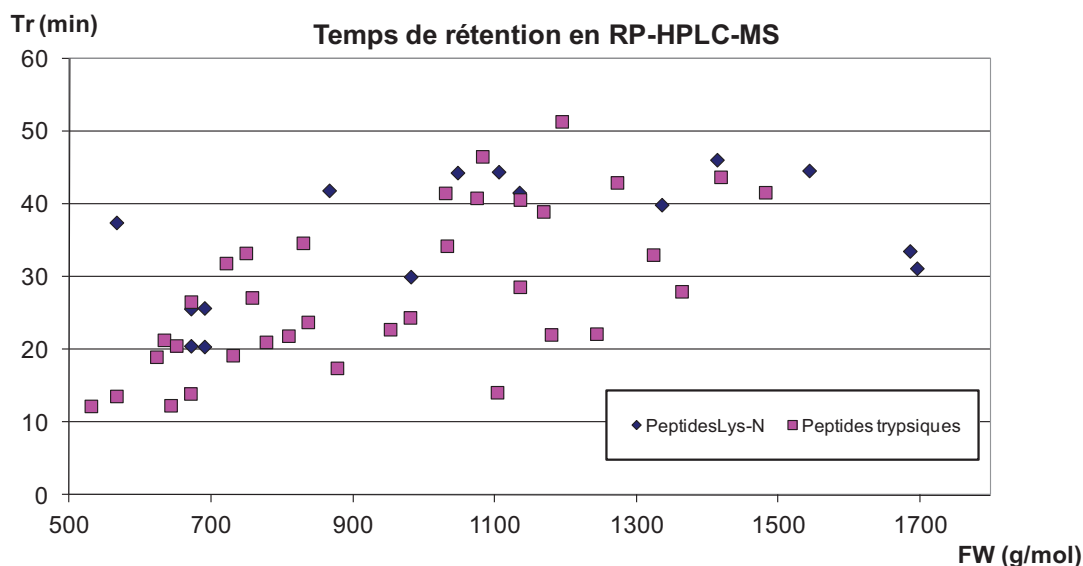
L'utilisation des peptides en spectrométrie de masse en tant qu'échantillon impose la solubilisation dans des solvants organiques miscibles à l'eau. Toutefois, garder des peptides en solutions entraîne à plus ou moins long terme une dégradation du peptide, notamment pour les peptides possédant les résidus s'oxydant facilement, tel que la méthionine ou le tryptophane. Afin de conserver les peptides, tous les échantillons sont lyophilisés à la suite de la synthèse et sont conservés sous forme solide dans des piluliers. Ainsi, pour chaque utilisation, les peptides peuvent être utilisés sous forme de solutions fraîches.

III.1.2. Evaluation du caractère hydrophobe des séquences

Comme il a déjà été discuté, les séquences peptidiques conçues se composent de toute la diversité des acides aminés naturels. Si chaque acide aminé a un caractère hydrophobe ou hydrophile propre bien établi, induit par sa chaîne latérale, il est difficile de prédire l'hydrophobie d'un peptide. En effet, plusieurs paramètres vont intervenir. En plus de sa structure primaire (composition chimique en acides aminés, taille du peptide), la structure secondaire va rendre certains sites confinés dans le repliement de la chaîne peptidique, et d'autres plus accessibles aux solvants et aux réactifs. Cela va donc influencer sur le caractère du peptide vis-à-vis de son environnement. Avoir conscience du caractère hydrophobe du peptide est une information importante car elle permet d'une part de confirmer la pluralité des échantillons conçus et synthétisés pour notre étude et d'autre part, d'établir d'éventuelles corrélations entre ce caractère hydrophobe/hydrophile des séquences et des observations expérimentales en LDI.

Pour évaluer l'hydrophobie des peptides synthétisés qui ont été utilisés dans le cadre des études LDI, les séquences tryptiques et Lys-N ont été injectées en chromatographie liquide haute performance phase inverse (RP-HPLC) couplée à la détection UV et à la spectrométrie de masse. Pour pouvoir séparer correctement la diversité des séquences peptidiques, un gradient linéaire de 1% à 80%

d'acétonitrile dans l'eau (contenant 0,1% d'acide formique) est appliqué en 120 minutes (le protocole détaillé est présenté en [Annexe 1](#)). A partir des chromatogrammes, on établit alors un graphique, présenté en **Graphe B-1**, regroupant l'ensemble des temps de rétention mesurés pour chaque peptide. Ainsi, nous pouvons évaluer comparativement le caractère hydrophobe des séquences réalisées et s'assurer de leurs diversités.



Graphe B-1. Graphique des temps de rétention des peptides établis par RP-HPLC.

D'après ce graphique, nous pouvons affirmer disposer d'échantillons suffisamment hétérogènes pour nos études de détection et caractérisation de peptides en spectrométrie de masse. En effet, suivant la masse molaire et la composition en acides aminés, les séquences peptidiques réalisées couvrent un domaine d'hydrophobie assez large selon les temps de rétention bien distincts observés. En particulier, pour des peptides de même masse, des différences importantes de temps de rétention ont été obtenues, montrant des caractères hydrophobes éloignés.

III.2. Réalisation de mélanges artificiels de peptides trypsiques

L'analyse de peptides purs permet d'évaluer les performances d'une méthode en termes de sensibilité, de répétabilité/reproductibilité, et de robustesse. Cependant, l'analyse de tels échantillons ne concerne que peu de domaines. Dès lors que l'on s'intéresse à des échantillons chimiques non purifiés, des extraits naturels et des milieux biologiques, les problématiques analytiques sont souvent toutes autres et la multiplicité des molécules dans un échantillon peut vite perturber l'efficacité d'une technique. Pour estimer les réelles capacités de méthodologies développées en LDI et juger de leur aptitude à permettre une analyse fidèle d'un échantillon, il est donc indispensable d'évoluer vers des échantillons plus complexes, notamment dans le but de prendre en compte les problématiques de discrimination spectrale qui peuvent être un phénomène prépondérant en spectrométrie de masse. De plus, l'introduction d'un milieu chimique ou biologique

complexe peut être un obstacle à la caractérisation puisque qu'en plus de la détection en spectrométrie de masse, c'est le séquençage par spectrométrie de masse en tandem qui peut s'en trouver affecté. C'est dans ce but que nous avons réalisé des mélanges artificiels de peptides tryptiques. A partir de peptides tryptiques déjà utilisés dans les analyses de peptides seuls, nous avons préparé 7 mélanges (A, B, C, D, E, F et G) comprenant chacun 5 peptides, soit au total 35 peptides, distribués de manière à couvrir la gamme de masse la plus large possible dans chaque mélange tout en ayant une répartition homogène des séquences (**Table B-5**). Les peptides de chaque mélange se trouvent dans des proportions équimolaires et les concentrations de chaque mélange varient selon l'étude.

Mélange	Peptide	S E Q U E N C E	Mw mono. (g/mol)
Mix A	A1	P I C A K	530,2886
	A2	D I G L V R	671,3966
	A3	W L I A G D R	829,4446
	A4	L M Y V H W V K	1074,5684
	A5	W G V Y A P L F D K	1194,6073
Mix B	B1	S E G F K	566,27
	B2	S W A M V K	720,3628
	B3	Y I C P A D R	836,385
	B4	N G F L M C S A L K	1082,5282
	B5	A D P N Y H I G E T K	1243,5832
Mix C	C1	V T E F K	622,3326
	C2	T P S S V L K	730,4224
	C3	L G H A P E V R	877,4769
	C4	L M Y V H W V R	1102,57741
	C5	M L Q Y G M F V E R	1272,5994
Mix D	D1	F A Q I R	633,3598
	D2	S W A M V R	748,3698
	D3	Y D T S I V Q K	952,4865
	D4	P G A H I W E A G A K	1135,5774
	D5	L E S M G V D F N A N K	1323,6128
Mix E	E1	A G V D G P K	642,3336
	E2	A V G K K K K	757,5173
	E3	Y D T S I V Q R	980,4926
	E4	V E Y L A S I T L K	1135,6488
	E5	A E Q V P L G S Y D T G K	1363,6619
Mix F	F1	V T E F R	650,3387
	F2	M W A E N K	777,3479
	F3	A F I S V G P L A R	1029,597
	F4	G N G Q I V F H A A R	1168,6101
	F5	Q L D F G E V L A N T G R	1418,7153
Mix G	G1	A G V D G P R	670,3398
	G2	Y I C P A D K	808,3789
	G3	C A S H T F L V R	1032,5174
	G4	G H L P T V S E N A R	1179,5996
	G5	I W D P S N L I A Q P T K	1481,7877

Table B-5. Composition des 7 mélanges de peptides tryptiques.

III.3. Digestats tryptiques de protéines

Après avoir validé l'applicabilité des méthodologies LDI à l'analyse de mélanges complexes de peptides, mais néanmoins artificiels, l'étape suivante se trouve être logiquement l'analyse de digestats issus de protéines modèles. En effet, si le but premier de cette thèse est de mener étape par étape le développement des méthodologies LDI pour l'analyse de petites molécules ciblées et connues, leur application en protéomique constitue un objectif, certes ambitieux, à envisager pour l'avenir. Pour cela, l'approche Bottom-up, basée sur l'analyse de peptides protéolytiques obtenus par digestion enzymatique, impose la capacité d'une méthode qui permet non seulement l'analyse de mélanges complexes, mais aussi issus de milieux complexes. Contrairement à des mélanges artificiels solubilisés dans des solvants purs, les digestats de protéines sont issus d'échantillons qui ont subi des changements de milieu (solvant, pH, présence de sel) et qui, même s'ils ont été purifiés, peuvent comporter des traces de ces traitements qui gêneraient potentiellement la détection. Par ailleurs, dans nos mélanges artificiels, nous n'avons pas considéré un phénomène relativement fréquent lors des digestions enzymatiques, à savoir les peptides résultant de "miscleavage". Il est donc important de vérifier si la présence de ces peptides issus de digestions incomplètes influe sur la détection dans les méthodes LDI développées.

Pour ce faire, 4 protéines ont été choisies pour évaluer les capacités des méthodes LDI : le Cytochrome C (12 kDa), la β -Caséine (24 kDa), l'albumine de sérum bovin (BSA, 66 kDa) et le fibrinogène (340 kDa). Si nous avons utilisé auparavant deux catégories de peptides synthétiques mimant des séquences protéolytiques, à savoir des peptides Lys-N et des peptides tryptiques, nous avons fait le choix de n'utiliser que la trypsine comme enzyme digestive. En effet, la Lys-N est une enzyme onéreuse et nous avons souhaité valider dans un premier temps les méthodologies LDI développées avec la trypsine, qui était disponible au laboratoire. Les 4 protéines ont subi une digestion enzymatique classique à la trypsine, détaillée ci-dessous, pour produire 4 digestats.

La Trypsine est solubilisée dans un tampon PBS (phosphate buffer salin) à la concentration de 0,1mg/ml.

Les protéines sont solubilisées dans un tampon ABC (Ammonium bicarbonate) 0.05M pH 8, à la concentration de 0,1mg/ml.

La digestion des protéines est effectuée en mélangeant la solution de trypsine et les solutions de protéines (Enzyme/Substrat (1/9 ; v/v)), pendant 18h, à 37°C. 1 μ L d'acide formique est ajouté à la solution pour arrêter la digestion.

La purification des digestats de protéine est effectuée par protocole ZipTip C₁₈.

- Les échantillons sont aliquotés sous des volumes de 10 μ L,
- Mouillage de la colonne dans une solution CH₃CN/H₂O (60/40) 0,1% TFA,
- Conditionnement de la colonne dans une solution H₂O, 0,1% TFA,

- Chargement de la solution échantillon sur la colonne,
- Lavage de la colonne (H₂O, 0,1% TFA),
- Elution des peptides (CH₃CN/H₂O (60/40) 0,1% TFA).

PARTIE C. *RESULTATS ET DISCUSSIONS*

"Que la stratégie soit belle est un fait, mais n'oubliez pas de regarder le résultat."

Winston Churchill

CHAPITRE I. SEQUENCAGE DE PEPTIDES EN MALDI-TOF/TOF ET ESI-Q/TOF

I.1. Introduction

Le séquençage peptidique fait l'objet de recherches importantes débutées depuis les développements des outils analytiques permettant l'observation de phénomène de fragmentation en spectrométrie de masse. Une bibliographie très riche est donc disponible sur ce sujet. Le but de cette introduction n'est pas de donner une bibliographie exhaustive qui sortirait du cadre imparti, mais de cibler les articles incontournables sur lesquels sont basés les fondements du séquençage peptidique en spectrométrie de masse.

Les premières études, développées notamment par Roepstorff [²⁴⁸ Roepstorff *et al.*, 1984] et Biemann [²⁴⁹ Biemann, 1988], concernaient la mise en œuvre des fragmentations hautes énergies par la technique d'ionisation FAB et les secteurs magnétiques. De ces expériences a d'ailleurs été fondée la nomenclature des fragments issus de la rupture du squelette peptidique et des chaînes latérales qui sera expliquée plus tard dans ce chapitre. Dans les années 90, suite à l'analyse d'un grand nombre de séquences connues et inconnues, différents processus de fragmentations ont été proposés pour expliquer les ions obtenus. Ils ont été résumés en 1995 par Papayannopoulos [²⁵⁰ Papayannopoulos, 1995]. La démocratisation des techniques d'ionisation douces, en particulier l'Electrospray, et des analyseurs associés a ensuite suscité un intérêt croissant pour appréhender les mécanismes mis en jeu. En 2000, un numéro spécial du *Journal of Mass Spectrometry* a même été consacré à la fragmentation peptidique en spectrométrie de masse en tandem, démontrant tout l'intérêt de la nécessité d'une meilleure compréhension de ces phénomènes se déroulant en phase gazeuse [²⁵¹ Cooks *et al.*, 2000]. Au cours des années 2000, l'avènement des études protéomiques se basant sur le séquençage de peptides a motivé les nouveaux travaux, notamment afin d'améliorer les logiciels d'interprétations de données (SEQUEST, Mascot, PEAKS ...). Les études récentes, qui concernent essentiellement le séquençage basse énergie, ont ensuite été détaillées dans une revue réalisée par Paizs en 2005 [²⁵² Paizs *et al.*, 2005]. Cette revue explicite en détail les mécanismes de fragmentation multiples qui découlent du modèle du proton mobile appréhendé dans un premier temps par Wysocki [²⁵³ Jones *et al.*, 1994]. Depuis lors, de très nombreux articles sont parus, tant d'un point de vue théorique (mise en évidence de la structure des ions en phase gazeuse par modélisation moléculaire et études spectroscopiques) que d'un point de vue statistique (accès à de nombreuses séquences issues de digestions de protéines en protéomique). A titre d'illustration, le *Journal of American Society for Mass Spectrometry* a fait paraître en 2008 et en 2010 des numéros spéciaux consacré à ces derniers développements [²⁵⁴ Paizs *et al.*, 2008; ²⁵⁵ Brodbelt, 2010]. Encore aujourd'hui, la fragmentation de peptides en spectrométrie de masse fait l'objet de recherches substantielles, comme en témoignent les récentes interventions orales sur le sujet à l'International

Mass Spectrometry Conférence en 2012. Cet engouement pour la fragmentation peptidique est aussi en partie dû aux récents développements des appareillages proposant des méthodes d'activation permettant d'accéder à de nouvelles informations de séquences.

I.2. Méthodes d'activation

Comme il a déjà été discuté dans la partie *Matériels et Méthodes*, le principe de la spectrométrie de masse en tandem repose sur la mise en œuvre d'un mécanisme d'activation qui consiste en l'augmentation de l'énergie interne des ions pour les amener à leur fragmentation. Plusieurs méthodes existent pour activer et fragmenter ces ions précurseurs (ou ions parents) conduisant à différentes voies de fragmentation. Dans le cadre de cette thèse, il ne sera discuté que les technologies pratiquées. Les méthodes d'activation utilisées sont regroupées sous deux mécanismes énergétiques différents :

- Les fragmentations à basse énergie (quelques eV) induites en CID basse énergie, réalisées sur les appareillages ESI-QqQ et ESI-Q-TOF,
- Les fragmentations à haute énergie (quelques keV) possibles sur les appareillages MALDI-LIFT-TOF/TOF et MALDI-CID-TOF/TOF.

En séquençage peptidique, les fragmentations à basse énergie entraînent principalement les ruptures des liaisons amides de la chaîne peptidique. Avec un mécanisme à plus haute énergie, il est possible de dissocier également les chaînes latérales portées par les acides aminés qui constituent la séquence. Ceci permet par exemple de différencier deux acides aminés isobariques, telles que la leucine et l'isoleucine, ou de distinguer deux acides aminés dont les masses molaires seraient proches si la résolution du spectromètre ne le permet pas. Cependant, dans la pratique, les ions issus de ces mécanismes à haute énergie dans les technologies TOF/TOF ne sont pas majoritaires. Les deux mécanismes d'activation ne conduisent donc pas à des spectres totalement opposés, mais des différences peuvent néanmoins être observées. Il a donc été logique de mener en parallèle les deux méthodes de fragmentation pour étudier nos peptides synthétiques.

I.3. Fragmentation des peptides - Modèle du proton mobile

Comme illustré dans le schéma de synthèse des peptides (**Figure C-1**), ces molécules consistent en un enchaînement d'acides aminés, liés entre eux par des liaisons amides (ou peptidiques). En spectrométrie de masse en tandem, les peptides se fragmentent selon le modèle du proton mobile, décrit par Paizs [²⁵² Paizs *et al.*, 2005]. Dans ce modèle, la protonation est induite par un proton mobile capable de migrer le long de la chaîne peptidique et d'induire les ruptures des liaisons amides.

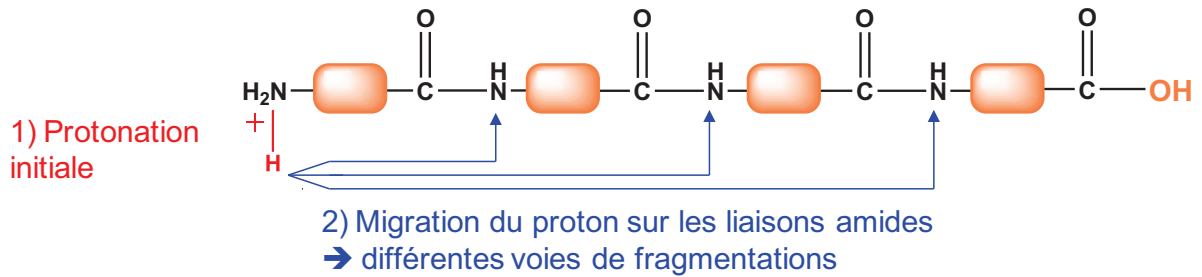


Figure C-1. Modèle du proton mobile d'après [252 Paizs *et al.*, 2005].

Le modèle du proton mobile permet ainsi de prédire les différentes voies de fragmentation des peptides en compétition. Comme mentionné, en CID basse ou haute énergie, tout comme dans la technologie LIFT, les ruptures des liaisons amides forment les fragmentations majoritaires. La rupture de cette liaison va alors pouvoir entraîner la formation de deux entités et induira selon la position du proton :

- Un ion conservant la partie N-terminale de la séquence,
- Un ion conservant la partie C-terminal de la séquence.

Pour les identifier, une nomenclature a été proposée par Roepstorff et Fohlman [248 Roepstorff *et al.*, 1984]. Il faut mentionner qu'elle a été complétée par Biemann [249 Biemann, 1988] pour les ions fragments issus de dissociations des chaînes latérales des acides aminés. Elle est illustrée dans la **Figure C-2**. Parmi les ions représentés, seuls les ions b et y, puisque correspondant à la rupture de la liaison amide, ainsi que les ions a, puisqu'issus des ions b, seront discutés dans nos résultats. Les ions conservant la partie N-terminale de la séquence sont représentés en rouge, et les ions conservant la partie C-terminal de la séquence en bleu.

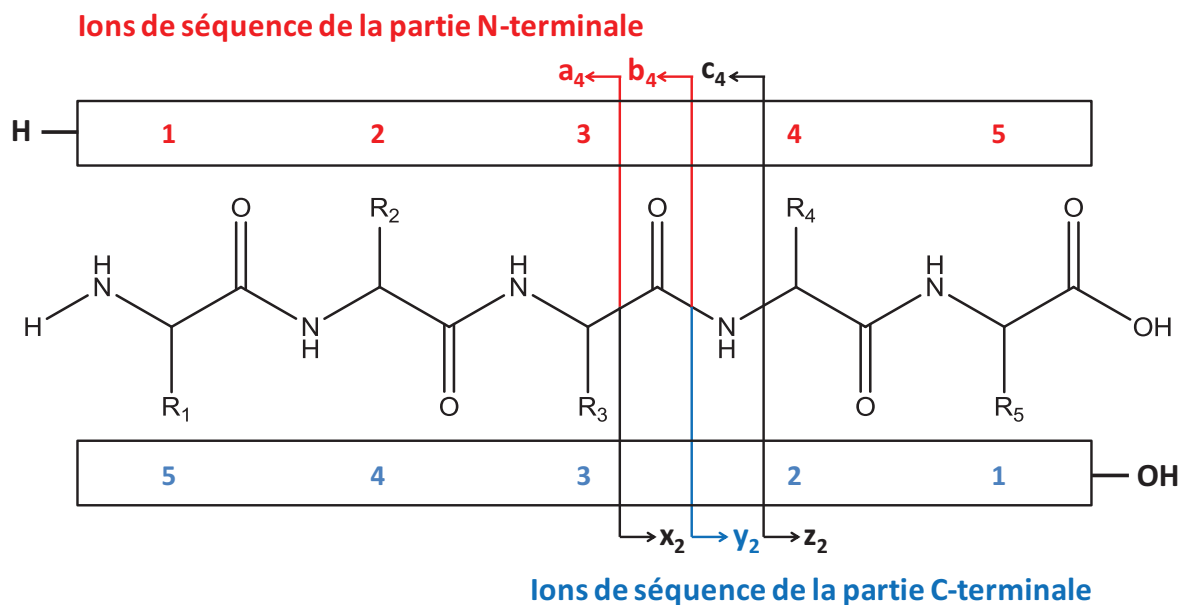


Figure C-2. Nomenclature des ions de séquence d'après [248 Roepstorff *et al.*, 1984].

Pour aboutir à la formation de ces ions, plusieurs mécanismes ont été détaillés. Dans sa revue, Paizs a illustré ces différentes voies de fragmentation (PFPs pour Peptide Fragmentation Pathways) sous forme d'un diagramme hiérarchique, permettant ainsi de regrouper les mécanismes selon leur origine [252 Paizs *et al.*, 2005]. Ce schéma a été reproduit en **Figure C-3**. Deux types de mécanismes sont à distinguer :

- Les mécanismes dirigés par la charge ("Charge-Directed PFPs") dans lesquels la charge est localisée sur un site basique du squelette peptidique à proximité de la liaison dissociée. Ces mécanismes expliquent la majorité des ions formés en fragmentation basse énergie. Ils conduisent à la formation des ions permettant de remonter à la séquence. Tous les ions issus de pertes de neutre (H₂O, NH₃,...) qui n'apportent pas d'information de séquence ("non-sequence PFPs") ne sont pas discutés dans ce mémoire.
- Les mécanismes dans lesquels la fragmentation est éloignée de la charge (CRF Charge-Remote Fragmentation). Elles sont induites par la réactivité de certaines chaînes latérales.

Pour notre part, nous avons donc choisi de mentionner le mécanisme principal (b_x-y_z) permettant d'obtenir les ions b et les ions y, et des mécanismes annexes. Ces voies de fragmentation sont représentées en rouge dans la **Figure C-3**. Il faut préciser que tous ces mécanismes de fragmentation ont été établis pour des ions monochargés.

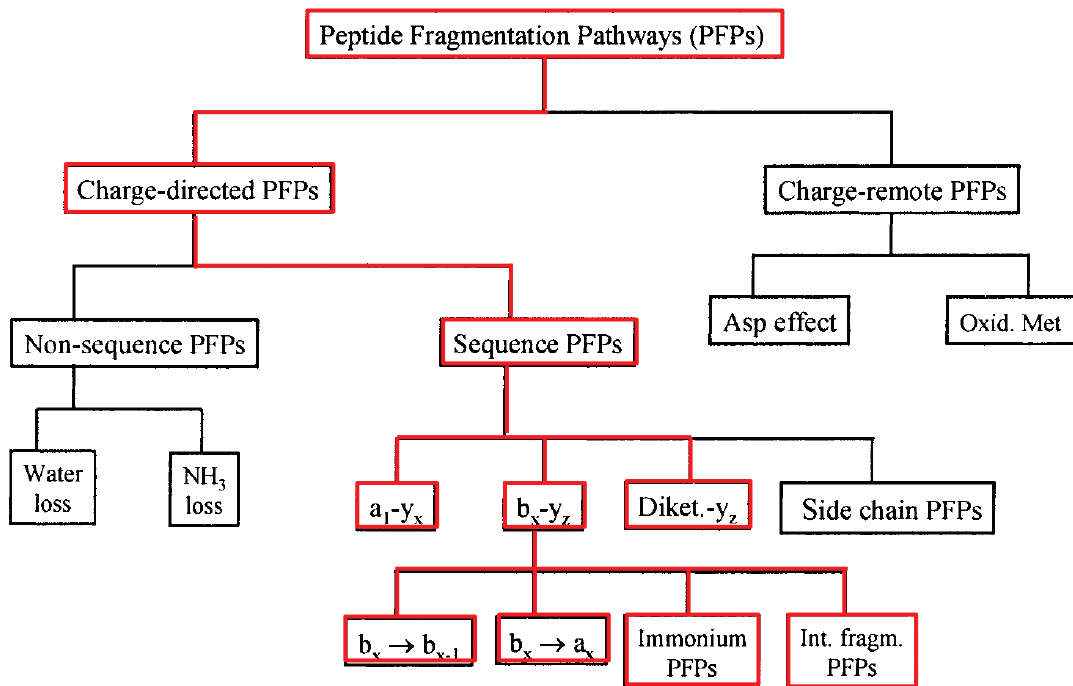


Figure C-3. Les voies de fragmentation des peptides d'après [252 Paizs *et al.*, 2005].

I.3.1. La voie de fragmentation b_x - y_z

La voie de fragmentation b_x - y_z explique la formation des ions b et y qui constituent les principaux ions de séquences obtenus en fragmentation basse énergie (Figure C-4). Elle est la voie la plus favorable pour la formation de ces ions car elle est la moins coûteuse énergétiquement. Ce mécanisme repose sur la mobilité du proton sur les chaînes amides du peptide permettant une substitution nucléophile intramoléculaire. Cette dernière conduit à la formation d'un complexe en phase gazeuse se dissociant pour former soit l'ion b sous la forme d'une oxazolone protonée, soit l'ion y sous le forme d'un peptide tronqué chargé.

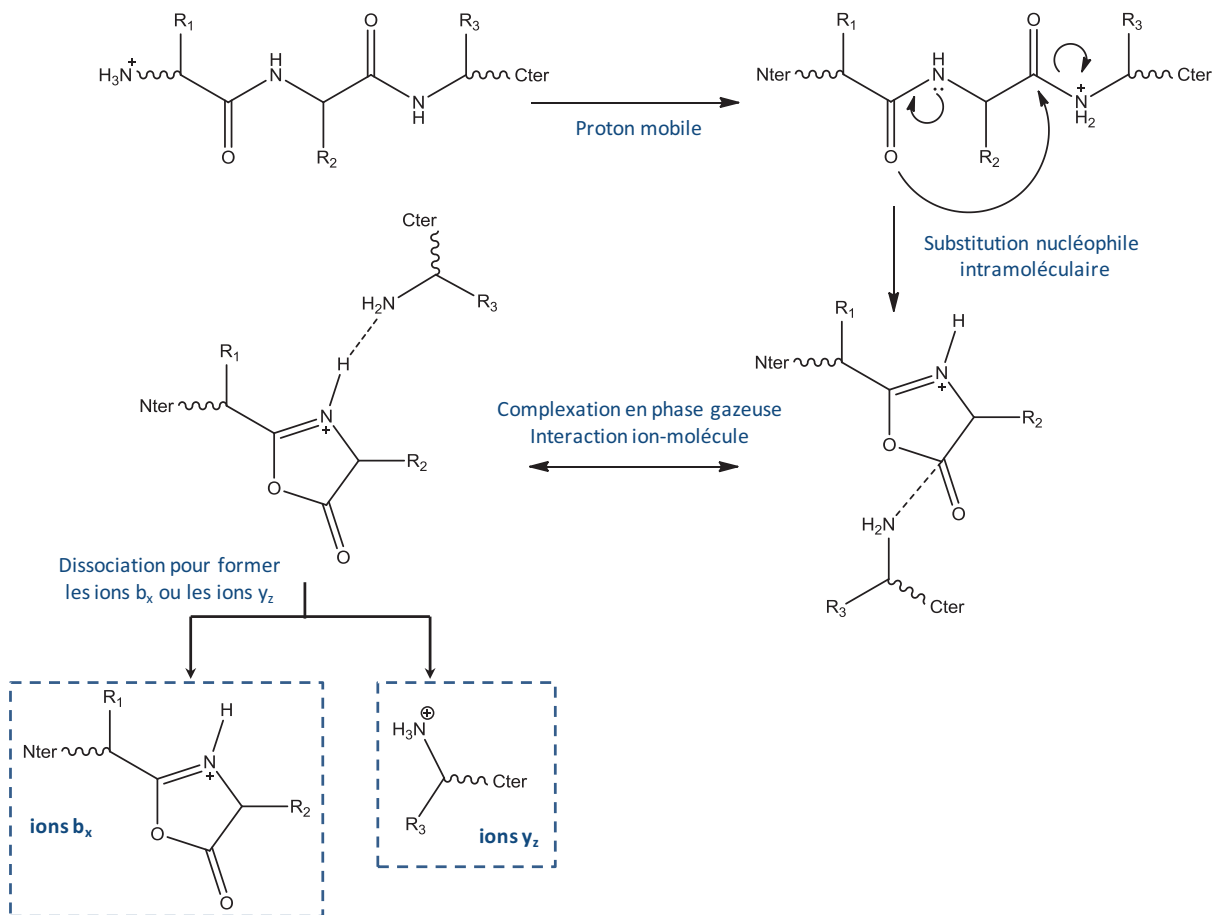


Figure C-4. Formation des ions b et y selon la voie de fragmentation b_x - y_z .

I.3.2. La voie de fragmentation y_z

Cette voie de fragmentation explique la formation d'ions y à partir du peptide avec la charge localisée sur l'amine N-terminal. Ce mécanisme induit la formation d'un ion y linéaire en passant par la formation de macrocycles ou de dicétopipérazine.

I.3.2.1. y_{N-n} ($n > 2$) : formation de macrocycles

Lorsque la charge est localisée sur l'amine terminale et qu'elle induit la rupture d'une liaison amide située à une distance supérieure à deux résidus, la substitution nucléophile entraîne la formation

d'un macrocycle et d'un peptide linéaire tronqué des résidus mis en jeu dans le macrocycle (**Figure C-5**). L'affinité protonique du macrocycle étant plus faible que celle du peptide linéaire, il se forme majoritairement l'ion y protoné correspondant.

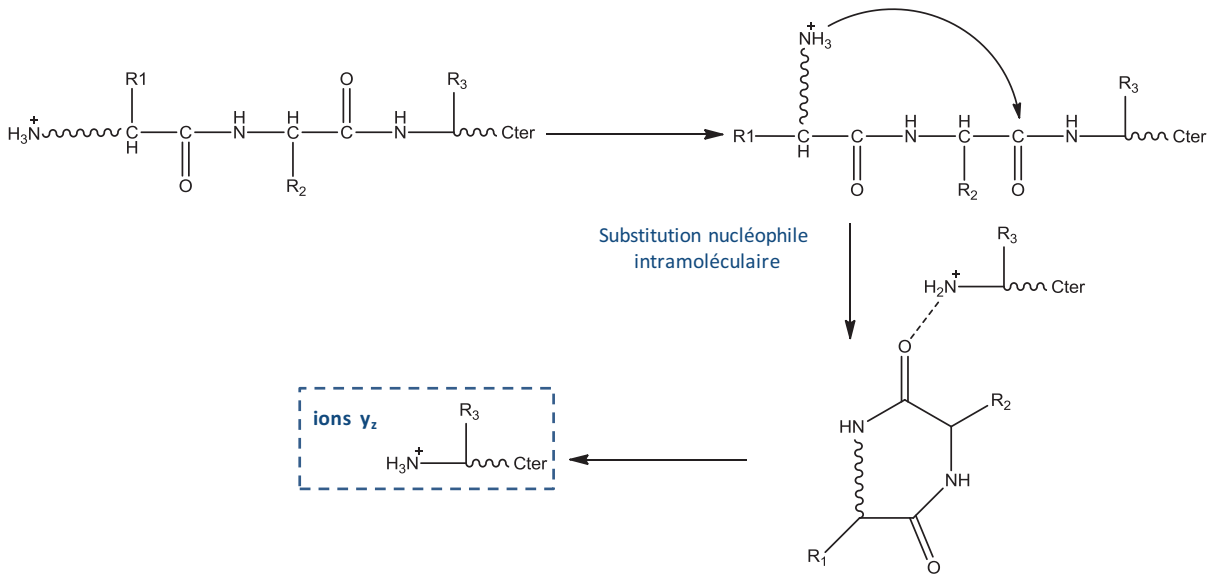


Figure C-5. Formation des ions y selon la voie de fragmentation y_z .

I.3.2.2. Cas particulier : y_{N-n} ($n=2$): formation de dicétopipérazine

Lorsque la rupture se produit sur la liaison amide séparant le deuxième et le troisième résidu ($n=2$), le cycle formé est alors une dicétopipérazine (**Figure C-6**). De la même façon que le macrocycle, ce dernier ne possède pas une affinité protonique supérieure au peptide tronqué linéaire qui conserve le proton pour former l'ion y correspondant.

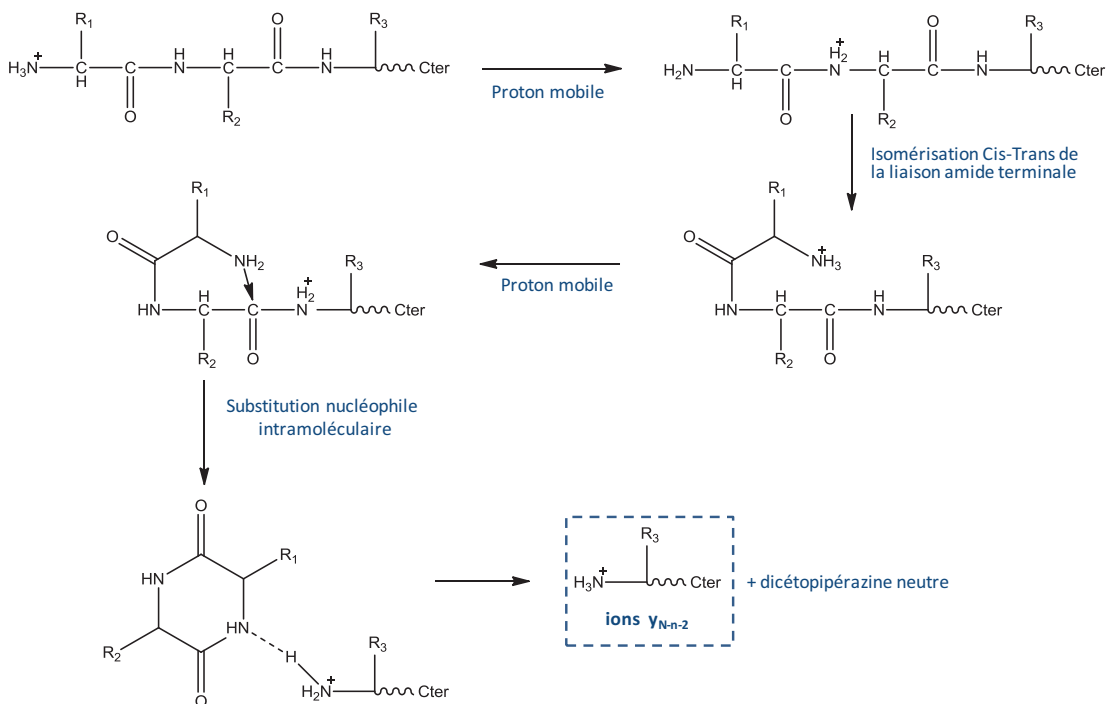


Figure C-6. Formation des ions y selon la voie de fragmentation y_z : cas particulier de la dicétopipérazine.

I.3.3. La voie de fragmentation a_1 - y_x

La voie de fragmentation a_1 - y_x propose des mécanismes de formation des ions a_1 selon deux voies.

I.3.3.1. Par la formation d'une imine

Le proton mobile peut induire la rupture des liaisons à proximité du carbonyle, puis entraîner la perte du carbonyle (**Figure C-7**). Il en résulte un complexe en phase gazeuse qui va pouvoir se dissocier soit en un ion a_1 sous la forme d'une imine formée avec la fonction amine terminale, soit sous la forme d'un ion y porteur de la partie C-terminale.

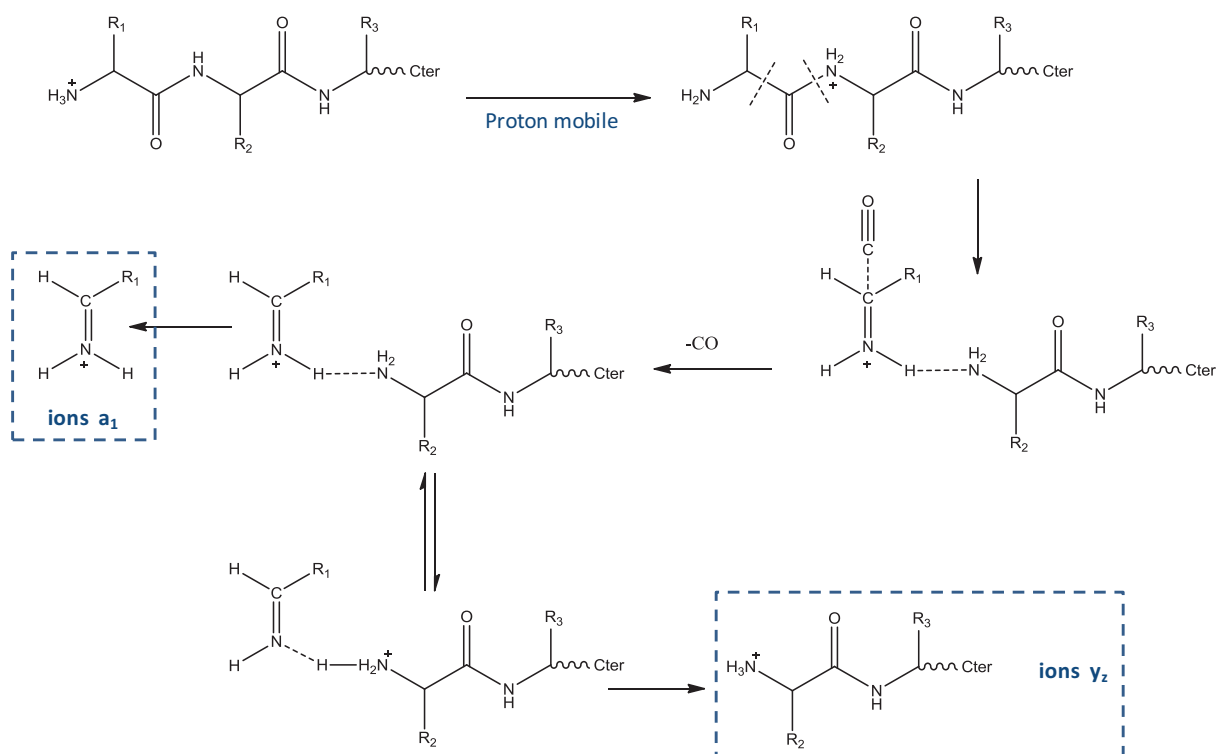


Figure C-7. Formation des ions y et a_1 selon la voie de fragmentation a_1 - y_x par la formation d'une imine.

I.3.3.2. Par formation d'une aziridinone

Ce second mécanisme est possible lorsque le proton se situe sur une seconde liaison amide du peptide (**Figure C-8**). Il implique la formation par substitution nucléophile intramoléculaire d'un cycle à trois liaisons constitué par l'amine terminale, le carbone α porteur de la chaîne latérale et le carbone du carbonyle. Le complexe formé peut ensuite par dissociation conduire à un ion a_1 de type aziridinone, ou à un ion y porteur de la partie C-terminale.

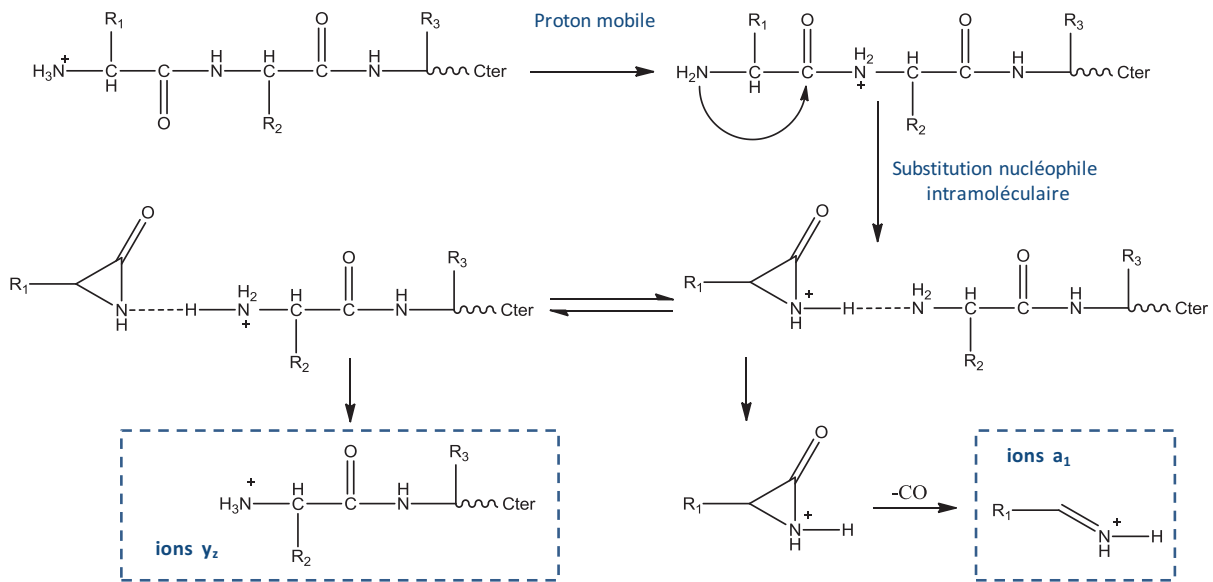


Figure C-8. Formation des ions y et a_1 selon la voie de fragmentation a_1-y_x par la formation d'une aziridinone.

I.3.4. Les ions secondaires

Nous avons appelé les ions secondaires tous les ions fragments issus de fragments (fragmentations consécutives). Ce sont des ions de seconde génération qui peuvent apporter des informations de séquences tels que les ions a ou au contraire qui peuvent compliquer l'interprétation des spectres MS/MS.

I.3.4.1. Les voies de fragmentation à partir des ions b :

La formation d'ions fragments secondaires constitue également une partie des ions de séquences. En effet, des ions b_x peuvent, par la perte du carbonyle, former des ions a_x (Figure C-9). Les ions a sont ainsi associés aux ions b par une différence de 28 Da entre les deux ions. Ils sont très souvent présents sur le spectre de fragmentation. Ils permettent en règle générale de confirmer la nature d'un ion comme étant un ion b , renseignant ainsi l'extrémité N-terminale.

Un ion a est formé par la perte du carbonyle de l'oxazolone par la voie $b_x \rightarrow a_x$ (Figure C-9). Ces ions a_x peuvent ensuite par une substitution nucléophile intramoléculaire produire les ions b_{x-1} .

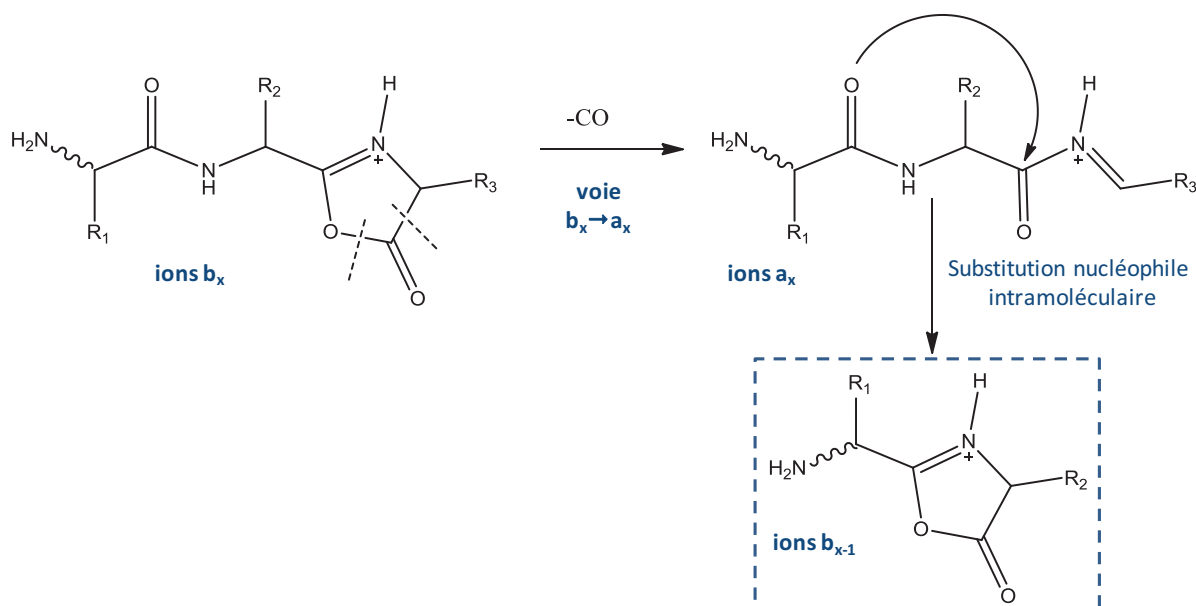


Figure C-9. Formation des ions a puis d'ions b selon la voie de fragmentation b_x-b_{x-1} .

Il est à noter que les ions b peuvent aussi directement se fragmenter par réarrangement en formant un macrocyle. Le proton mobile sur ce macrocyle peut entraîner sa réouverture sur n'importe quelle liaison amide. On observe ainsi des ions b où l'enchaînement primaire des acides aminés a été "réorganisé". Ce propos est illustré en **Figure C-10**. Ce phénomène a été dénommé "scrambling" et a fait l'objet de nombreuses études [²⁵⁶ Bleiholder *et al.*, 2008]. Il semblerait qu'il reste néanmoins marginal et ne perturbe pas l'attribution de séquence dans une très grande majorité des cas [²⁵⁷ Goloborodko *et al.*, 2011].

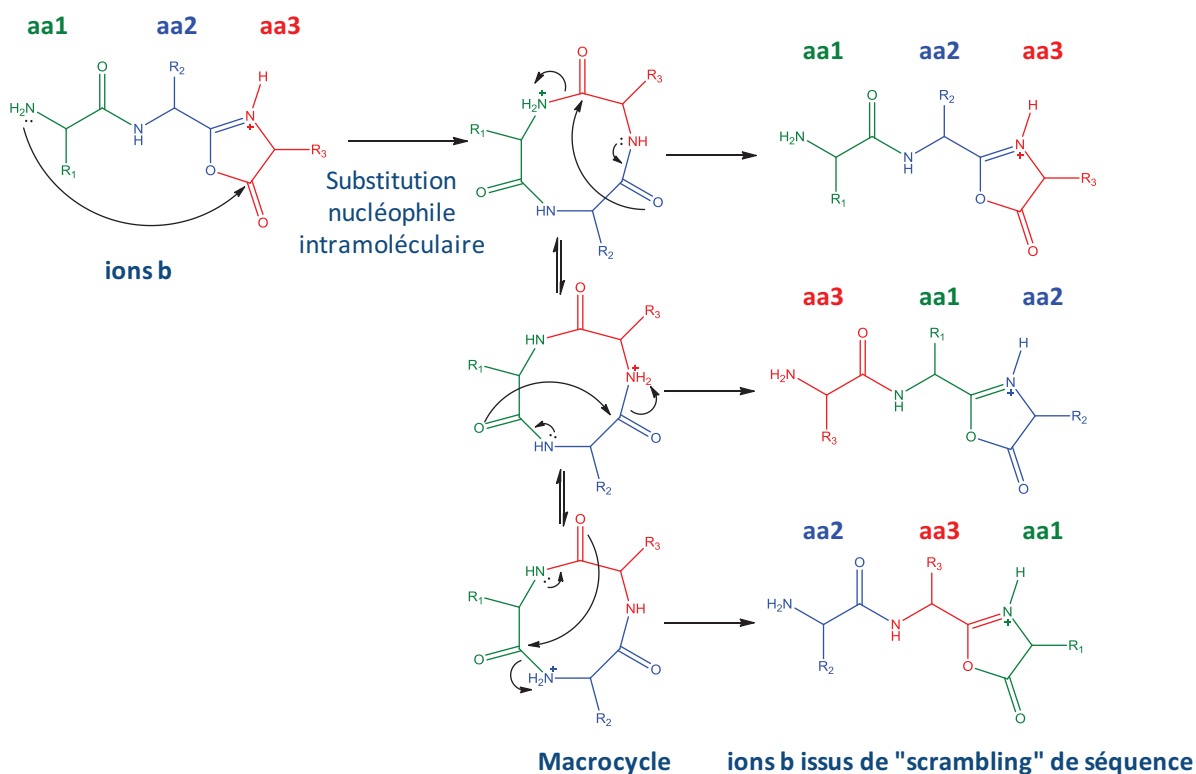


Figure C-10. Réarrangements des ions b par "scrambling" via la formation d'un macrocyle.

I.3.4.2. Les voies de fragmentation menant aux ions immoniums

Les ions immoniums, même s'ils ne donnent pas d'information sur l'ordre de la séquence, peuvent indiquer ou confirmer la présence d'acides aminés puisqu'ils sont constitués du squelette de l'acide aminé formé par l'azote et le carbone α porteur de la chaîne radicale. Deux mécanismes principaux ont été rapportés par Paizs pour expliquer la formation de ces ions (**Figure C-11**). D'une part, ils peuvent être obtenus à partir de fragmentation de l'ion a_x discuté précédemment par la voie $b_x \rightarrow a_{x+1}$, et d'autre part, ils peuvent être issus de la perte du carbonyle d'un ion y par la voie a_1-y_z .

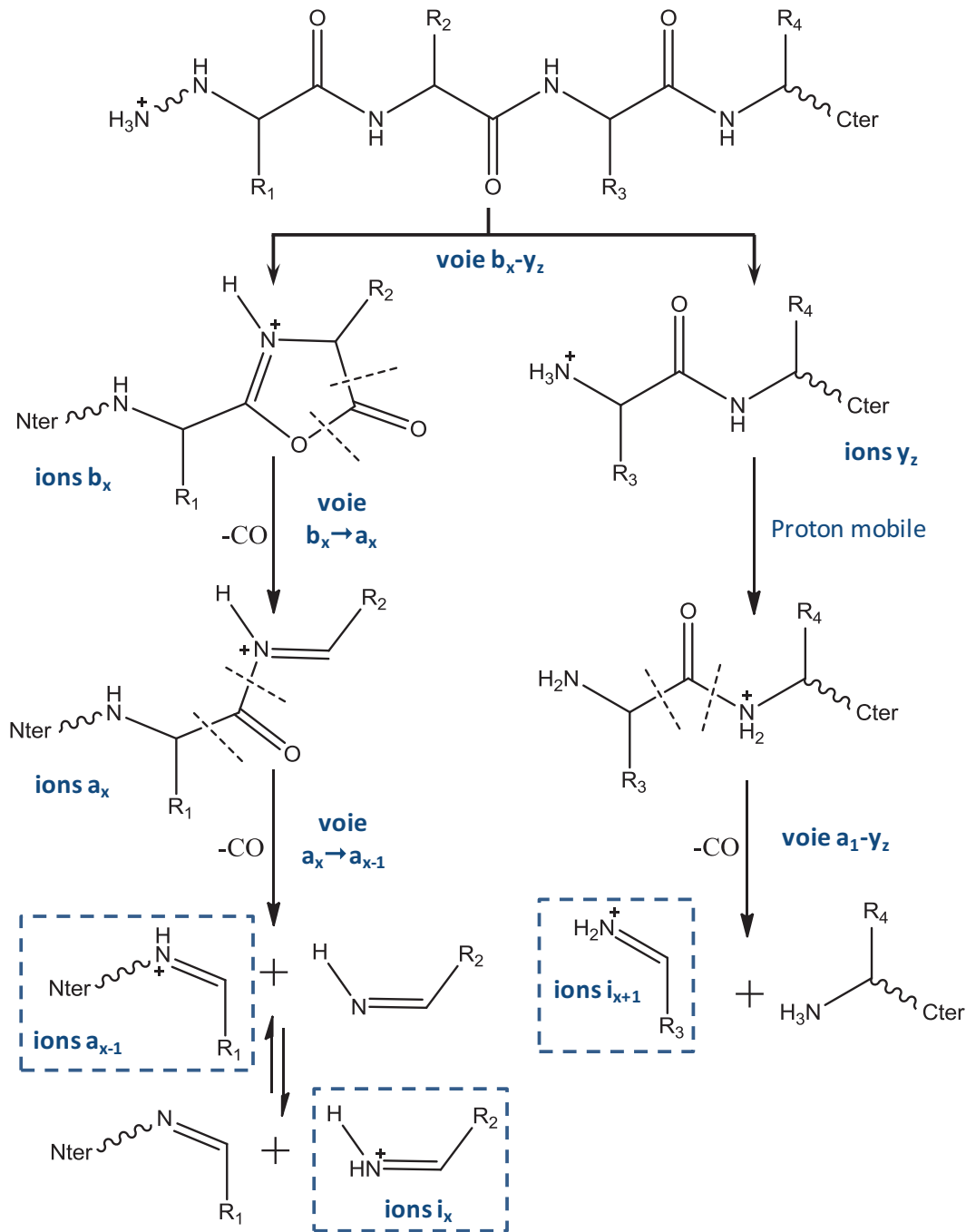


Figure C-11. Schéma de formation des ions immoniums par les voies de fragmentation $b_x \rightarrow a_x$ et $b_x \rightarrow a_{x+1}$ à partir d'ion b , ou la voie de fragmentation a_1-y_z à partir de l'ion y .

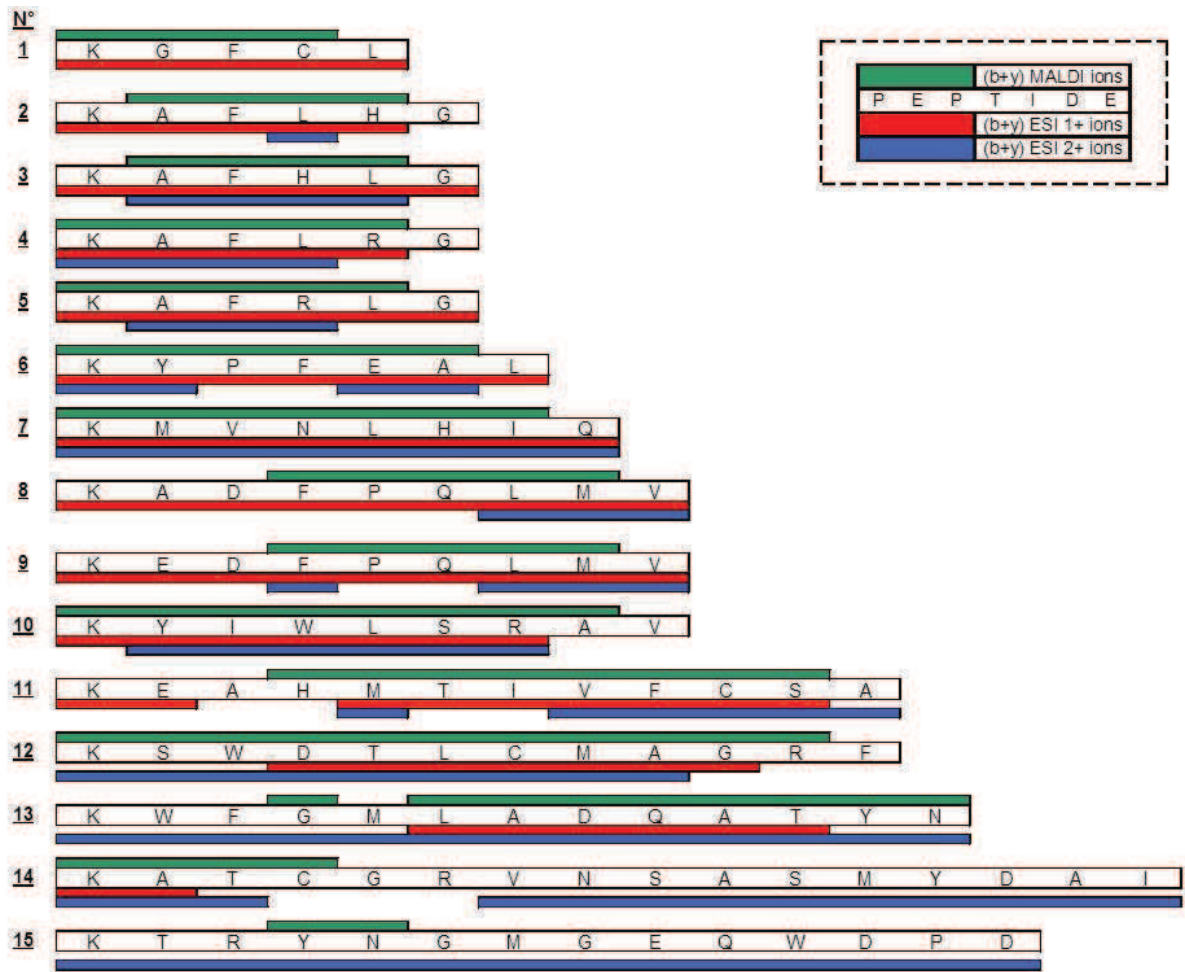
Les travaux que nous avons menés en fragmentation de peptides illustrent ces voies de dissociation obtenues à partir d'espèces mono et multichargées sur des peptides de séquences variées à partir d'appareillages différents (*Matériels et Méthodes*). De façon générale, nous avons bien sûr vérifié les fragmentations déjà publiées. Par ailleurs, nous avons également observé quelques particularités qui ont fait l'objet de deux publications.

Dans la première publication qui s'est focalisée sur l'étude d'une catégorie particulière de peptides (peptides Lys-N, présentés dans la partie *Peptides synthétiques*), nous avons voulu étudier en détail si l'instrumentation (type de source, analyseur, et méthode d'activation) influençait leur comportement en fragmentation. Nous avons donc comparé les données MS/MS provenant d'expériences menées sur les spectromètres de masse présentés dans la partie *Spectrométrie de masse : les différentes configurations*. Dans ce contexte, les résultats sont discutés dans l'*Article 1: Sequencing Lys-N proteolytic peptides by ESI and MALDI tandem mass spectrometry*, publié dans *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. Les expériences de fragmentation de ces peptides menées sur l'appareillage MALDI-CID-TOF/TOF ne sont pas mentionnées dans la publication. De façon surprenante étant donné les configurations différentes des deux types d'appareillages MALDI utilisés (MALDI-CID-TOF/TOF et MALDI-LIFT-TOF/TOF) pour réaliser la spectrométrie de masse en tandem, nous avons observé des spectres de masse très similaires, présentant d'une part le même type d'ion et d'autre part des abondances relatives similaires (type d'ions et intensités). La seule réelle différence que nous avons observée est la possibilité de relier l'intensité des ions fragments avec celles des ions parents dans la technique MALDI-CID-TOF/TOF. Cependant, ayant choisi de ne pas tenir compte de l'intensité de l'ion parent dans nos statistiques, ce point ne constituait pas un impératif. Un seul jeu de données a donc été présenté dans la publication.

La seconde publication est le fruit d'un examen approfondi en spectrométrie de masse en tandem de l'ensemble des peptides constituant la peptidothèque. En effet, les analyses successives menées par L.Mouls [² Mouls, 2005], N.Shenar [¹ Shenar, 2008] ou pendant cette thèse en ESI-QTOF et/ou en MALDI-LIFT-TOF/TOF de l'ensemble des peptides a permis d'observer un comportement spécifique à certaines séquences peptidiques. Cette observation constitue le cœur de l'*Article 2: Occurrence of C-terminal residue exclusion in peptide fragmentation by ESI and MALDI tandem mass spectrometry*, publié dans *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. Une nouvelle fois, bien que ces résultats ne soient pas commentés dans la publication, il faut mentionner que ce comportement a été vérifié sur les spectromètres de masse MALDI-CID-TOF/TOF pour quelques peptides d'intérêt.

I.4. Séquençage de peptides Lys-N

I.4.1. Article 1: Sequencing Lys-N proteolytic peptides by ESI and MALDI tandem mass spectrometry





RESEARCH ARTICLE

Sequencing Lys-N Proteolytic Peptides by ESI and MALDI Tandem Mass Spectrometry

Mathieu Dupré, Sonia Cantel, Pascal Verdié, Jean Martinez, Christine Enjalbal

Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247 CNRS—Universités Montpellier 1 et 2, Bâtiment Chimie (17), Université Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

Abstract

In this study, we explored the MS/MS behavior of various synthetic peptides that possess a lysine residue at the N-terminal position. These peptides were designed to mimic peptides produced upon proteolysis by the Lys-N enzyme, a metalloendopeptidase issued from a Japanese fungus *Grifola frondosa* that was recently investigated in proteomic studies as an alternative to trypsin digestion, as a specific cleavage at the amide X-Lys chain is obtained that provides N-terminal lysine peptide fragments. In contrast to tryptic peptides exhibiting a lysine or arginine residue solely at the C-terminal position, and are thus devoid of such basic amino acids within the sequence, these Lys-N proteolytic peptides can contain the highly basic arginine residue anywhere within the peptide chain. The fragmentation patterns of such sequences with the ESI-QqTOF and MALDI-TOF/TOF mass spectrometers commonly used in proteomic bottom-up experiments were investigated.

Key words: Lys-N proteolytic peptides, MS/MS, MALDI-TOF/TOF, ESI-QqTOF

Introduction

In “bottom-up” proteomics [1], mass spectrometry analyses are undertaken at the peptide level after sample digestion, which is usually performed with trypsin [2]. The digest obtained either from an isolated protein, or from a complex protein mixture, is analyzed by various complementary mass spectrometry techniques such as MALDI-TOF for peptide mass fingerprinting (PMF), MALDI-TOF/TOF, and/or LC/ESI-MS/MS for peptide sequence information [3]. The recorded mass spectra are correlated to genomic data using a computer algorithm that virtually cleaves known archived proteins into constitutive peptides according to the specific enzymatic treatment [4–6]. Whatever the method used, provided that trypsin is used for the proteolysis

stage, the recovered peptides contain either arginine or lysine at the C-terminal position [2]. The presence of such a basic residue at the peptide C-terminus favors the formation of multiply charged ions where at least one of the ionizing protons is sufficiently mobile in MS/MS experiments to trigger multiple amide bond ruptures along the peptide backbone, as depicted by the mobile proton model [7–9]. Thus, in most proteomic studies, tryptic peptides are usually efficiently sequenced by low-energy collision-induced dissociation (CID) of doubly charged precursor ions. Therefore, fragmentation rules governing low-energy dissociations of protonated peptides are of the utmost importance, as bioinformatic tools utilize these established MS/MS behaviors to perform the automated interpretation of mass spectra and to subsequently achieve efficient protein retrieval from database searches [10, 11].

The potential of the metalloendopeptidase Lys-N [12] in proteomics has recently been reported in the literature [13, 14]. This protease was found to be a good alternative to trypsin, providing efficient digestion at every predicted cleavage site [13], even under harsh sample handling

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s13361-010-0022-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Correspondence to: Christine Enjalbal; e-mail: enjalbal@univ-montp2.fr

Received: 13 July 2010
Revised: 15 September 2010
Accepted: 22 October 2010
Published online: 22 January 2011

conditions [14]. Combining Lys-N and trypsin proteolysis substantially enhanced protein coverage. Peptides issued from biological protein mixtures that were subjected to Lys-N treatments were sequenced by MALDI-TOF/TOF instruments operated under CID conditions [15, 16]. The MS/MS data recorded from singly charged ions exhibited a more extensive b-ion series compared to related tryptic peptides. Although the presented results were very convincing and promising, several reasons prompted us to prepare model peptides that mimic Lys-N digests to broaden the scope of the MS/MS experiments. First, only Lys-N proteolytic peptides that did not contain basic residues within their chains were studied, with the others being discarded prior to MS/MS analyses upon strong cation exchange chromatography [15]. Second, guanidination of the N-terminal lysine residue was also undertaken to modify peptide basicity and thereafter improve its fragmentation by promoting the formation of a single ion series [17]. In our opinion, such additional sample handling (a chromatographic step or chemical derivatization) limits the interest of Lys-N proteolysis compared to trypsin digestion. Moreover, only singly charged ions activated by CID (with MALDI-MS/MS and to a less extent with ESI-MS/MS) were investigated, whereas MS/MS experiments on ions exhibiting higher charge states (+2, +3) were commonly conducted with ESI-based mass spectrometers, especially in shotgun strategies [18].

The present study was undertaken using 15 model Lys-N peptides with masses ranging from 500 to 1700 g/mol, with the C-terminal position being occupied by any of the 20 proteinogenic amino acids. Some of the prepared sequences bear a basic residue within their polyamide chain (arginine, histidine), lysine being excluded. Besides, to cover all aspects of MS/MS experiments performed in proteomic bottom-up applications, these synthetic model peptides were studied with mass spectrometers displaying different ionization and mass analyzer configurations (ESI-QqTOF and MALDI-TOF/TOF) allowing both CID fragmentation and laser-induced dissociation (LID) [19, 20]. In the chosen mass range, the synthetic peptides exhibited both singly and doubly charged ions in ESI-QqTOF analyses, allowing comparison of the recorded peptide sequence information obtained (i) from the fragmentation of the singly charged precursors in all investigated MALDI and ESI MS/MS equipment and (ii) from the fragmentation of the singly charged compared to the doubly charged parent ion in ESI-QqTOF.

Experimental

Chemicals and Reagents

All solvents were of analytical grade. Methanol was purchased from Fisher and acetonitrile from Carlo Erba. The deionized water used in all the experiments was obtained using a Milli-Q system (Millipore, Milford, MA, USA). Hydrochloric acid (37%) was obtained from VWR.

The MALDI matrix (2,5 dihydroxybenzoic acid and α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) was purchased from Fluka. A peptide calibration standard kit was purchased from Bruker Daltonics.

Syntheses

Peptides were synthesized on the IBMM peptide synthesis platform using the conventional methodology of solid-phase peptide synthesis using Fmoc chemistry [21], and purified by preparative LC/MS (autopurification system, Waters, Milford, MA, USA). Due to the chosen linker, all peptides were prepared as C-terminal carboxylic acids. More details are available in the Electronic Supplementary Material (ESM).

Mass Spectrometry

Mass spectrometry analyses were conducted on instruments located in the Laboratoire de Mesures Physiques of University Montpellier 2 (the IBMM instrument platform).

ESI mass spectra were recorded on a Q-TOF I mass spectrometer (Waters) fitted with an electrospray ion source. Data were acquired and processed with the Masslynx software. The mass spectrometer was calibrated in the positive-ion mode using 1% phosphoric acid in water/acetonitrile solution ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 50/50, v/v). Data were acquired by the TOF analyzer at 1 acquisition/s from m/z 50 to m/z 2000 with a resolution of 5000. Depending on the sample, 100 acquisitions were summed to produce the final spectrum. Samples were dissolved in an $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (50/50, v/v) mixture and infused into the ESI source at a flow rate of 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Voltages were set at +2.0 kV for the capillary and adjusted for the sampling cone. The source was heated at 80 °C. Nitrogen was used as both nebulizing and desolvation gas. The latter was heated to 150 °C. In the MS/MS experiments, the second quadrupole analyzer was set to the rf mode, with argon used as collision gas. The collision energy was varied from 25 to 90 eV depending on the sample in order to get optimal fragmentation, as displayed in Table 1.

MALDI mass spectra were recorded on an Ultraflex III TOF/TOF instrument (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) equipped with a LIFT capability. A pulsed Nd:YAG laser at a wavelength of 355 nm was operated at a frequency of 100 Hz (MS data) or 200 Hz (MS/MS data) with a delayed extraction time of 30 ns. The source was operated in the positive mode. Data were acquired with the Flex Control software and processed with the Flex Analysis software. A solution of the HCCA matrix in water/acetonitrile (70/30, v/v) at a concentration of 10 mg/ml was mixed with an equal amount of the peptide sample, and 0.5 μl of this solution was deposited onto the MALDI target according to the dried droplet procedure. After evaporating the solvent, the MALDI target was introduced into the mass spectrometer ion source. External calibration was performed

Table 1. Studied synthetic Lys-N peptides

Peptide	Peptide sequence	(M+H) ⁺ (Da)	MALDI-MS/MS		ESI-MS/MS	
			Laser fluence (%) to fragment MH ⁺ by		Collision energy (eV) to fragment by CID	
			LID	LID/CID	Charge state +1	Charge state +2
1	KGFLC	567.29	20	30	45	nd
2	KAFHLG	672.37	20	30	50	35
3	KAFHLG	672.37	20	30	50	30
4	KAFRLG	691.42	20	30	60	30
5	KAFRLG	691.42	20	30	60	30
6	KYPFEAL	867.45	20	30	55	25
7	KMVNLHIQ	982.54	20	30	65	40
8	KADFPQLMV	1048.54	20	30	70	35
9	KEDFPQLMV	1106.54	20	30	65	40
10	KYIWLRAV	1135.65	20	30	70	45
11	KEAHMTIVFCSA	1336.63	30	40	75	45
12	KSWDTLCMAGRF	1414.65	20	30	70	35
13	KWFGMLADQATYN	1544.71	30	40	65	25
14	KATCGRVNSASMYDAI	1686.79	30	40	90	35
15	KTRYNGMGEQWDPD	1696.73	25	35	90	35

nd not detected

with the commercial peptide mixture (Peptide Calibration Standard 2, Bruker Daltonics, Wissembourg, France).

MS data were acquired under the following MS conditions. An acceleration voltage of 25.0 kV (IS1) was applied for a final acceleration of 21.95 kV (IS2). The reflectron mode was used for the TOF analyzer (voltages of 26.3 kV and 13.8 kV). Mass spectra were acquired from 250 laser shots, the laser fluence being adjusted for each studied sample (laser fluence 1). Ions were detected over the mass range m/z 200–2000.

MS/MS data were acquired under the following conditions. An acceleration voltage of 8.0 kV (IS1) was applied for a final acceleration of 7.25 kV (IS2). The reflectron mode was used for the TOF analyzer (voltages of 29.5 kV and 13.9 kV). Mass spectra were acquired from 600 laser shots, with the laser fluence (given in Table 1) being adjusted for each studied peptide above the threshold for generating molecular ions (laser fluence 2 > laser fluence 1). MS/MS experiments were performed under LID conditions with the LIFT cell voltage parameters set at 19.0 kV (LIFT 1) and 3.2 kV (LIFT 2) for a final acceleration of 29.5 kV (reflector voltage), and the pressure in the LIFT cell was around 4×10^{-7} mbar. The precursor ion selector was set manually to the first monoisotopic peak of the molecular ion pattern for all analyses. For LID experiments, no collision gas was added (gas-off spectra). For LID/CID experiments (gas-on spectra), the same tuning was used but argon was allowed to fill the collision cell (to a pressure of around 2×10^{-7} mbar).

Results and Discussion

Design of Lys-N Proteolytic Peptides

We synthesized 15 peptides to cover a mass range from 500 Da (5 residues) to 1700 Da (16 residues), as shown in

Table 1. Peptides were designed to present an overall amino acid occurrence close to their natural relative abundance in proteins [22] (Figure S1 of the ESM). Except for lysine, which was only present at the N-terminal position, the five classes of residues—aliphatic (L, A, G, V, I), basic (R, H), acidic (E, D), aromatic (W, F, Y) and uncharged (N, Q, S, P, T, M, C)—were inserted anywhere within the polyamide chain. It has been demonstrated that some amino acids greatly influence the peptide fragmentation output, their side chains being involved in specific low-energy CID fragmentation reactions that are well documented [23–27]. Acid–base [23] and nucleophile–electrophile [28, 29] interactions provide various gas-phase chemistries involving both backbone and side-chain functional groups. For instance, basic sites participate in mobile proton sequestration [24–26] and salt bridge formation [30, 31], whereas nucleophiles trigger intramolecular attacks (backbone/backbone, backbone/side chain, side chain/side chain, cyclization, ...) [28, 29, 32]. A great deal of attention has thus been devoted to the influence on the fragmentation patterns of amino acids bearing a basic, acidic, nucleophilic, or electrophilic site, such as arginine [23–25, 31, 33], lysine [34, 35], histidine [24, 26, 36–38], proline [39–41], aspartic acid, and glutamic acid [23–27, 29]. These residues are all known to contribute to particular dissociation behaviors irrespective of the peptide sequence (synthetic or tryptic peptides). Thus, it would be interesting to probe the effects of these amino acids in N-terminated lysine containing peptides. In contrast to previously reported data concerning Lys-N peptides [15], two basic residues, arginine (pK_a of the guanidinium side chain 12.48) and histidine (pK_a of the imidazole side chain 6.04), were positioned within some of the studied peptides (4, 5, 10, 12, 14, and 15 for arginine-containing peptides and 2, 3, 7, and 11 for histidine-containing peptides). Some positional scanning was envisaged by moving the arginine or histidine

residue along the sequence to probe any difference in the MS/MS data. Proline, which triggers specific fragmentation pathways known as the “proline effect,” involving the peptide backbone cleavage N-terminal to this amino acid [40], was also included in the prepared sequences (6, 8, 9, 12, 15). Also, one acidic amino acid, aspartic acid (D) or glutamic acid (E), was positioned next to lysine in order to investigate the potential formation of a salt bridge between the two basic/acidic side chains on polyamide dissociation (8 and 9, which differ only by the substitution of the N-terminal dipeptide KA for KE, respectively). Finally, although peptides were more easily prepared with a C-terminal amide function in solid-phase strategies [17], all peptide chains were terminated by a C-terminal carboxylic acid to mimic Lys-N proteolysis and to avoid the loss of ammonia from the peptide backbone [42], which could compete with the loss of such molecule from the lysine side chain.

MALDI vs ESI MS/MS Experiments on Lys-N Proteolytic Peptides

As displayed in Table 1, four sets of experiments were performed: CID fragmentation of singly charged and doubly charged ions in ESI-MS/MS, and dissociation of singly charged species in MALDI-MS/MS but under two precursor ion activations (LID or LID combined with CID). Except for the smallest peptide, which exhibited only a singly charged ion in the corresponding ESI-QTOF mass spectrum, all other sequences provided the expected singly and doubly charged species suitable for all dissociation experiments. It should be noted that the longest chains were difficult to sequence when the singly charged precursor ion was selected, limiting the frame of the studies to peptides with masses below 2000 Da. The presence of a basic residue that could sequester the ionizing proton of singly charged ions is known to affect the extent of peptide backbone cleavage [24, 25, 43]. A comparison of the fragmentation behaviors of singly charged and doubly charged arginine- and (to a lesser extent) histidine-containing Lys-N proteolytic peptides would provide an insight into the effect of a localized versus a mobile proton without being biased by the presence of an arginine residue only at the C-terminal position (tryptic peptides), as encountered in large-scale proteomics experiments.

To ascertain the clarity of Lys-N proteolytic peptide MS/MS spectra that were reported to exhibit distinguishable b ion series [15], detected fragment ions with S/N > 5 were classified into three categories whatever their charge state: N-terminal fragment ions (b and a ion series), C-terminal fragment ions (y ion series), and all other recorded ions. In this third group, non-direct sequence ions [32] that correspond to ions which were not expected from the backbone fragmentation model and/or were not directly related to the primary sequence, such as internal ions, immonium ions, scrambled ions, and

neutral losses, were not distinguished. This category also included some ions that were not identified. To deduce general trends from the recorded data, the overall intensity of each type of signal—a and b ions, y ions, and others—was normalized by adding the relative abundances of all ions belonging to that category and then dividing by the sum of all relative ion abundances. The relative abundance of the parent ion was discarded, as ESI and MALDI data were not acquired under the same MS/MS process. The relative abundances of C-terminal fragment ions (y ion series), N-terminal fragment ions (a and b ion series) and other non-direct sequence ions were plotted for each peptide sequence for all of the investigated tandem mass spectrometry experiments. Since the overall ion abundance could be mainly generated by a few intense signals or derive from a large number of weak signals, the number of detected ions in each category was also indicated in the schemes to give an account of the ion population.

MALDI-TOF/TOF

First of all, LID and LID combined with CID in MALDI experiments gave the same MS/MS spectra as previously observed for other synthetic peptides [20] (Fig. S2 of the ESM). The results recorded for MALDI tandem mass spectrometry upon LID/CID activation are displayed in Fig. 1. Three representative MS/MS spectra are reported in Fig. 2 (peptides 5, 8, and 11). Overall, b ions were more abundant than y ions, as expected from literature data. Indeed, 13/15 peptides showed this behavior. The best example is displayed in Fig. 2c for peptide 11, which exhibited a highly abundant N-terminal ion series from b11 to b4 that allowed the great majority of the sequence to be deduced. However, the clear detection of the N-terminal b ion series was not always so obvious. Although the presence of non-direct sequence fragment ions was usually observed, interferences with the expected backbone ions became significant when intense high-mass signals were produced. Moreover, some very abundant high-mass y ions were also recorded. Thus, the ions that dominated the MS/MS spectra were not necessarily b ions. Deducing the peptide sequence from the recorded data was not a straightforward task, as illustrated in Fig. 2a and b for peptides 5 and 8, respectively.

ESI-Q/TOF

The same peptides were subjected to low-energy CID experiments, selecting as a precursor ion the singly protonated species as well as the doubly charged ions. The collision-energy values that were applied for each MS/MS analysis are indicated in Table 1. The recorded fragment ions were classified into the three categories previously discussed

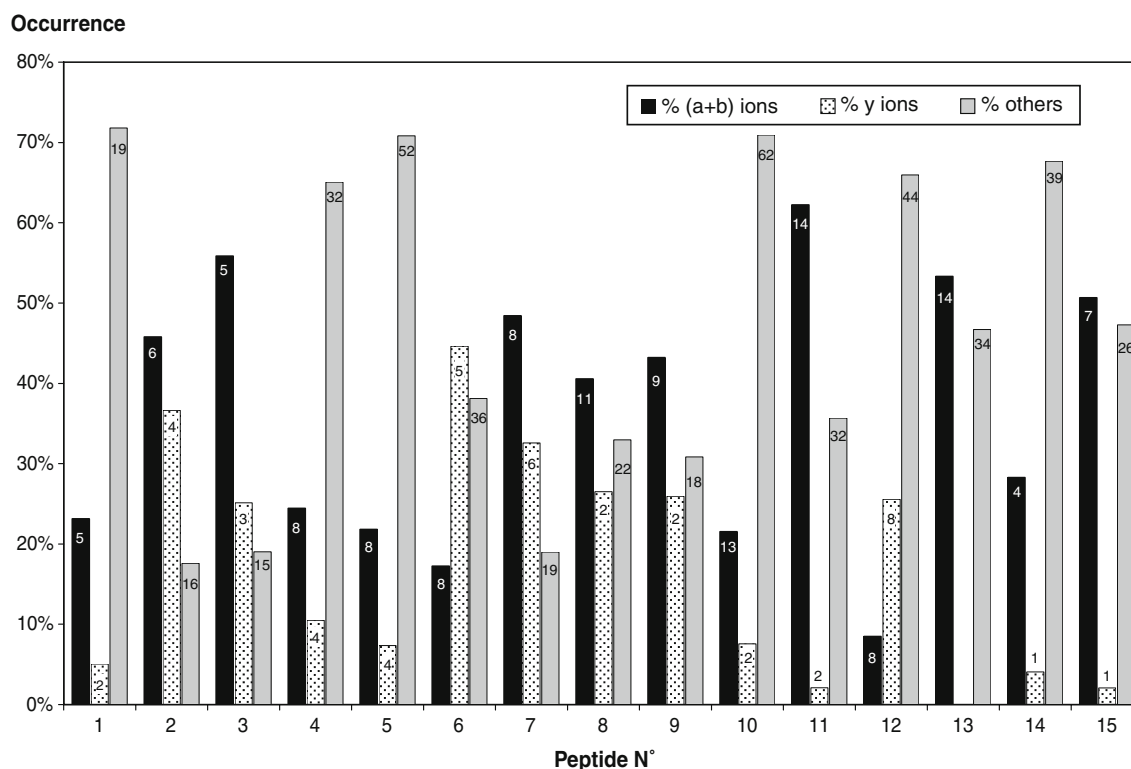


Figure 1. Occurrence of peptide fragment ions in LID/CID MALDI-TOF/TOF experiments (the number of fragment ions detected is indicated for each population)

(a and b ions, y ions, and others), as represented in Figs. 3 and 4, which relate to the CID of the $(M + H)^+$ and $(M + 2H)^{2+}$ precursor ions, respectively. From a general point of view, two major facts can be deduced from these MS/MS data. Firstly, provided that singly charged ions were dissociated, the fragmentation response was very similar in terms of ion type whatever the mass spectrometry technique used. Indeed, the studied peptides followed the same trends in Fig. 1 (MALDI-TOF/TOF) and Fig. 3 [ESI-Q/TOF on the $(M+H)^+$ precursor ion]. Secondly, the striking difference between the two sets of ESI experiments derives from the enhanced production of immonium ions in the case of doubly charged ion dissociation. Such fragmentation behavior increased the population of non-direct sequence ions, fragment ions related to truncated sequences (internal ions), and fragment ions produced from neutral losses, which were globally detected at the same level. As observed previously in MALDI-TOF/TOF, the b ions did not necessarily dominate the ESI-MS/MS spectra. The MS/MS mass spectra of peptides 5, 8 and 11, shown in Fig. 2 for MALDI-TOF/TOF experiments, are displayed in Figs. 5 and 6 for the CID of the $(M + H)^+$ and $(M + 2H)^{2+}$ precursor ions, respectively.

The choice of the precursor-ion charge state that undergoes the dissociation events greatly influences the output of the analysis, much more so than the mass spectrometry technique used (i.e., MALDI-TOF/TOF vs ESI-Q/TOF). Thus, the fragmentation features from singly

charged precursor ions and from doubly charged ions are discussed separately below.

Effect of Precursor Ion Charge State on Lys-N peptide MS/MS Behavior

LID vs CID of the $(M+H)^+$ Precursor Ion

Deviation from the reported ideal MS/MS behavior of singly charged ions—the production of abundant b ions—was attributed to the presence of arginine, proline and histidine in the sequence, as well as to the presence of lysine at the N-terminal position. In order to discuss more detailed assignments, the influence of each of these residues in the Lys-N peptides is described and compared with the specific MS/MS behaviors that they trigger in model synthetic peptides [23–27]. The effect of acidic residues, namely aspartic acid and glutamic acid, is also discussed.

Arginine (Peptides 4, 5, 10, 12, 14, 15)

Due to the strong binding of the charge to the guanidinium side chain [23, 24], the contribution of arginine to multiple fragmentation pathways was by far the most striking structural character, as it provided highly populated MS/MS spectra devoid of a clear b ion series (Fig. 2a vs 2b). Increased formation of y ions was observed for all arginine-containing peptides. Some of these y ions lost ammonia

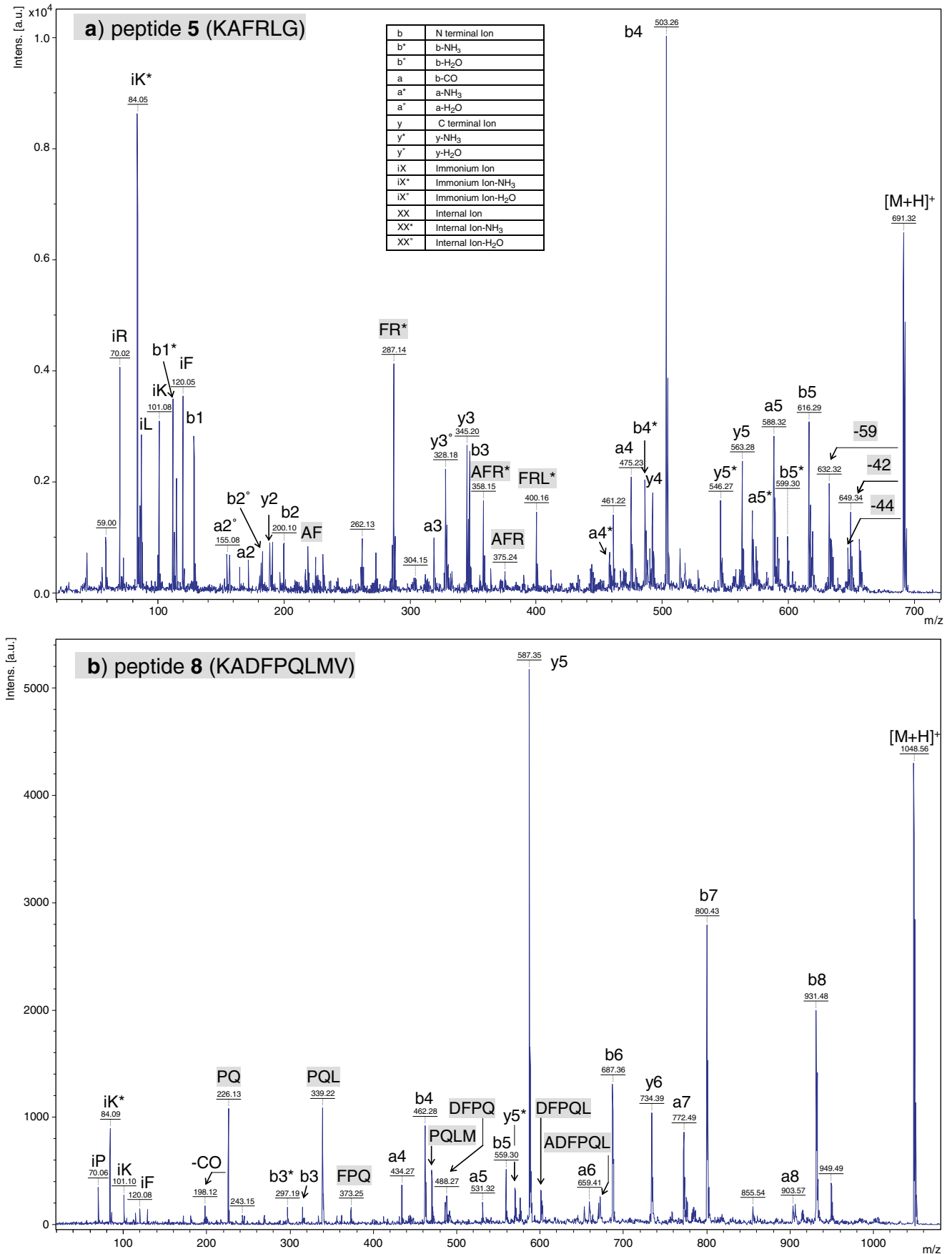


Figure 2. Continued on next page

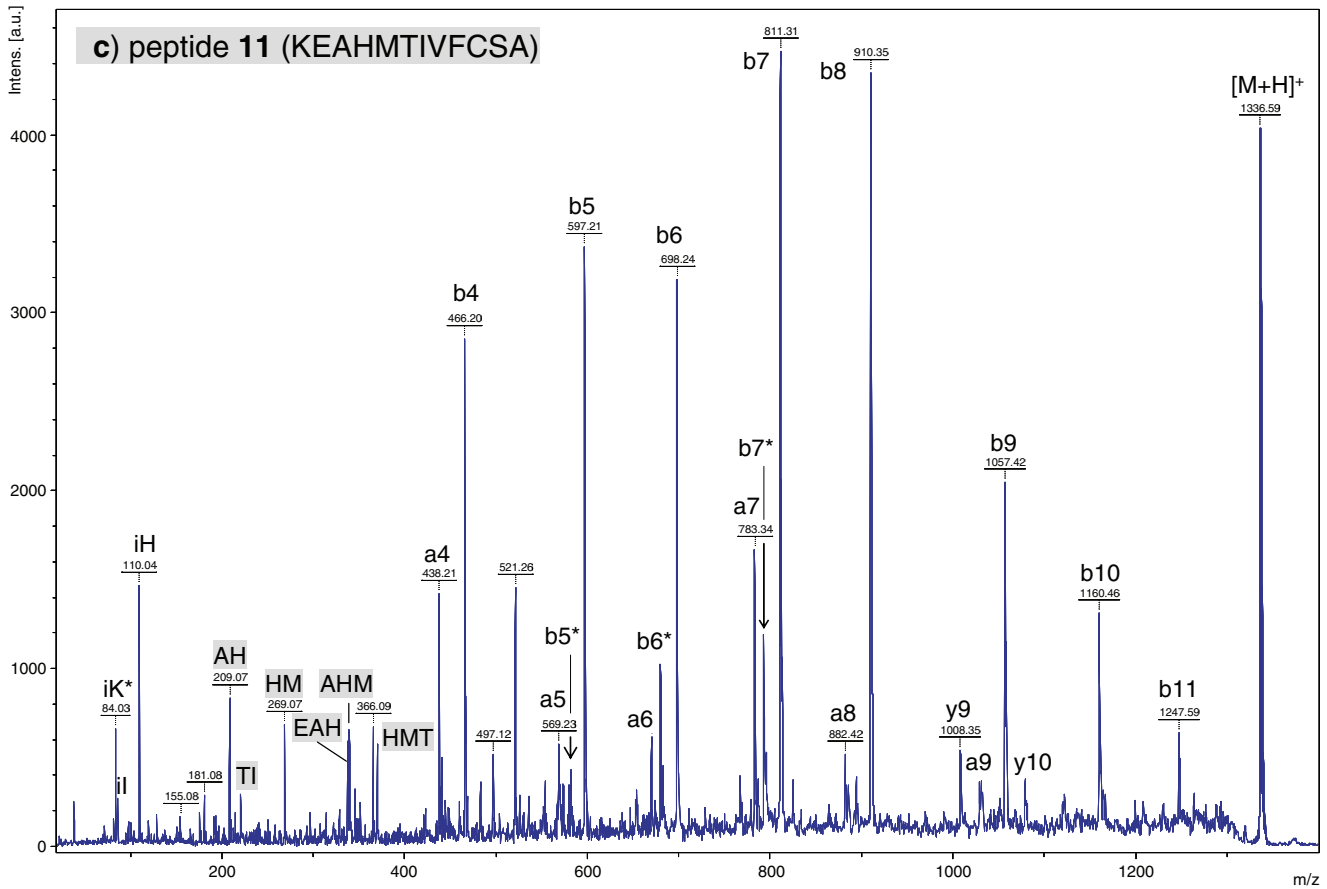


Figure 2. LID/CID MALDI MS/MS spectra of (a) peptide 5 (KAFRLG), (b) peptide 8 (KADFPQLMV), and (c) peptide 11 (KEAHMTIVFCSA)

Occurrence

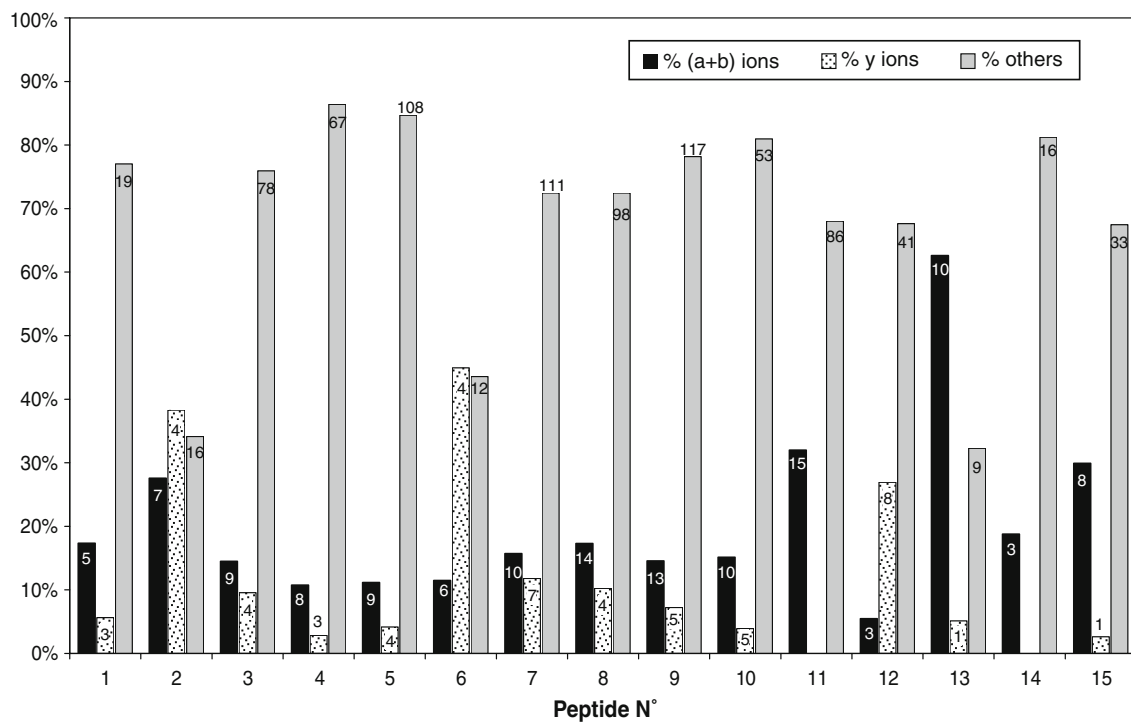


Figure 3. Occurrence of peptide fragment ions in ESI-QqTOF experiments from CID of the (M + H)⁺ precursor ion (the number of fragment ions detected are indicated for each population)

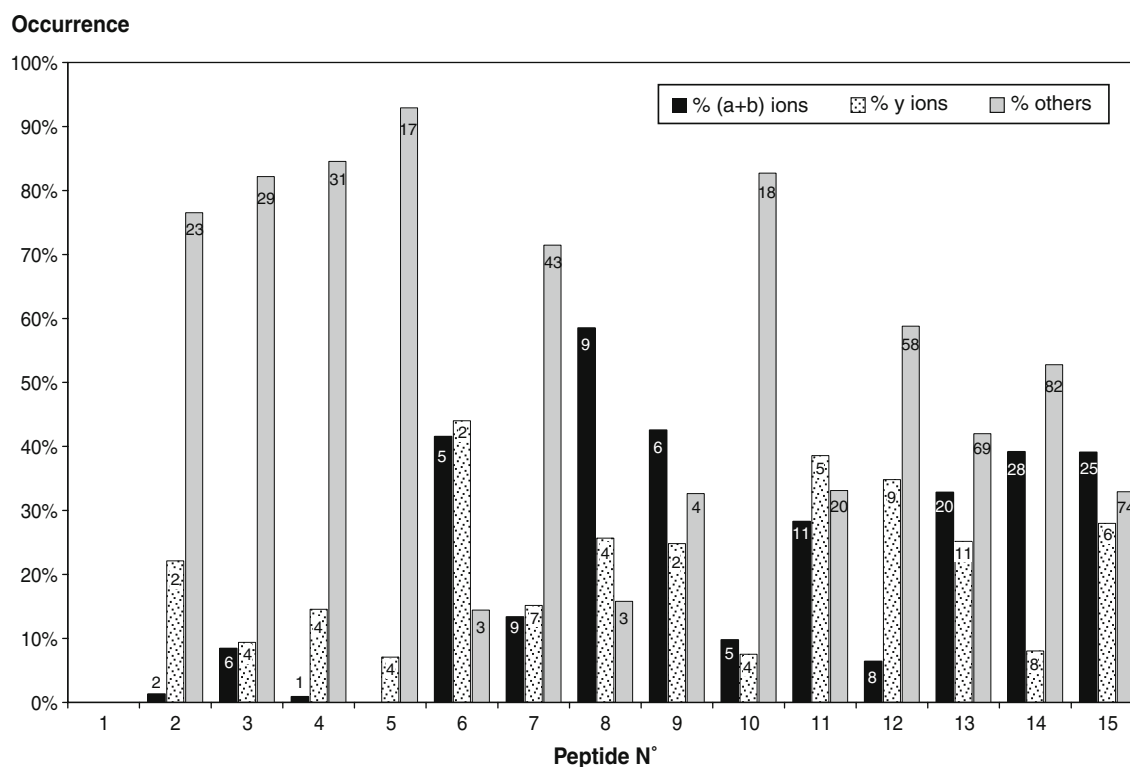


Figure 4. Occurrence of peptide fragment ions in ESI-QqTOF experiments from CID of the $(M + 2H)^{2+}$ precursor ion (the number of fragment ions detected are indicated for each population)

from the arginine side chain, duplicating the C-terminal signals and thus spreading the sequence information across multiple ions. Surprisingly, only in LID/CID MALDI-MS/MS spectra, two other neutral losses of molecules weighing 42 and 59 Da from the $(M + H)^+$ ion were seen solely with arginine-containing peptides (Fig. 2a, peptide 5). The protonated guanidinium may be involved in such fragmentations, as depicted in Scheme 1. The same results were observed whatever the position of arginine within the Lys-N peptide chain (Fig. S3 of the ESM, peptide 10). Such dissociation behavior has not been observed previously in the literature, irrespective of the nature of the peptide (i.e., for tryptic and nontryptic peptides [20, 23, 24]), indicating a specific fragmentation behavior of arginine-containing Lys-N peptides in MALDI-TOF/TOF experiments. The loss of 42 and/or 59 Da from the protonated precursor ion constituted a mass tag indicating the presence of arginine in the Lys-N peptide chain. Taking into account that this residue may cause difficulties during sequence assignment, the detection of the 42/59 Da loss could trigger the corresponding MALDI-MS/MS spectrum to be discarded, instead of relying on a chromatographic step as reported in the literature [15].

Proline (Peptides 6, 8, 9, 15)

As expected from literature data [39–41], as long as a proline residue was present in the peptide, whatever its

location within the sequence, the cleavage of the amide bond N-terminal to this residue was systematically observed. As already described, the presence of an acidic residue next to the proline (like the NP dipeptide in peptide 15) favored the rupture of the proline amide bond [44, 45]. In contrast to literature data on Lys-N peptides [15], the preferential formation of the corresponding y ion was not systematic in that situation; the production of internal sequences predominated (Fig. S4 of the ESM, peptides 6, 9). Both peptides showed several proline-containing internal ions, with this residue being positioned at the N-terminus, but only one also exhibited the corresponding y ion. For peptides containing both arginine and proline (peptide 15 in Fig. S5 of the ESM), the sequence identification from the recorded MS/MS spectra was even more difficult to interpret, as the effects of arginine and proline were combined (more y ions than b ions, loss of neutrals, a very abundant y ion due to the facile rupture of the proline amide bond, internal sequence ions).

Histidine (Peptides 2, 3, 7, 11)

Histidine, through its protonated side chain, directs a specific backbone cleavage that enhances the production of fragment ions terminating at this residue, especially when histidine is close to the C-terminus [24, 26, 36–38]. In the studied Lys-N peptides, the contribution of

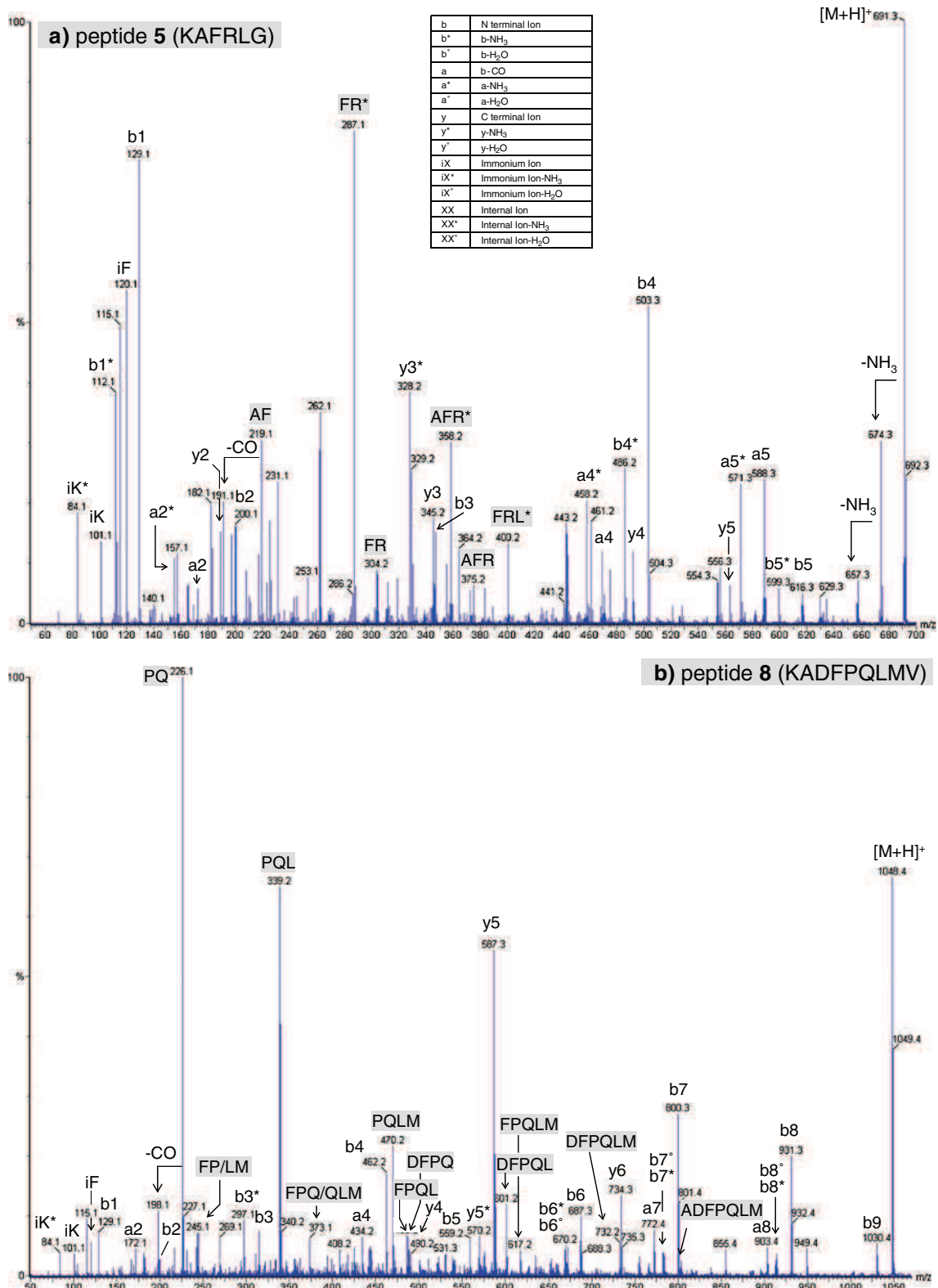


Figure 5. Continued on next page

histidine was found to be very similar to that of proline. A lot of non-direct sequence ions related to internal sequences were obtained regardless of the ionization method and precursor ion activation (MS/MS spectra of

peptide **11** shown in Figs. 2c, 5c and 6c) that was used. Just as in the literature data [24, 26, 36–38], histidine was found to trigger the rupture of the amide bonds next to it, or even peptide bonds in the close vicinity. The

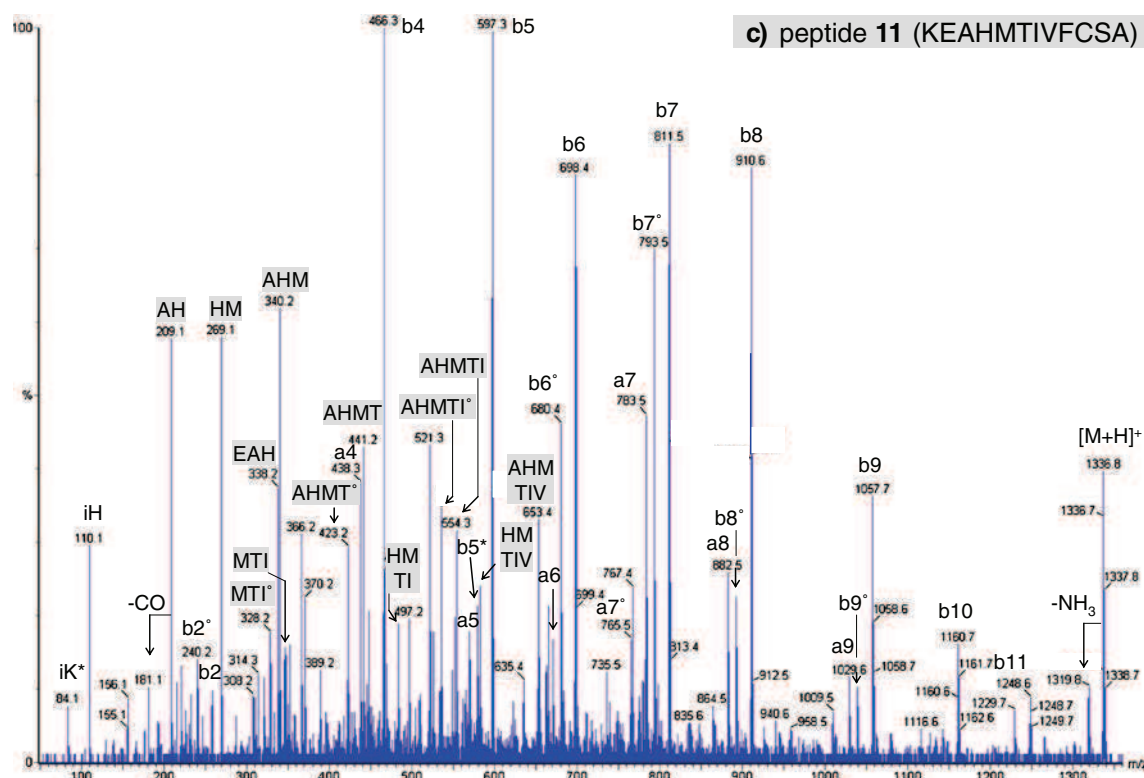


Figure 5. ESI MS/MS spectra upon CID of the $(M + H)^+$ precursor ion of (a) peptide 5 (KAFRLG), (b) peptide 8 (KADFPQLMV), and (c) peptide 11 (KEAHMTIVFCSA)

production of the corresponding y ion by cleavage of the amide bond N-terminal to histidine was found to be quite abundant in most of the peptides, especially the small ones (peptides 2, 3, 7, see Figs. S6a and S6b of the ESM for peptide 7). Also, a highly abundant immonium ion at m/z 110 was observed for all histidine-containing peptides, with this low mass signal being very intense in MALDI-TOF/TOF mass spectra.

Lysine at the N-Terminal Position (All Peptides)

The lysine immonium ion at m/z 101 and its related ion at m/z 84 obtained through the loss of ammonia were also very frequently produced. The ion detected at m/z 129 was produced by an intramolecular nucleophilic attack of the ϵ -NH₂ moiety on the first C-terminal amide bond [28]. This ion is sometimes referred to as a “b1 ion.” Such feature ions generated from the lysine residue (m/z 84/101/129) were quite abundant in nearly all recorded LID/CID MALDI MS/MS spectra. These ions were also detected in ESI-MS/MS experiments, but their signals were not very intense, as they were produced together with other immonium ions (from H, F, L, I, ...). The competitive production of the b2 ion through the oxazolone pathway was very scarce. Of the 15 MALDI-MS/MS recorded spectra, only eight produced the b2 ion, which was not abundant. Similarly, the same eight peptides produced the b2 ion in both sets of CID ESI-

MS/MS experiments, while four other sequences also produced the b2 ion, although only from singly charged or doubly charged precursor ion dissociation. In order to assess if this behavior is specific to Lys-N peptides, we performed a comparison between tryptic and nontryptic sequences that had already been studied in the laboratory [16]. Upon LID/CID dissociation, peptides that contain lysine inside their chains were found to generate the same feature ions (m/z 84/110/129, with the latter generally being the most abundant) as Lys-N peptides. However, tryptic peptides with lysine at the C-terminal position did not produce these ions. Such behavior is illustrated in the ESM (Fig. S7). Overall, the lysine tag ions that were clearly detected in MALDI-TOF/TOF spectra (m/z 84/110/129) provided unambiguous information on lysine located anywhere within the sequence (nontryptic peptides), except at the C-terminal position (tryptic peptides).

Acidic Amino Acids (Peptides 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15)

Selective cleavage of the amide bond adjacent to the acidic residues (C-side) was reported in the literature for protonated peptides with ionizing protons sequestered at basic sites [25, 26]. In the studied Lys-N peptides, the contributions of aspartic acid and glutamic acid were minor compared to those of basic residues. Except when

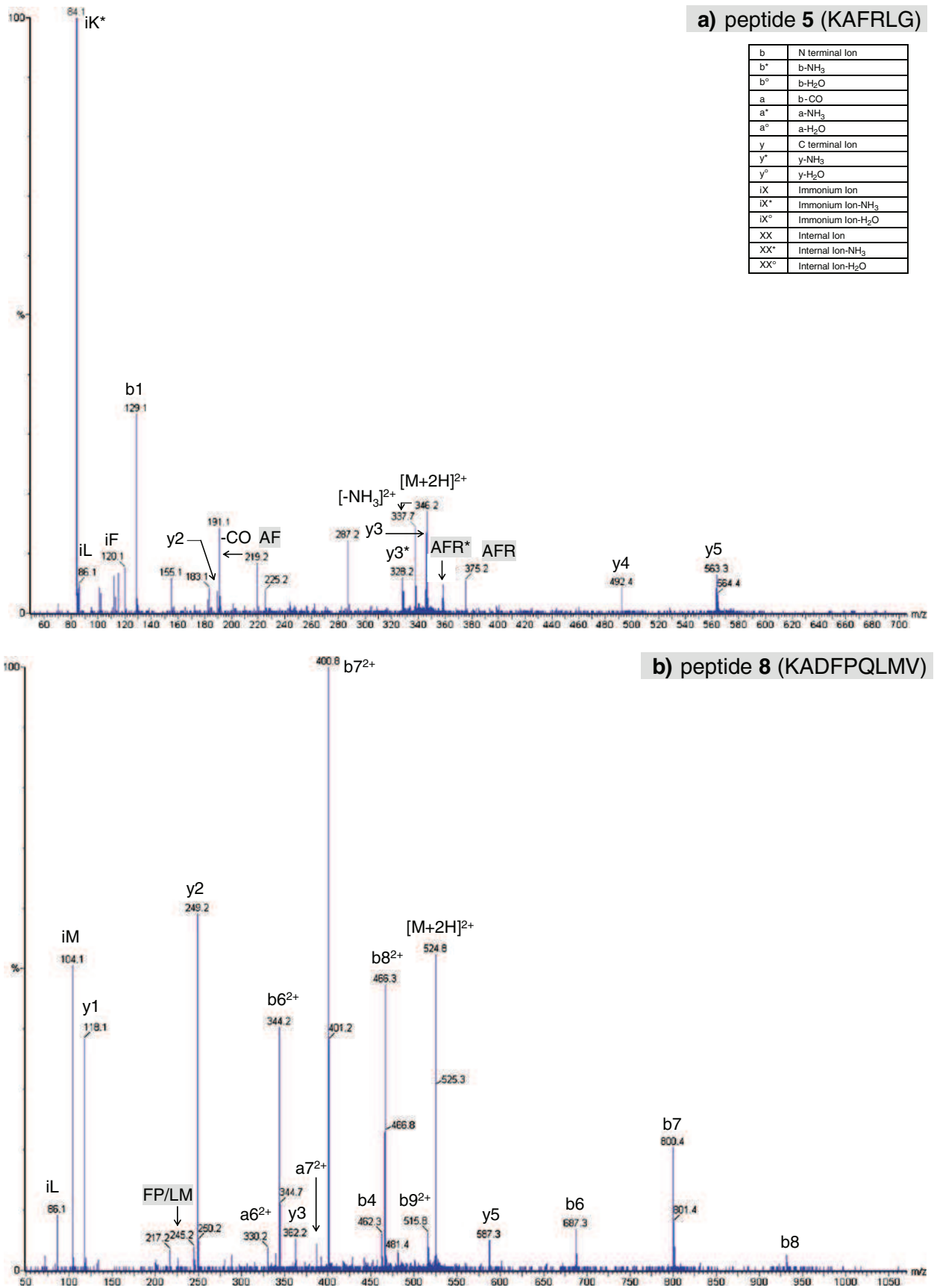
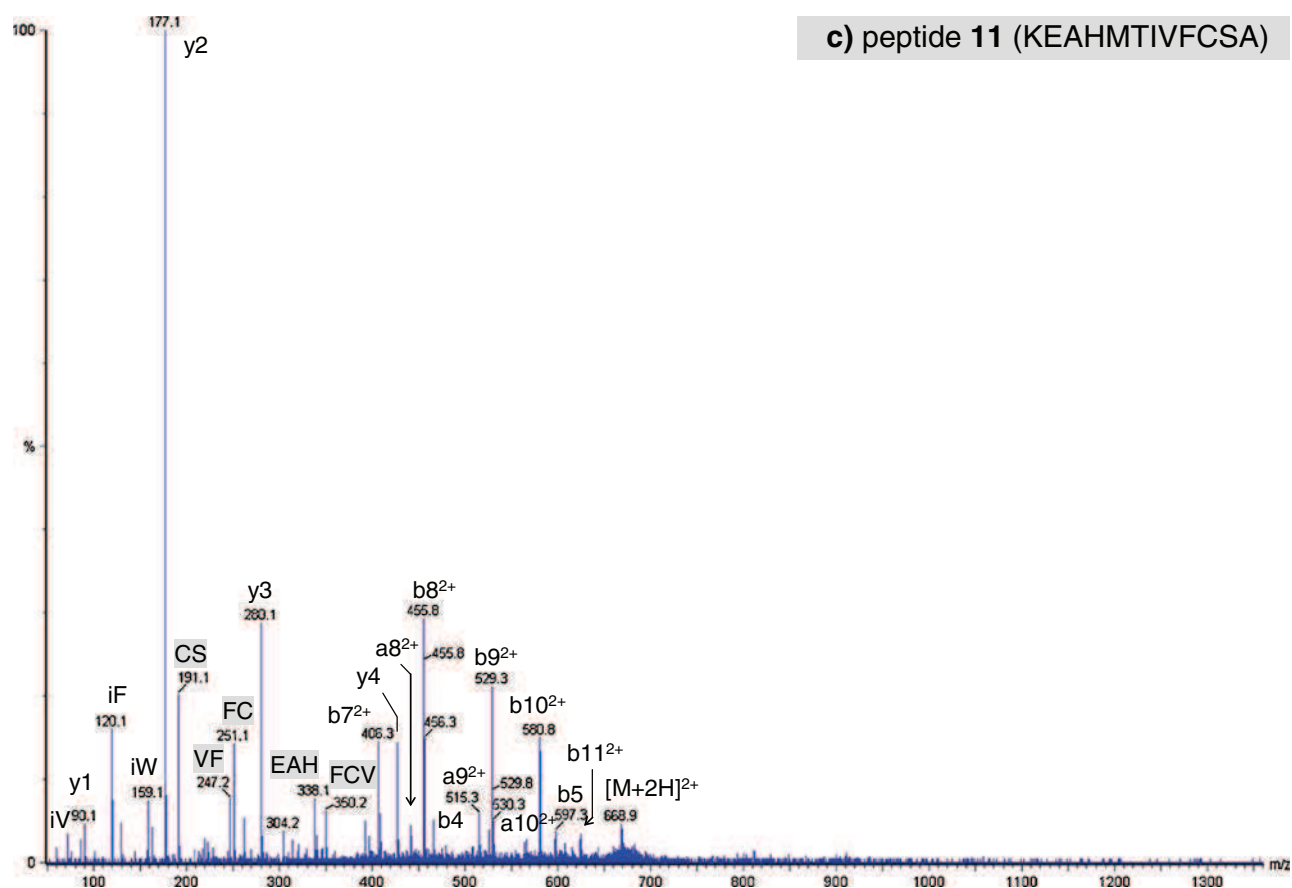


Figure 6. Continued on next page



c) peptide 11 (KEAHMTIVFCSA)

Figure 6. ESI MS/MS spectra upon CID of the $(M + 2H)^{2+}$ precursor ion of (a) peptide 5 (KAFRLG), (b) peptide 8 (KADFPQLMV), and (c) peptide 11 (KEAHMTIVFCSA)

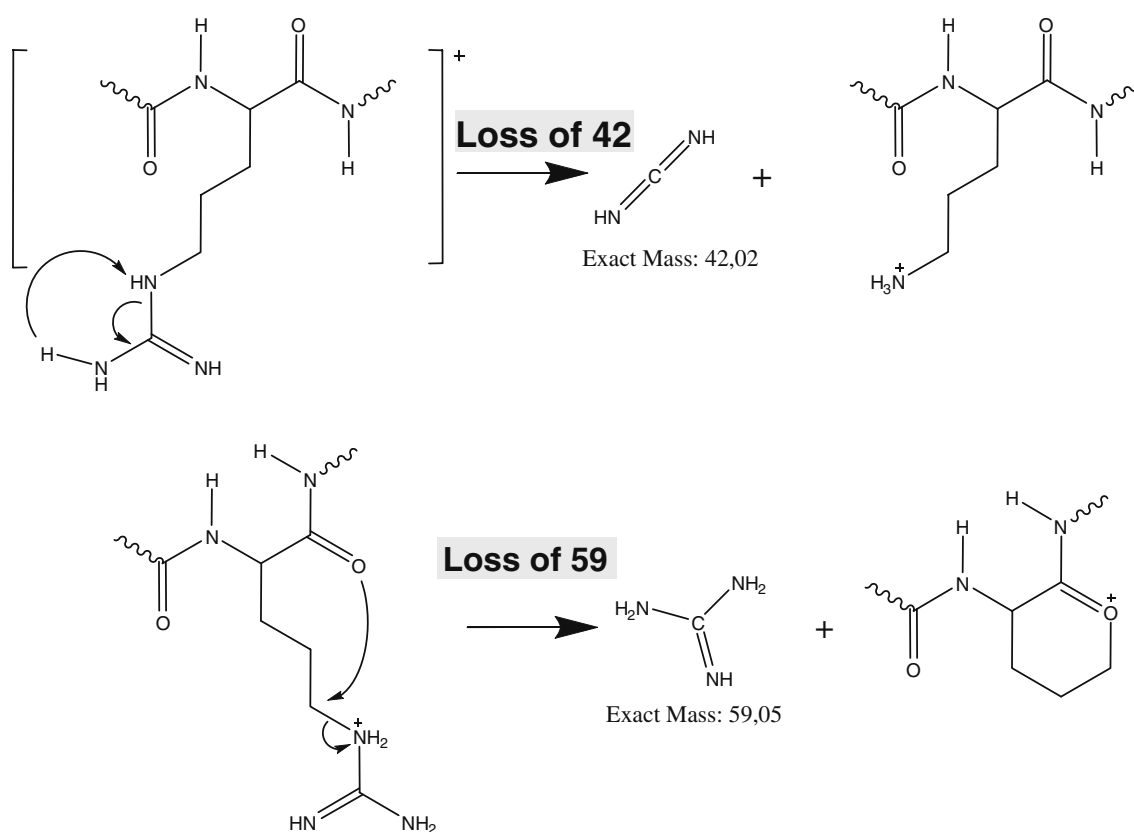
located next to proline in peptide 15, which increased the lability of the DP peptide bond [44, 45], no specific fragmentation behavior was observed. Peptides 8 and 9 (which differ only by the substitution of the N-terminal dipeptide KA for KE) behaved similarly, indicating that there was no influence on the fragmentation pattern of a potential salt bridge between the adjacent basic and acidic side chains.

In summary, nearly half of the studied Lys-N peptides (peptides 1, 4, 5, 10, 12, 14, 15) exhibited a lot of non-direct sequence fragment ions upon MALDI-TOF/TOF and ESI-QqTof, which accounted for the most intense group of signals that hamper facile sequence reading (Figs. 1, 3 and 4). Among all of the ions that were clustered in that category, low-mass ions issued from the N-terminal lysine residue (m/Z 84/101/129) largely accounted for the non-direct sequence ion intensity. Proline was the second most important contributor to this class of non-direct sequence ions, and produces a lot of internal sequences. Finally, other non-direct sequence ions, which were largely related to the truncated part of the peptide chain that was not triggered by proline but mainly by histidine, together with the loss of ammonia and guanidine from the arginine side chain, also contributed to this populated category that may compli-

cate MS/MS data deciphering. It should be noted that some sequence scrambling was also observed in a few cases, but this only led to high-mass b type ions.

CID of $(M+H)^+$ vs $(M+2H)^{2+}$ Precursor Ions

According to the mobile proton model [7, 8], ionizing protons must be transferred intramolecularly from basic sites to amide bonds along the peptide backbone in order to initiate the production of b and y ions. Thus, nonselective peptide backbone fragmentations occur when the number of ionizing charges at least equals the number of arginines (which are known to strongly sequester the proton) [23, 24]. In general, doubly charged tryptic peptides are dissociated more easily than the singly charged species since arginine is only located at the C-terminus, so one of the two ionizing protons is therefore available to trigger amide bond fragmentations. In the studied Lys-N peptides, arginine is not restricted at the C-terminus position, and the impact of this residue on ionizing proton mobility is thus crucial. As discussed previously, the loss of ammonia and water from a/b/y fragment ions increased in the case of doubly charged precursor ion dissociation. This behavior was reinforced



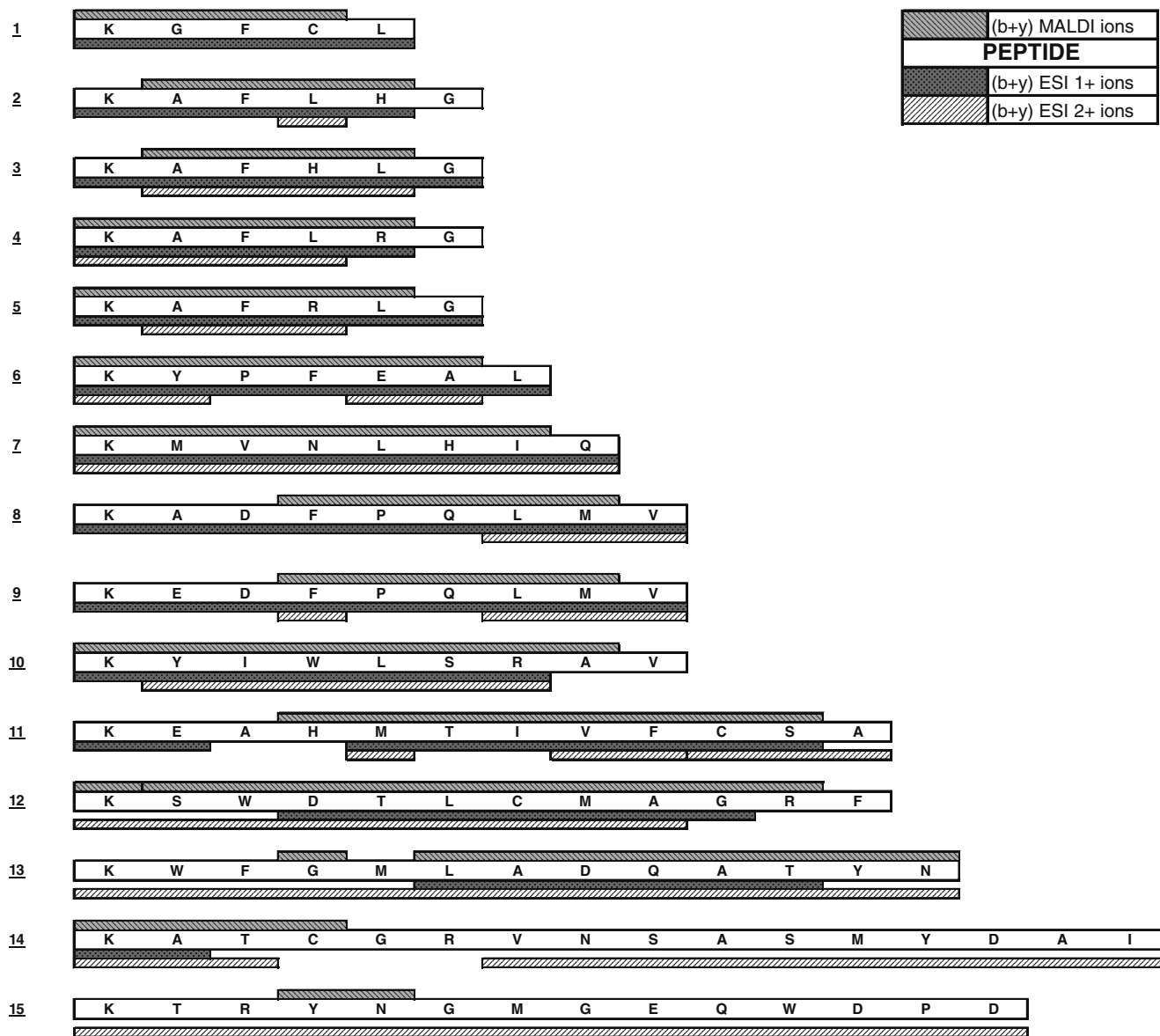
Scheme 1. Fragmentation of protonated guanidinium for arginine-containing peptides observed in LID/CID MALDI-TOF/TOF experiments

when an arginine residue was present. Another difference came from the detection of small y ions (such as y_1 , y_2 , and y_3) that were never (or were very scarcely) seen from $(M+H)^+$ dissociation but were very often observed from the doubly protonated parent ion. Moreover, the b ion series that was not systematically detected from the singly charged precursor ion was more thoroughly produced from the $(M+2H)^{2+}$ dissociation; these N-terminal ions were mainly produced as doubly charged ions. The presence of an arginine in the vicinity of the C-terminal part of the studied peptide prevented such massive production of doubly charged b ions, thus increasing the detection of singly charged b and y ions (Fig. S3 of the ESM). Feature ions of lysine residues (at m/z 84/101/129) were not systematically produced from the doubly protonated parent ions. At the same time, the detection of b_2 ion was observed more frequently. Finally, the effect of proline was very limited, the dissociation of the amide bond N-terminal to this amino acid never dominated the MS/MS spectra of proline-containing peptide $(M+2H)^{2+}$ ions. In general, a high number of internal sequences triggered by the presence of proline and histidine residues—and, more surprisingly, by some other residues—were detected, increasing the population of non-direct sequence ions. These b -type ions were much more abundant than those detected from

singly charged parent ions in both MALDI and ESI MS/MS dissociation experiments of $(M+H)^+$ ions.

Comparison of Lys-N Peptide Sequence Coverage

For each peptide, the detected b/y ions were combined in order to assess the peptide sequence tags that were unambiguously identified with each of the investigated techniques, as depicted in Scheme 2. The sequencing efficiency was much more peptide dependent than influenced by the MS/MS conditions. As expected from the mobile proton model, peptides bearing an arginine and/or a proline were better fragmented from the doubly charged precursor ion in ESI-QqTOF analyses. For other samples, choosing singly charged parent ion dissociation in MALDI or ESI-QqTOF experiments was found to be more judicious, as fewer non-direct sequence ions were produced, leading to less-crowded MS/MS spectra and thus more easily detected b - or y -ion series. Also, knowledge of the N-terminal amino acid (i.e., lysine) allowed the nature of the N-terminal dipeptide to be determined through the detection of the b_2 ion, even when the complementary y_{n-1} was not produced. The production of rather abundant low-mass ions derived from the lysine immonium ion (at m/z 84/101/129) confirmed the presence of this residue at the N-terminal position, thus providing a tool for identifying any peptides



Scheme 2. Lys-N peptide sequence coverage in all MS/MS experiments

from the N-terminal part of the studied protein in a proteolytic Lys-N digest (lysine is just one of over 20 naturally occurring amino acids that can occur at this location).

Conclusion

The MS/MS behavior of Lys-N mimicking peptides under various conditions showed that the influence of basic residues (arginine and to a lesser extent histidine) as well as proline on the sequencing efficiency must be considered. The massive production of b ions was not systematically retrieved, whichever dissociation technique (LID, CID) was used. Indeed, the peptide sequence was found to greatly influence the fragmentation output, especially through the selection of the singly or doubly protonated precursor.

Whereas arginine-free Lys-N peptides could be easily sequenced via MALDI LID/CID experiments, ESI-QqTOF analyses allowing the dissociation of the doubly charged precursor ion were preferred for arginine-containing chains. For the other peptides, this method more frequently yielded competitive fragmentation pathways leading to abundant non-direct sequence ions such as immonium ions, internal sequences, scrambled ions, and the loss of neutral molecules from side chains. Less-crowded MS/MS spectra with more intense sequence signals (a/b and y ions) were thus obtained with MALDI-TOF/TOF compared to ESI-QqTOF for Lys-N peptides that did not bear arginine. Moreover, the detection of specific low-mass ions with MALDI-TOF/TOF indicated the presence of a lysine residue at the N-terminal position, allowing Lys-N peptides produced during protein digestion from the native N-terminal protein part to be identified.

Acknowledgments

We thank G. Fromenty for participating in the ESI-QqTOF experiments.

References

- Mann, M., Aebersold, R.: Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. **422**, 198–207 (2003)
- Olsen, J.V., Ong, S.-E., Mann, M.: Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol. Cell. Proteomics*. **3**, 608–614 (2004)
- Baldwin, M.A.: Protein identification by mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics*. **3**, 1–9 (2004)
- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., Cottrell, J.S.: Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. **20**, 3551–3567 (1999)
- Frank, A.M., Pevzner, P.A.: PepNovo: de novo peptide sequencing via probabilistic network modeling. *Anal. Chem.* **77**, 964–973 (2005)
- Ma, B., Zhang, K., Hendrie, C., Liang, C., Li, M., Doherty-Kirby, A., Lajoie, G.: PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **17**, 2337–2342 (2003)
- Dongré, A.R., Jones, J.L., Somogyi, A., Wysocki, V.H.: Influence of peptide composition, gas-phase basicity and chemical modification on fragmentation efficiency: evidence for the mobile proton model. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **118**, 8365–8374 (1996)
- Paizs, B., Suhai, S.: Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass. Spectrom. Rev.* **24**, 508–548 (2005)
- Boyd, R., Somogyi, A.: The mobile proton hypothesis in fragmentation of protonated peptides: a perspective. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **21**, 1275–1278 (2010)
- Kapp, E.A., Schutz, F., Reid, G.E., Eddes, J.S., Moritz, R.L., O'Hair, R. A., Speed, T.P., Simpson, R.J.: Mining a tandem mass spectrometry database to determine the trends and global factors influencing peptide fragmentation. *Anal. Chem.* **75**, 6251–6264 (2003)
- Baudet, M., Ortet, P., Gaillard, J.-C., Fernandez, B., Guérin, P., Enjalbal, C., Subra, G., de Groot, A., Barakat, M., Dedieu, A., Armengaud, J.: Proteomic-based refinement of *Deinococcus deserti* genome annotation reveals an unwonted use of non-canonical translation initiation codons. *Mol. Cell Proteomics*. **9**, 415–426 (2010)
- Nonaka, T., Hashimoto, Y., Takio, K.: Kinetic characterization of lysine-specific metalloendopeptidases from *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies. *J. Biochem.* **124**, 157–162 (1998)
- Hohmann, L., Sherwood, C., Eastham, A., Peterson, A., Eng, J.K., Eddes, J. S., Shteynberg, D., Martin, D.B.: Proteomic analyses using *Grifola frondosa* metalloendopeptidase Lys-N. *J. Proteome Res.* **8**, 1415–1422 (2009)
- Taouatas, N., Heck, A.J.R., Mohammed, S.: Evaluation of metalloendopeptidase Lys-N protease performance under different sample handling conditions. *J. Proteome Res.* **9**, 4282–4288 (2010)
- Taouatas, N., Drugan, M.M., Heck, A.J.R., Mohammed, S.: Straightforward ladder sequencing of peptides using Lys-N metalloendopeptidase. *Nat. Methods* **5**, 405–407 (2008)
- Boersema, P.J., Taouatas, N., Altelaar, A.F., Gouw, J.W., Ross, P.L., Pappin, D.J., Heck, A.J., Mohammed, S.: Straightforward and de novo peptide sequencing by MALDI-MS/MS using a Lys-N metalloendopeptidase. *Mol. Cell Proteomics*. **8**, 650–660 (2009)
- Carabetta, V.J., Li, T., Shakya, A., Todd, M.G., Cristea, I.M.: Integrating Lys-N proteolysis and N-terminal guanidination for improved fragmentation and relative quantification of singly-charged ions. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **21**, 1050–1060 (2010)
- Link, A.J., Eng, J., Schieltz, D.M., Carmack, E., Mize, G.J., Morris, D. R., Garvik, B.M., Yates III, J.R.: Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **17**, 676–682 (1999)
- Mouls, L., Aubagnac, J.-L., Martinez, J., Enjalbal, C.: Low energy peptide fragmentations in ESI-Q-ToF type mass spectrometers. *J. Proteome Res.* **6**, 1378–1391 (2007)
- Shenar, N., Sommerer, N., Martinez, J., Enjalbal, C.: Comparison of LID versus CID activation modes in tandem mass spectrometry of peptides. *J. Mass. Spectrom.* **44**, 621–632 (2009)
- Stewart, J.M., Young, J.D.: Solid phase peptide synthesis, 2nd edn. Pierce Chemical Company, Rockford, IL (1984)
- Swiss Institute of Bioinformatics: Swiss-Prot archive. <http://www.expasy.ch/sprot/>
- Tsapraillis, G., Nair, H., Somogyi, A., Wysocki, V.H., Zhong, W., Futrell, J.H., Summerfield, S.G., Gaskell, S.J.: Influence of secondary structure on the fragmentation of protonated peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 5142–5154 (1999)
- Wysocki, V.H., Tsapraillis, G., Smith, L.L., Breci, L.A.: Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *J. Mass. Spectrom.* **35**, 1399–1406 (2000)
- Tsapraillis, G., Somogyi, A., Nikolaev, E.N., Wysocki, V.H.: Refining the model for selective cleavage at acidic residues in arginine-containing protonated peptides. *Int. J. Mass. Spectrom.* **195/196**, 467–479 (2000)
- Huang, Y., Wysocki, V.H., Tabb, D.L., Yates III, J.R.: The influence of histidine on cleavage C-terminal to acidic residues in doubly protonated tryptic peptides. *Int. J. Mass. Spectrom.* **219**, 233–244 (2002)
- Molesworth, S., Osburn, S., Van Stipdonk, M.J.: Influence of amino acid side chains on apparent opening of cyclic b₅ ions. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **21**, 1028–1036 (2010)
- O'Hair, R.A.J.: The role of nucleophile–electrophile interactions in the unimolecular and bimolecular gas-phase ion chemistry of peptides and related systems. *J. Mass. Spectrom.* **35**, 1377–1381 (2000)
- Schlosser, A., Lehmann, W.D.: Five-membered ring formation in unimolecular reactions of peptides: a key structural element controlling low-energy collision-induced dissociation of peptides. *J. Mass. Spectrom.* **35**, 1382–1390 (2000)
- Paizs, B., Suhai, S., Hargittai, B., Hruby, V.J., Somogyi, A.: Ab initio and MS/MS studies on protonated peptides containing basic and acidic amino acid residues: I. Solvated proton vs. salt-bridged structures and the cleavage of the terminal amide bond of protonated RD-NH₂. *Int. J. Mass. Spectrom.* **219**, 203–232 (2002)
- Farrugia, J.M., O'Hair, R.A.J.: Involvement of salt bridges in a novel gas phase rearrangement of protonated arginine-containing dipeptides, which precedes fragmentation. *Int. J. Mass. Spectrom.* **222**, 229–242 (2003)
- Bleiholder, C., Osburn, S., Williams, T.D., Suhai, S., Van Stipdonk, M., Harrison, A.G., Paizs, B.: Sequence-scrambling fragmentation pathways of protonated peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 17774–17789 (2008)
- Molesworth, S., Van Stipdonk, M.J.: Apparent inhibition by arginine of macrocyclic b ion formation from singly charged protonated peptides. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **21**, 1322–1328 (2010)
- Yalcin, T., Harrison, A.G.: Ion chemistry of protonated lysine derivatives. *J. Mass. Spectrom.* **31**, 1237–1243 (1996)
- Kish, M.M., Wesdemiotis, C.: Selective cleavage at internal lysine residues in protonated vs. metalated peptides. *Int. J. Mass. Spectrom.* **227**, 191–203 (2003)
- Farrugia, J.M., Taverner, T., O'Hair, R.A.J.: Side-chain involvement in the fragmentation reactions of protonated methyl esters of histidine and its peptides, which precedes fragmentation. *Int. J. Mass. Spectrom.* **209**, 99–112 (2001)
- Tsapraillis, G., Nair, H., Zhong, W., Kuppanan, K., Futrell, J.H., Wysocki, V.H.: A mechanistic investigation of the enhanced cleavage at histidine in the gas-phase dissociation of protonated peptides. *Anal. Chem.* **76**, 2083–2094 (2004)
- Bythell, B.J., Knapp-Mohammady, M., Paizs, B., Harrison, A.G.: Effect of the His residue on the cyclization of b ions. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **21**, 1352–1363 (2010)
- Vaisar, T., Urban, J.: Probing the proline effect in CID of protonated peptides. *J. Mass. Spectrom.* **31**, 1185–1187 (1996)
- Breci, L.A., Tabb, D.L., Yates, J.R., Wysocki, V.H.: Cleavage N-terminal to proline: analysis of a database of peptide tandem mass spectra. *Anal. Chem.* **75**, 1963–1971 (2003)
- Unnithan, A.G., Myer, M.J., Veale, C.J., Danell, A.S.: MS/MS of protonated polyproline peptides: the influence of N-terminal protonation on dissociation. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **18**, 2198–2203 (2007)
- Mouls, L., Subra, G., Aubagnac, J.-L., Martinez, J., Enjalbal, C.: Tandem mass spectrometry of amidated peptides. *J. Mass. Spectrom.* **41**, 1470–1483 (2006)
- Bythell, B.J., Suhai, S., Somogyi, A., Paizs, B.: Proton-driven amide bond-cleavage pathways of gas-phase peptide ions lacking mobile protons. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 14057–14065 (2009)
- Maux, D., Enjalbal, C., Martinez, J., Aubagnac, J.-L.: New example of a proline-induced fragmentation in ESI mass spectrometry of peptides. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **16**, 1470–1475 (2002)
- Sachon, E., Clodic, G., Blasco, T., Jacquot, Y., Bolbach, G.: In-source fragmentation of very labile peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **81**, 8986–8992 (2009)

1.4.2. Illustrations complémentaires

Peptide synthesis.

La synthèse des peptides présentée dans le "supporting information" original n'a pas été incluse dans cette partie du manuscrit. Elle est consultable dans l'Annexe 3 – synthèse peptidique sur support semi-automatisée.

Figure S1. Occurrence of amino acids in the prepared peptides

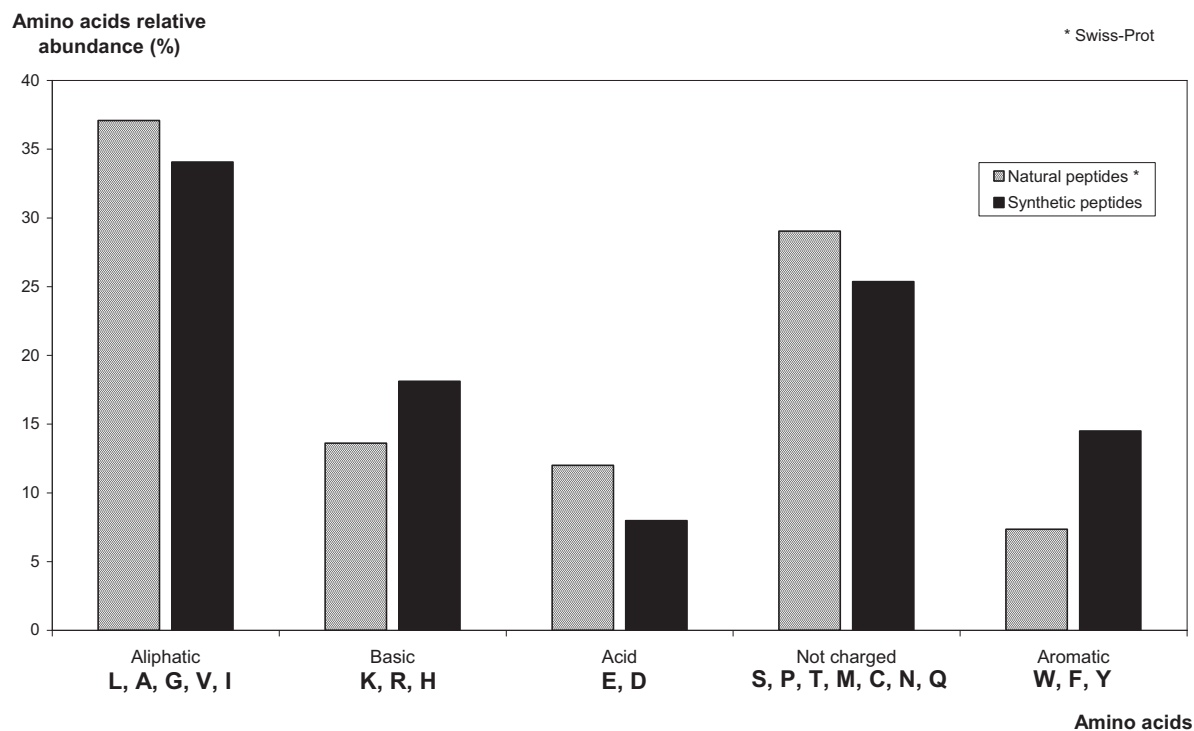


Figure S2. MALDI MS/MS spectra of peptide 13 obtained upon a) LID/CID and b) LID conditions

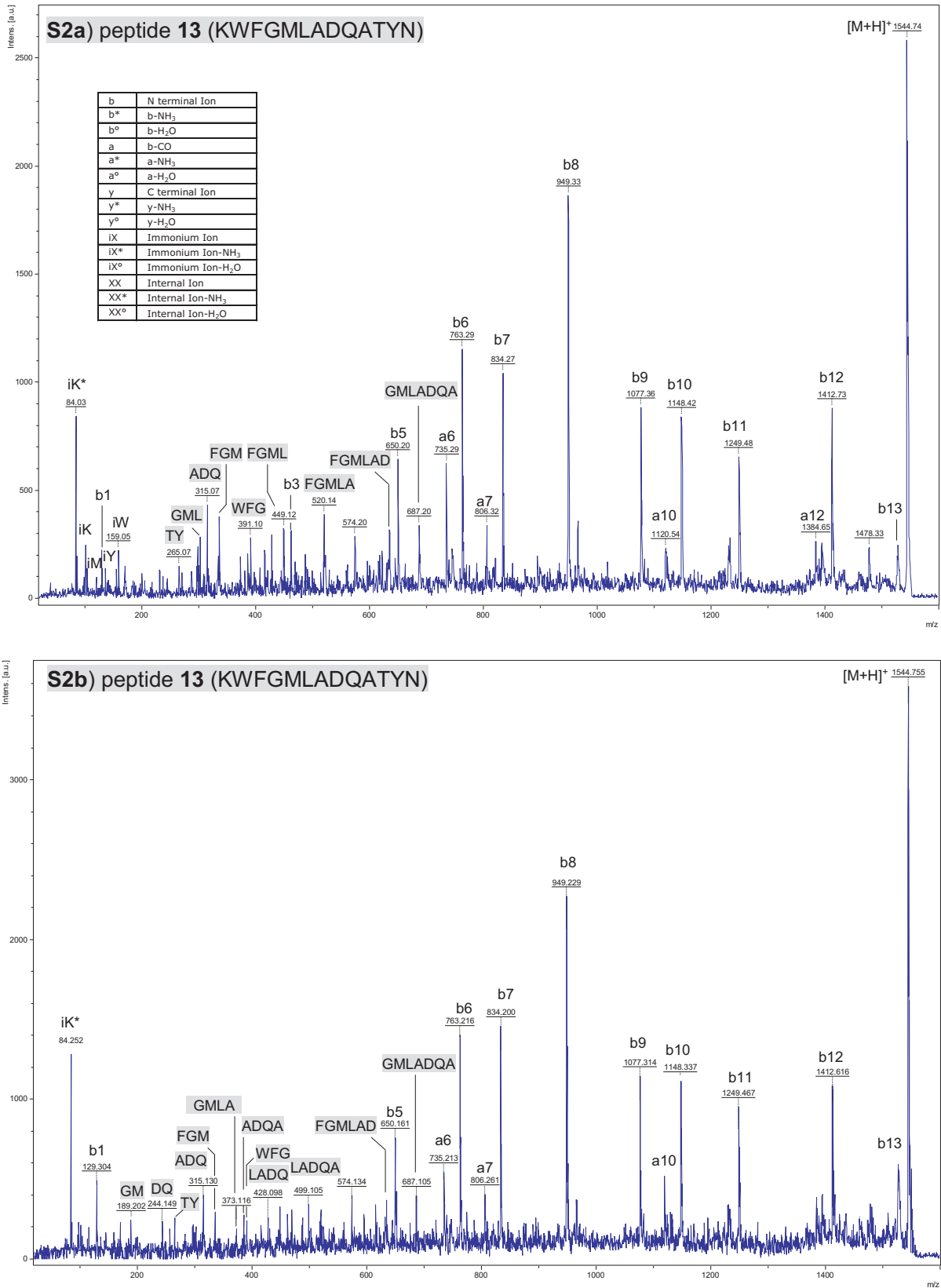


Figure S3. LID/CID MALDI MS/MS spectrum of arginine-containing peptide 10

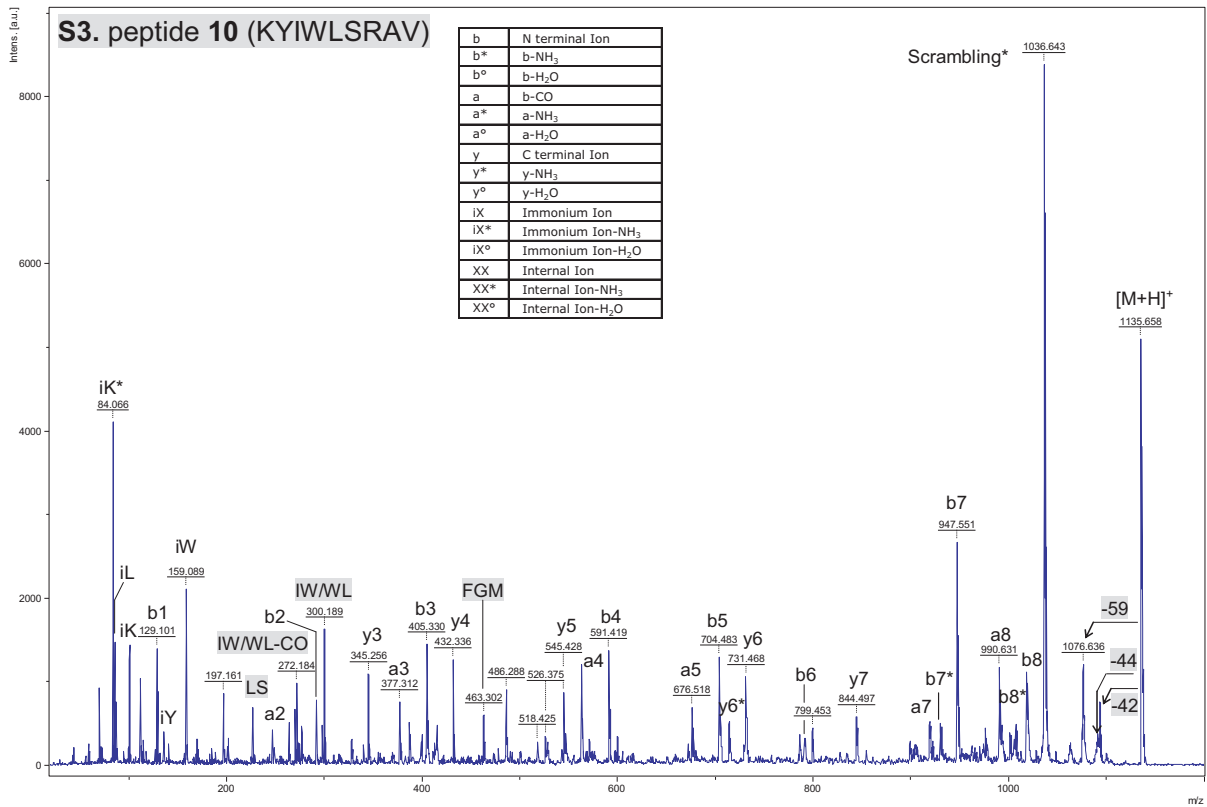
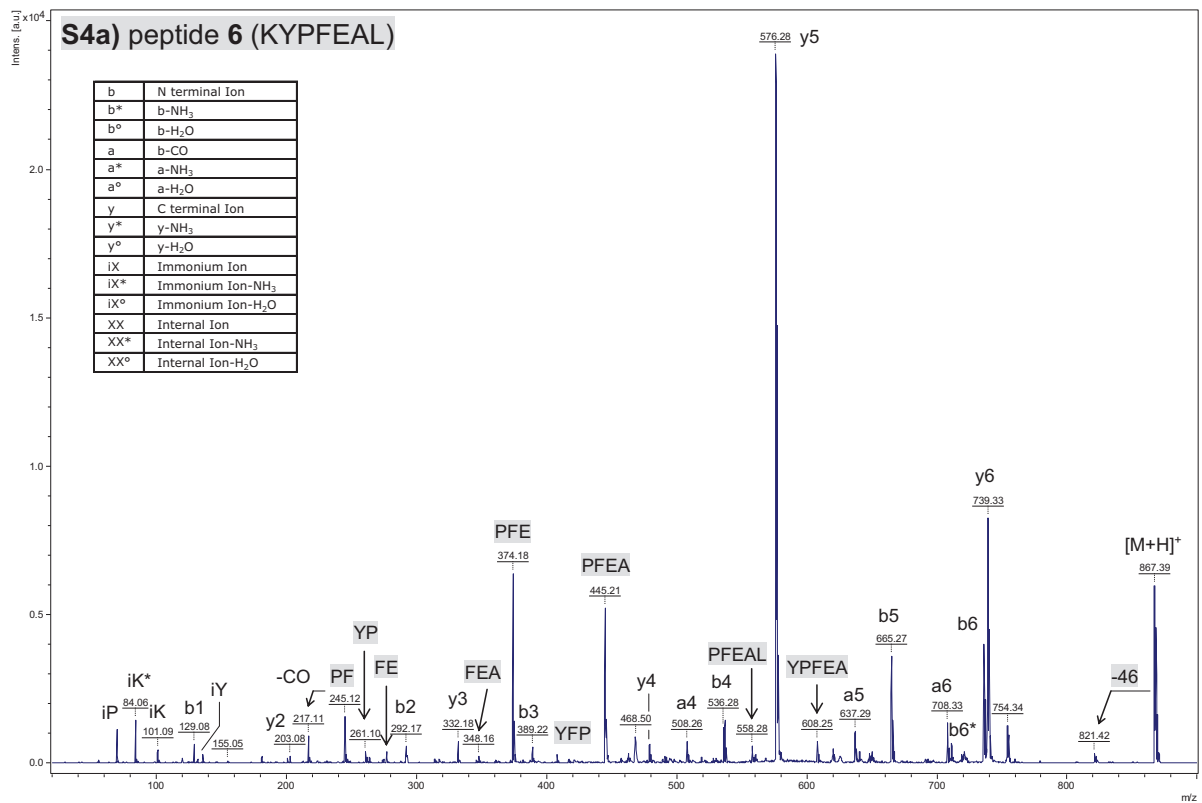


Figure S4. LID/CID MALDI MS/MS spectra of proline-containing peptides a) peptide 6 (KYPFEAL), b) peptide 9 (KEDFPQLMV).



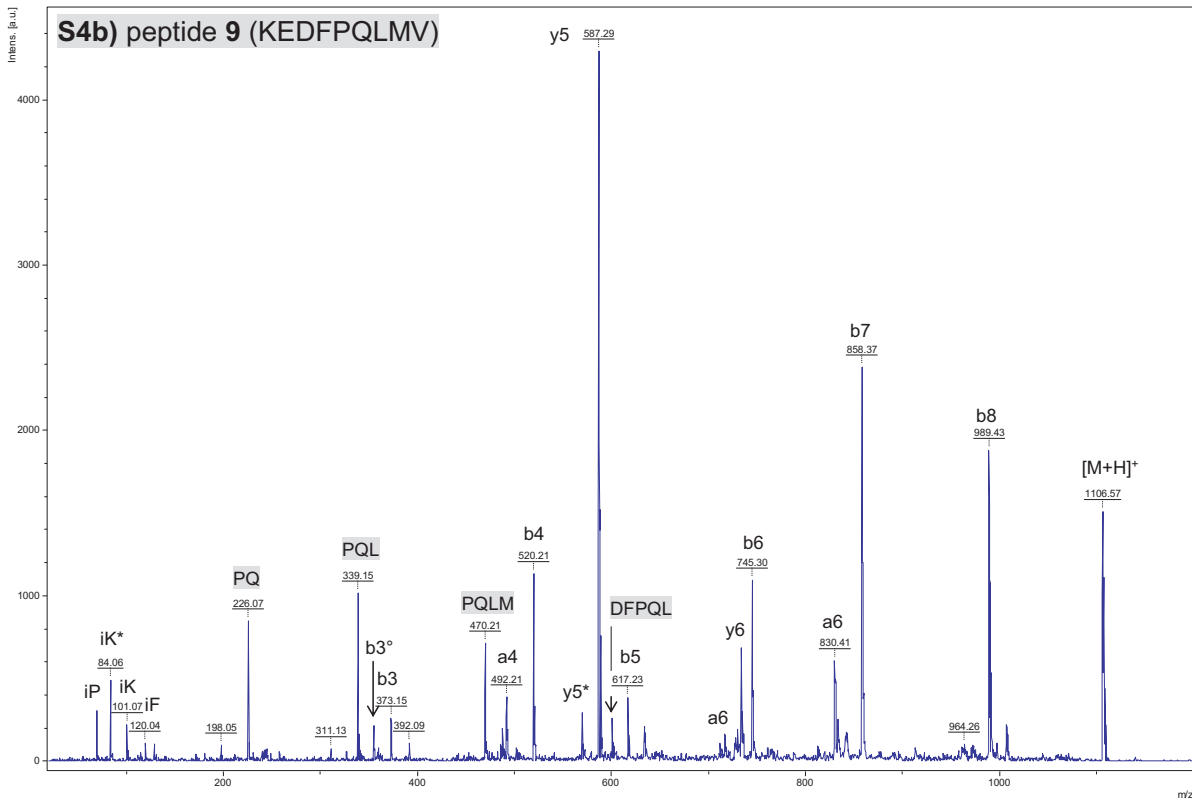


Figure S5. MS/MS spectra of peptide 15 (KTRYNGMGEQWDPD) a) LID/CID in MALDI-ToF/ToF, b) CID in ESI-QqToF from (M+H)⁺ precursor ion, c) CID in ESI-QqToF from (M+2H)²⁺ precursor ion.

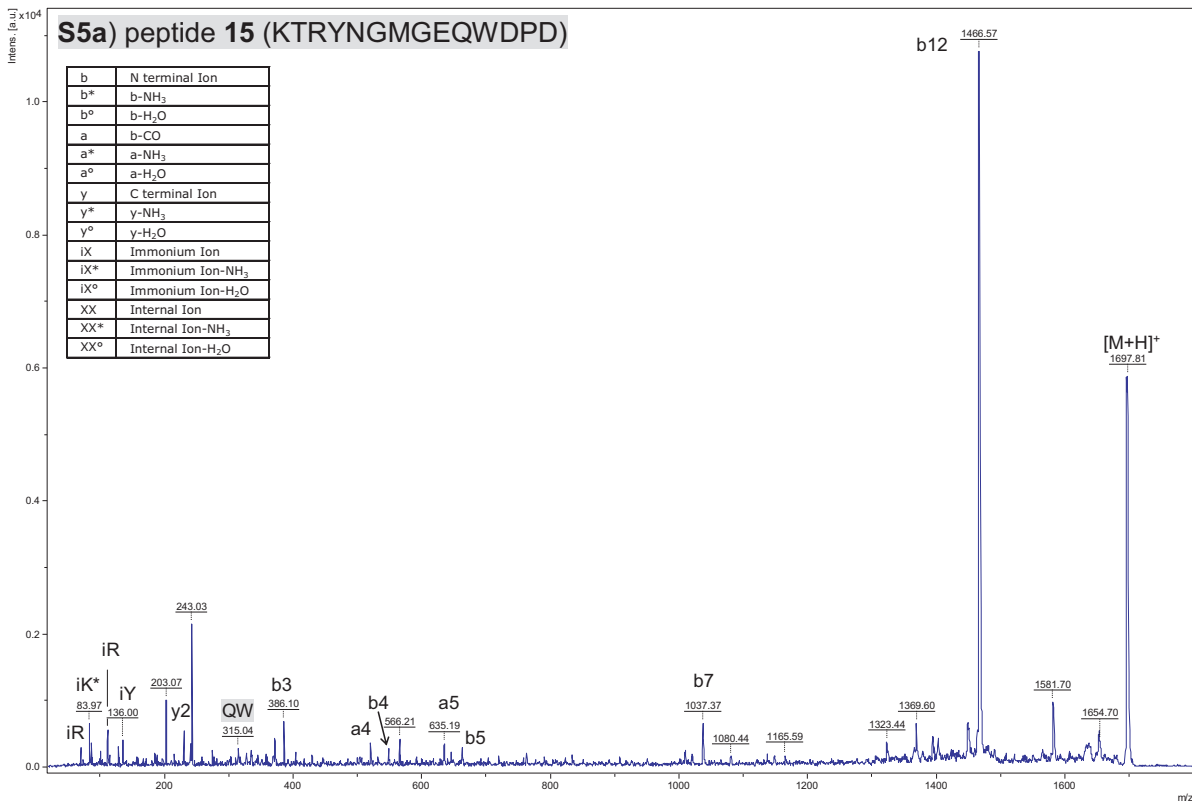
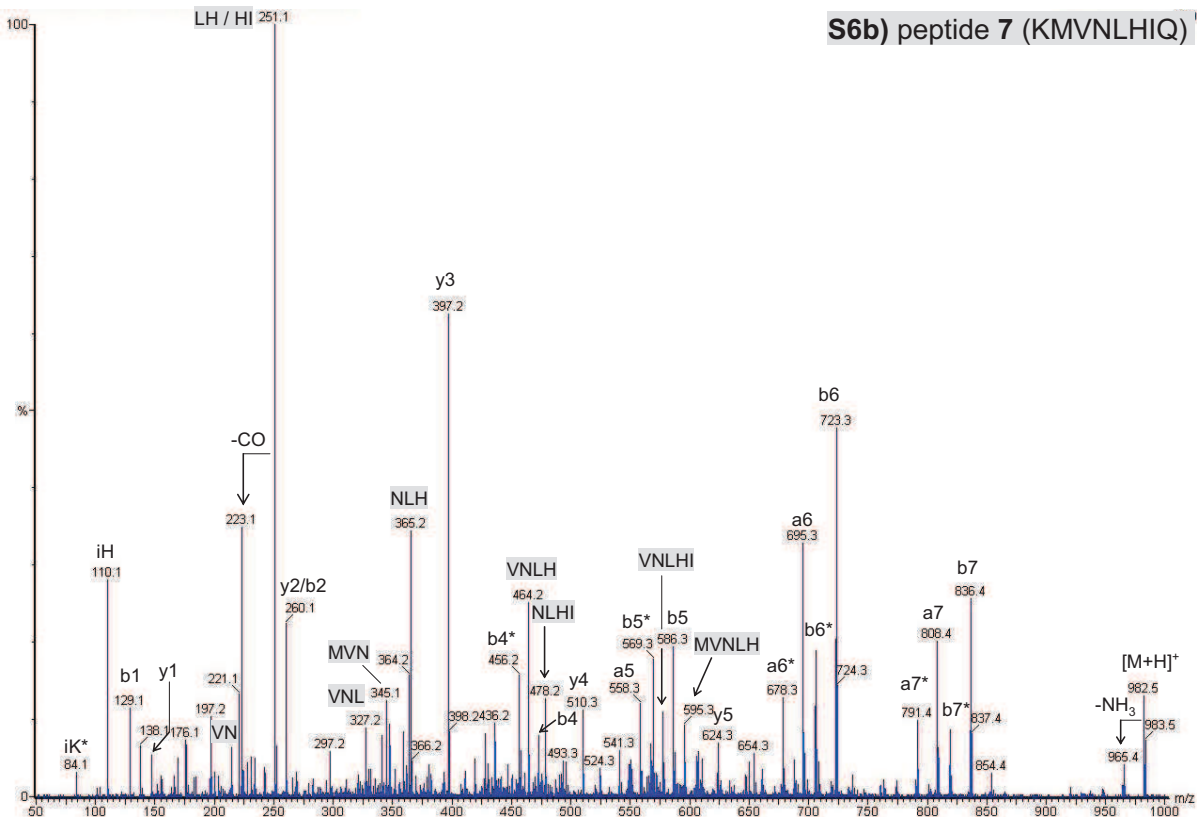
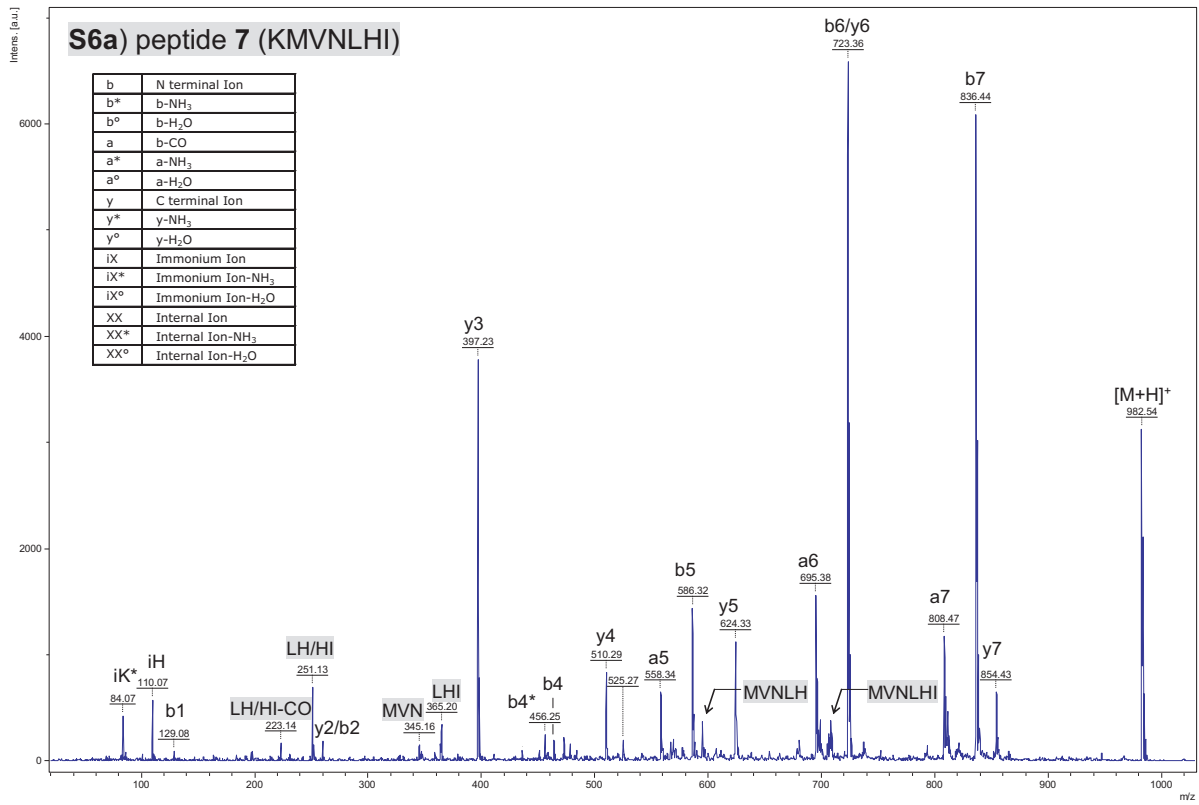


Figure S6. MS/MS spectra of peptide 7 (KMVNLHIQ) a) LID/CID in MALDI-Tof/Tof, b) CID in ESI-QqTof from (M+H)⁺ precursor ion, c) CID in ESI-QqTof from (M+2H)²⁺ precursor ion.



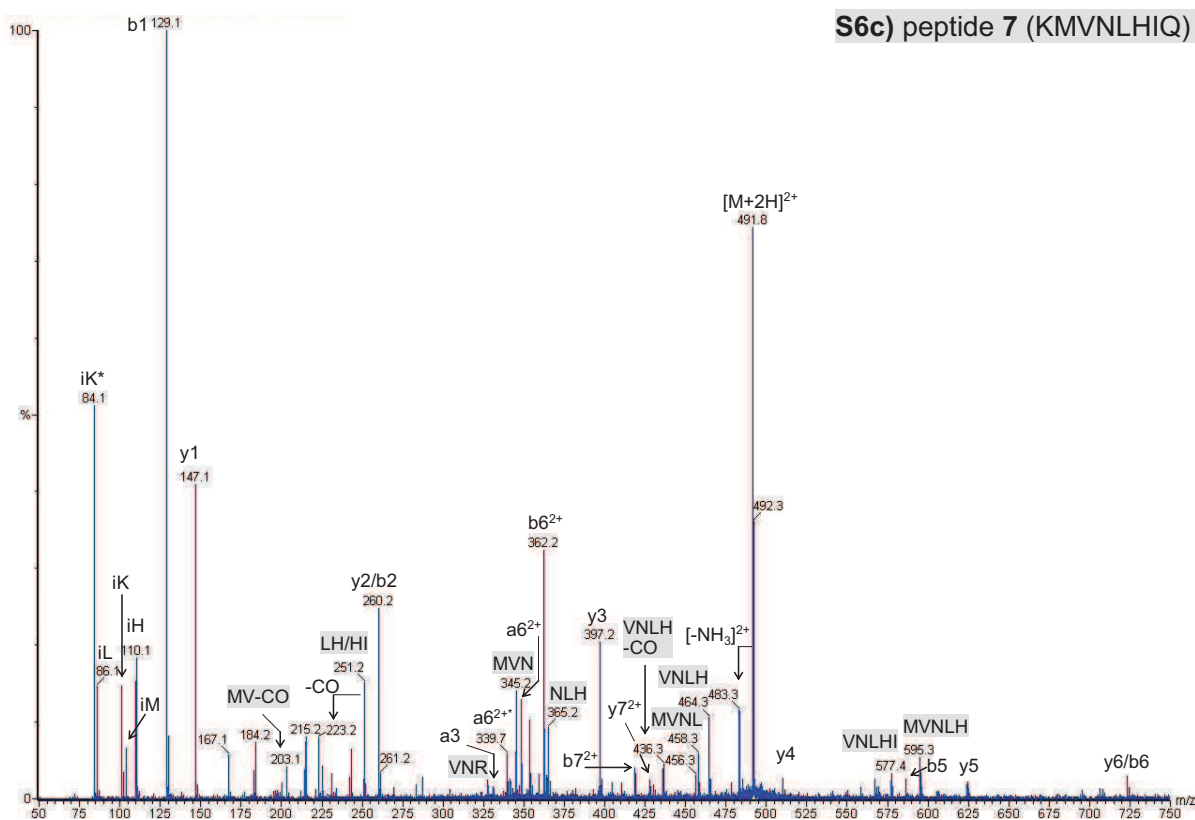
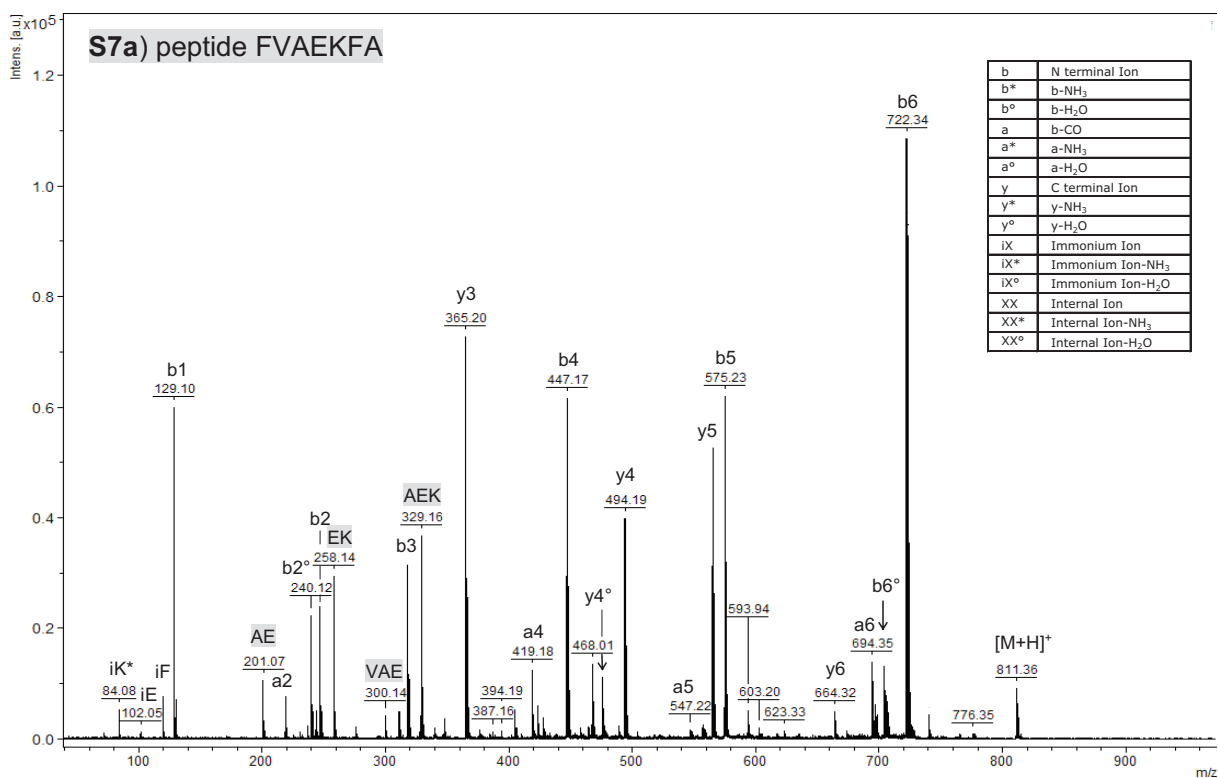
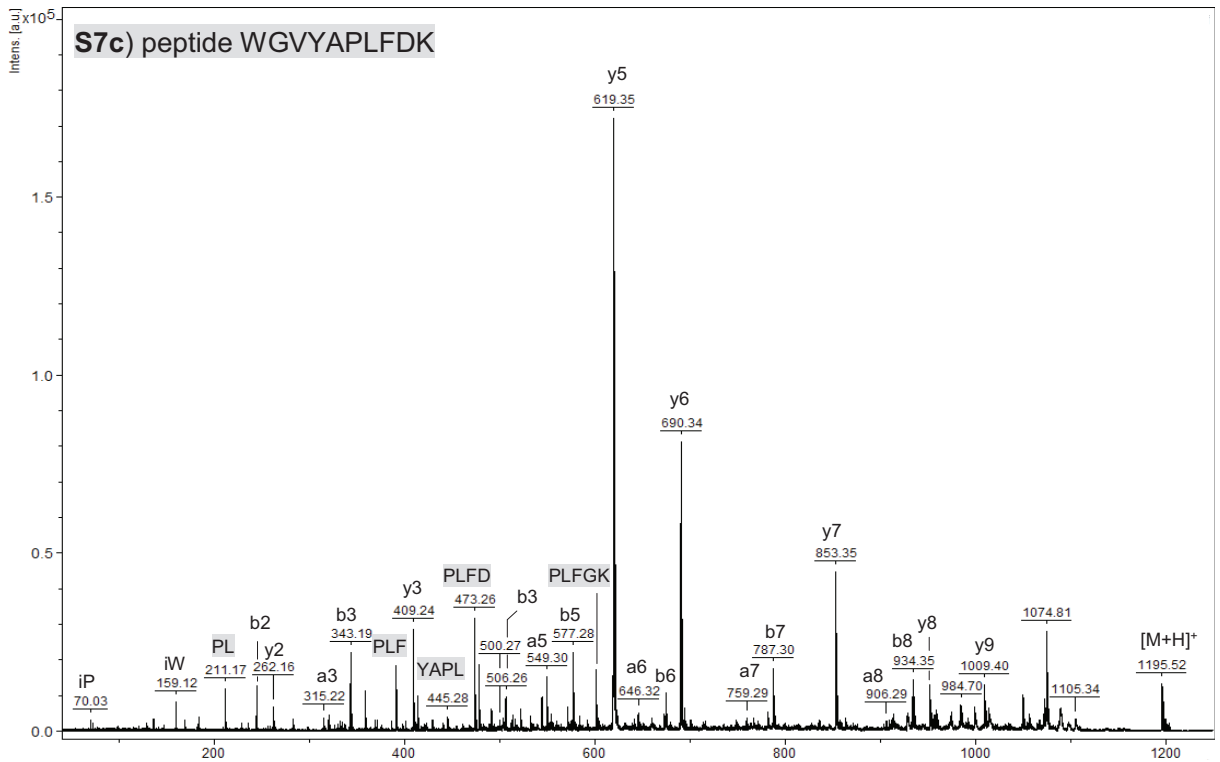
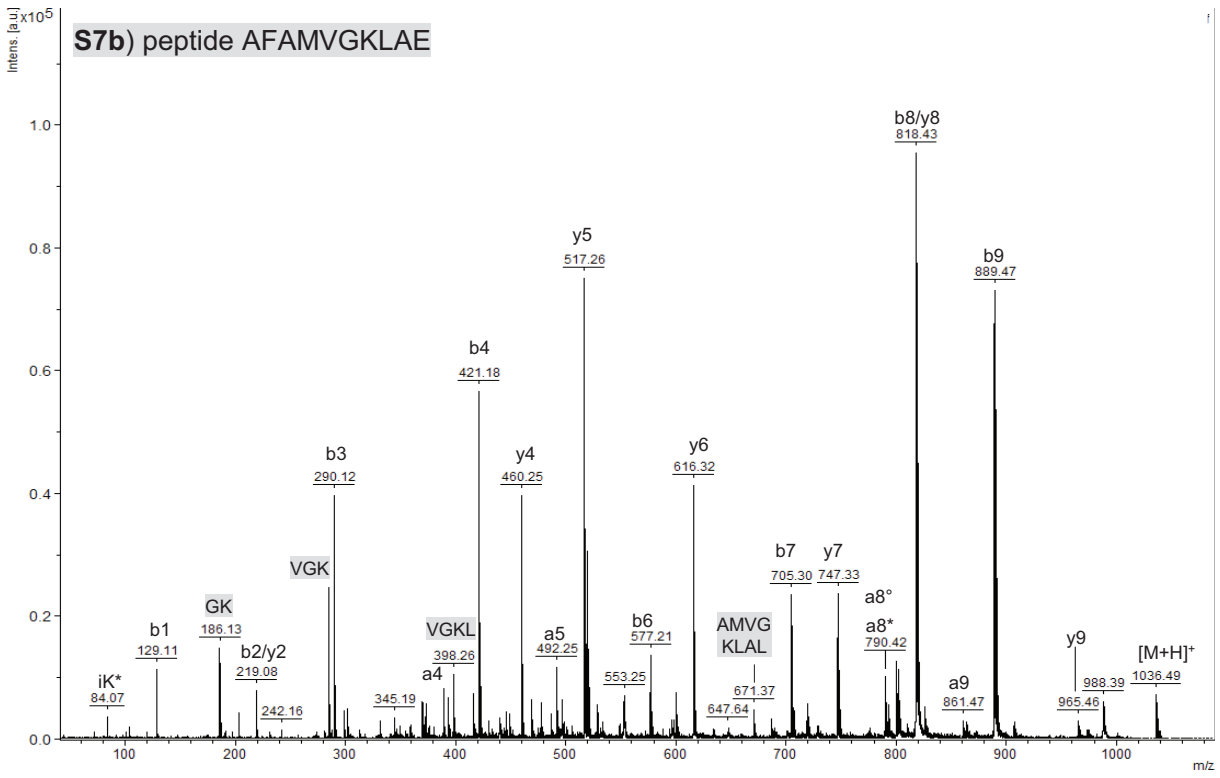


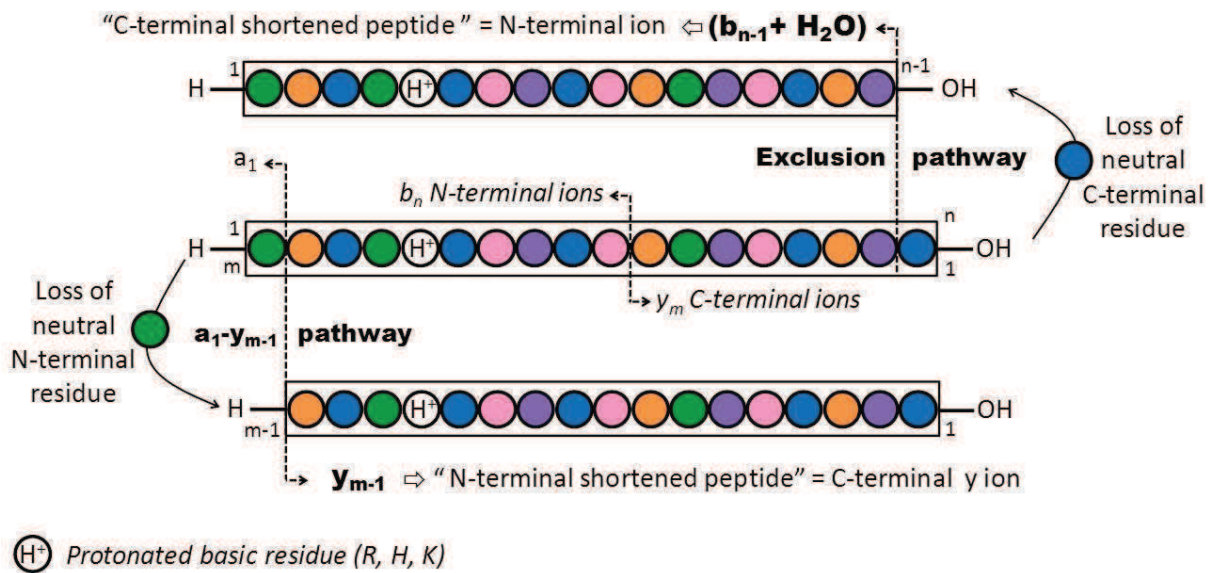
Figure S7. LID/CID MALDI MS/MS spectra of lysine-containing peptides inside the sequence a) peptide FVAEKFA and b) peptide AFAMVGKLAE, and c) at the C-terminal position, peptide WGVYAPLFDK.





I.5. Observation de fragmentations remarquables

I.5.1. Article 2: Occurrence of C-terminal residue exclusion in peptide fragmentation by ESI and MALDI tandem mass spectrometry





RESEARCH ARTICLE

Occurrence of C-Terminal Residue Exclusion in Peptide Fragmentation by ESI and MALDI Tandem Mass Spectrometry

Mathieu Dupré, Sonia Cantel, Jean Martinez, Christine Enjalbal

Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247, Bâtiment Chimie (17), Université Montpellier 2, Universités Montpellier 1 et 2 – CNRS, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

Abstract

By screening a data set of 392 synthetic peptides MS/MS spectra, we found that a known C-terminal rearrangement was unexpectedly frequently occurring from monoprotonated molecular ions in both ESI and MALDI tandem mass spectrometry upon low and high energy collision activated dissociations with QqTOF and TOF/TOF mass analyzer configuration, respectively. Any residue localized at the C-terminal carboxylic acid end, even a basic one, was lost, provided that a basic amino acid such arginine and to a lesser extent histidine and lysine was present in the sequence leading to a fragment ion, usually depicted as $(b_{n-1}+H_2O)$ ion, corresponding to a shortened non-scrambled peptide chain. Far from being an epiphenomenon, such a residue exclusion from the peptide chain C-terminal extremity gave a fragment ion that was the base peak of the MS/MS spectrum in certain cases. Within the frame of the mobile proton model, the ionizing proton being sequestered onto the basic amino acid side chain, it is known that the charge directed fragmentation mechanism involved the C-terminal carboxylic acid function forming an anhydride intermediate structure. The same mechanism was also demonstrated from cationized peptides. To confirm such assessment, we have prepared some of the peptides that displayed such C-terminal residue exclusion as a C-terminal backbone amide. As expected in this peptide amide series, the production of truncated chains was completely suppressed. Besides, multiply charged molecular ions of all peptides recorded in ESI mass spectrometry did not undergo such fragmentation validating that any mobile ionizing proton will prevent such a competitive C-terminal backbone rearrangement. Among all well-known nondirect sequence fragment ions issued from non specific loss of neutral molecules (mainly H_2O and NH_3) and multiple backbone amide ruptures (b-type internal ions), the described C-terminal residue exclusion is highly identifiable giving raise to a single fragment ion in the high mass range of the MS/MS spectra. The mass difference between this signal and the protonated molecular ion corresponds to the mass of the C-terminal residue. It allowed a straightforward identification of the amino acid positioned at this extremity. It must be emphasized that a neutral residue loss can be misattributed to the formation of a y_{m-1} ion, i.e., to the loss of the N-terminal residue following the a_1 - y_{m-1} fragmentation channel. Extreme caution must be adopted when reading the direct sequence ion on the positive ion MS/MS spectra of singly charged peptides not to mix up the attribution of the N- and C-terminal amino acids. Although such peculiar fragmentation behavior is of obvious interest for de novo peptide sequencing, it can also be exploited in proteomics, especially for studies involving digestion protocols carried out with proteolytic enzymes other than trypsin (Lys-N, Glu-C, and Asp-N) that produce arginine-containing peptides.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s13361-011-0254-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Correspondence to: Christine Enjalbal; e-mail: enjalbal@univ-montp2.fr

Received: 30 June 2011
Revised: 14 September 2011
Accepted: 14 September 2011

Key words: MS/MS, Peptide fragmentation, CID, LID, Residue exclusion, Neutral loss, C-terminal residue

Introduction

The accuracy of MS/MS-based peptide sequencing significantly depends on the refined knowledge of gas-phase peptide chemistry to implement reliable fragmentation rules in bioinformatics tools used by the proteomics community for protein identification [1]. Many researchers have tackled worldwide such an important issue during the last decade providing a buoyant literature on peptide fragmentation chemistry upon low energy collision induced dissociation (CID) conditions and on the gas-phase structures of the major fragment ions, i.e. b, a, and y signals. The mobile proton model [2–5] covers the mobility/sequestering of ionizing protons, which triggers the peptide chain dissociations. These b, a, and y fragment ions that are directly related to the primary polyamide skeleton are used to deduce the amino acid sequence. However, many MS/MS spectra remains unassigned by sequencing algorithms due to the formation of abundant peaks that do not belong to the direct sequence ion series and related structures (internal and immonium ions, loss of H₂O, NH₃). Many complex rearrangements have been evidenced to explain such non-direct sequence ion production [6–12], the scrambling effect being recently one of the most studied phenomena [13–22]. Indeed, these atypical peptide fragmentations deserve great attention in the search for more comprehensive dissociation pathways suitable for efficient automated MS/MS spectra interpretation. Thus, our attention was focussed on low molecular weight singly charged peptides that often failed to be identified by sequencing algorithms looking for specific rearrangement behaviors other than sequence scrambling. Following a statistical approach, we have in hand a database of MS/MS spectra recorded upon collision-induced dissociation (CID) and laser-induced dissociation (LID) conditions in ESI and MALDI mass spectrometry from 392 synthetic peptides of various amino acid composition and length [23–25]. Surprisingly, the loss of the C-terminal amino acid residue that has been previously reported for some arginine-containing peptide singly charged ions [6–10] was very often observed for any of the 20 proteinogenic amino acids, whatever the MS/MS activation method. Besides, the fair to very abundant intensities of many of these fragment ions prompted us to scrutinize our available MS/MS data to define all conditions required for such a C-terminal specific rearrangement.

The peptide database can be divided in two subsets according to the nature of the C-terminal backbone function: a carboxylic acid (peptide free acids) or an amide (peptide amides), the latter case corresponding to digestion of amidated proteins issued from a specific C-terminal post-translational modification that was of interest in the

laboratory as part of ongoing research projects [26]. As depicted in Figure 1, among the peptide free acids, some were designed to mimic protein digest sequences such as tryptic chains having either arginine (R) or lysine (K) at their C-terminus [27], as well as Lys-N proteolytic peptides that all possess N-terminal lysine [28, 29]. Peptides illustrating trypsin miscleavages with either R or K within the sequence were also exemplified. Two situations could be encountered. First, the tryptic miscleaved peptide originated from the protein internal sequence and had either R or K at the C-terminus. The second came from the protein C-terminal sequence and it possessed any of the 20 proteinogenic amino acids at the C-terminal end. These two types of peptides were respectively named in Figure 1 trypsin miscleavages and C-ter trypsin miscleavages. Furthermore, the peptide collection contained some sequences that were not related to any protein enzymatic digestion. These peptides could be assigned to the C-terminal part of any protein subjected to proteolysis. Finally, we ensured that the synthetic peptide free acids were presenting an overall amino acid occurrence similar to the residue natural relative abundance in proteins as shown in Figure 1. Moreover, the 20 proteinogenic amino acids being located randomly at any position within the available sequences, we checked that the five different classes (aliphatic, aromatic, basic, acid, and not charged side chains) were inserted at least once at the C-terminal position. All sequences are reported in Table S1 of the Supplemental Information section.

Surprisingly, we have observed that some of these 392 peptides exhibited a peculiar MS/MS behavior leading to the abundant loss of the residue located at the C-terminus, as

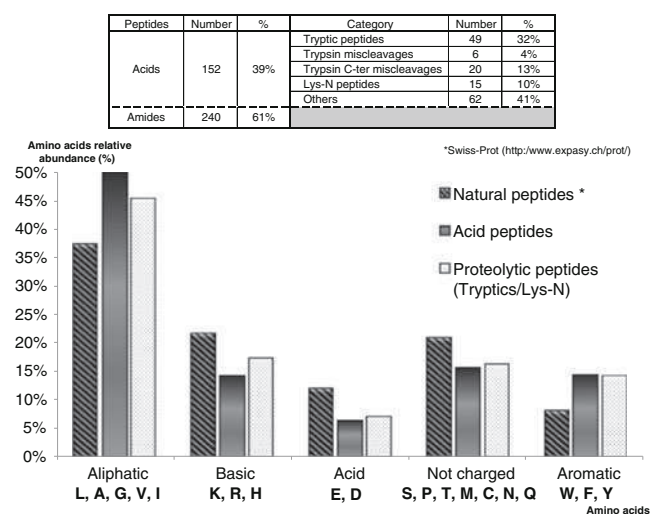


Figure 1. Database of synthetic peptides and the corresponding amino acid occurrence

shown in Table 1. This neutral loss that has been reported from metastable decomposition [6] and from CID experiments [7–10] of singly charged arginine-containing peptide ions was observed whatever the instrument used to record the MS/MS spectra (ESI-QqTof and MALDI-TOF/TOF), and whatever the nature of the amino acid present in that position. However, it appeared that such residue exclusion

only occurred when three conditions were simultaneously satisfied: (1) the precursor ion must be singly charged; (2) a basic residue must be present in the sequence; (3) the C-terminal backbone function must be a carboxylic acid. Within the frame of the mobile proton model [2–5], provided that at least one of the ionizing protons is sufficiently mobile to be intramolecularly transferred onto

Table 1. Synthetic Peptides Exhibiting C-terminal Residue Exclusion

Entry	Category	Free acid peptide sequence	Residue excluded	M (g/mol)	Abundance of the truncated peptide ion	
					ESI-QqTof	MALDI-Tof/Tof
R-containing sequences						
R-1	×	F P A R V G S	S	732,39	+	++++
R-2	×	F P A R V G C	C	748,37	+	++++
R-3	×	F P A R V G I	I	758,41	++	++++
R-4	●	F P A R V G K	K	773,42	+++	++++
R-5	×	F P A R V G Q	Q	773,42	++	++++
R-6	×	F P A R V G E	E	774,40	++	++++
R-7	×	F P A R V G H	H	782,42	++++	++++
R-8	●	F P A R V G R	R	801,46	++++	++++
R-9	×	F P A R V G Y	Y	808,42	++	++++
R-10	×	L A V R I A W	W	827,48	+	+
R-11	×	L R A V A I A	A	712,44	++	++++
R-12	×	A V A I R D A	A	714,37	+++	+++
R-13	×	W R A G F A L	L	819,42	+	+++
R-15	×	A L G S R S A G Y P	P	977,45	+++	++++
R-16	×	M L G F R S V G Y A	A	1099,50	++	++++
R-17	×	C L V A I S A R Y W	W	1180,56	+	++
R-18	×	W F A P P R V G Y L	L	1204,59	++	++++
R-19	×	F P A R V G	G	645,36	+	+
H-containing sequences						
H-1		F P A D H F A	A	803,36	+	+
H-2	★	L G H A P E V R	R	877,48	+	+
H-3	★	G E V A V L G H M K	K	1039,50	+	+
H-4	★	P G A H I W E A G A K	K	1135,50	+	+
H-5	★	G N G Q I V F H A A R	R	1168,60	++	++
H-6	★	G H L P T V S E N A R	R	1179,60	+	+
K-containing sequences						
K-1	◆	K G F C L	L	566,71	+	+
K-2	×	F P A K V G I	I	730,43	+	+
K-3	◆	K A D F P Q L M V	V	1048,26	+	+
K-4	◆	K E D F P Q L M V	V	1106,29	+	+
Multiplied basic residues-containing sequences						
B-1	◆	K A F L H G	G	671,79	nd	+
B-2	◆	K A F L R G	G	690,83	++	++
B-3	◆	K A F R L G	G	690,83	+	+
B-4	★	A V G K K K K	K	757,48	+	+
B-5	◆	K Y I W L S R A V	V	1135,36	++	++++
B-6	◆	K S W D T L C M A G R F	F	1414,65	+++	+++
B-7	●	L H F V K M G R A W A I G R	R	1639,85	++++	++++
B-8	◆	K A T C G R V N S A S M Y D A I	I	1686,90	+	+++
B-9	◆	K T R Y N G M G E Q W D P D	D	1696,79	+	+
K-terminated sequences						
X-1	★	P I C A K	K	530,29	+	+
X-2	★	A G V D G P K	K	642,31	+	+
X-3	★	T P S S V L K	K	730,42	+	+
X-4	★	M W A E N K	K	777,35	+	+

Category

★ Tryptic peptides

◆ Lys-N peptides

● Trypsin miscleavage peptides

× C-terminal miscleavage peptides

Abundance

+ 0–25%

++ 26–50%

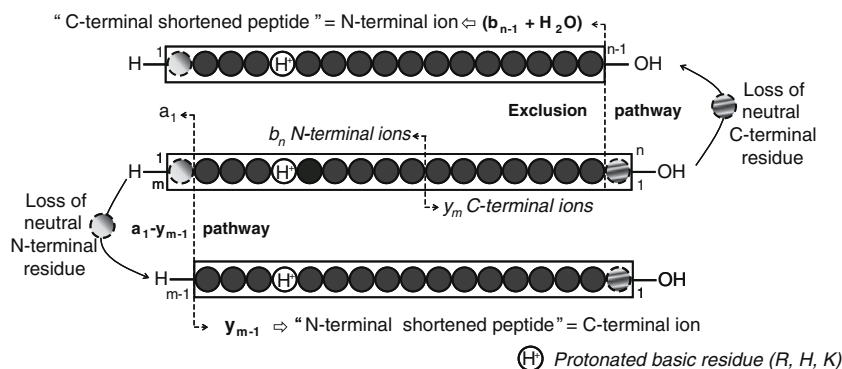
+++ 51–75%

++++ 76–100%

any amide bond along the peptide backbone, multiple peptide bond ruptures will be triggered in MS/MS experiments upon precursor ion activation. These competitive fragmentation pathways led to series of ions related to the N-terminal part of the peptide (b/a ions) and C-terminal end (y ions) allowing efficient sequencing. On the contrary, it is well known that peptides containing strong basic residues (such as arginine and histidine) sequester the ionizing proton [30, 31] and, thus, may be very difficult to dissociate by low energy CID activation of the monoprotonated precursor ion [32–35]. Since this situation was encountered for all peptides exhibiting the C-terminal residue exclusion (conditions 1 and 2), it confirmed that the fragmentation mechanism by rearrangement [7–10], in competition with the regular b_n - y_m pathway [4], was necessarily requiring proton sequestering on a basic side chain and mobilization of the C-terminal carboxylic acid proton. Even if this C-terminal rearrangement mechanism has been debated in the literature for some times [7–10], recent investigations by Bythell et al. on the RGD tripeptide by means of experimental and theoretical work have proven that salt-bridge stabilized and anhydride transition structures were involved [10]. Thus, the structural constraints that have been established from many experimental data provide further compelling evidence of the C-terminal rearrangement mechanism established for the RGD tripeptide [10]. These results were also in agreement with literature data describing the production of truncated peptides from sodiated ions [36–38]. Lebrilla et al. have demonstrated that lithiated glycyglycine was rearranged to form an anhydride intermediate that further fragment to give the product with a carboxyl group at the new C-terminus [39]. Although neutral fragments released from both N- and C-termini of singly protonated peptides were studied more than a decade ago [40], the loss of a residue was identified as an aziridinone (three-membered cyclic amide) and solely related to the N-terminal part of the peptide, which accompanies y_m ion formation. Working with synthetic peptides having well-defined sequences allowed to ascertain that the residue loss was produced in our case from the C-terminal end. This point was crucial for relevant peptide sequencing since a mistake in the identification of the amino

acid present at one chain extremity might bring confusion between the sequence and retrosequence attribution. Indeed, a fragment obtained by C-terminal residue elimination still contains the N-terminal part of the original peptide but will be assigned as a y ion and thus be attributed to the C-terminal sequence as depicted in Scheme 1. Such confusion could be made since the a_1 - y_{m-1} fragmentation channel allowing the potent formation of N-terminal a_1 ion and C-terminal y_{m-1} ion has been proposed to occur in competition with the common major b_n - y_m dissociation pathway [4]. Thereafter, the designation of the fragment ion produced by C-terminal residue loss could be ambiguous. Since the remaining peptide skeleton present in this fragment ion corresponds to the N-terminal portion, it has been described as a so-called ($b_{n-1} + H_2O$) ion [7–10] and named as such in this paper.

To confirm the occurrence of such competitive ambiguous rearrangement in peptide sequencing by singly charged precursor ion activation, we report the behavior in MS/MS experiments of several peptides of various lengths containing at least one basic residue. Since some amino acids are well-known to exhibit specific reactivity in MS/MS experiments such as proline [41–44] and few residues that present functionalized side chains that can be involved in acid/base and nucleophile/electrophile reactions [32, 34, 35, 45–47], we ensured a nonbiased peptide collection with sequences possessing such tricky amino acids (see Table S1). To further assess the generality of such an exclusion fragmentation behavior, a series of peptides displaying the same sequence (FPARVGVX) but differing by the nature of the C-terminal amino acid (X classified according to their aliphatic, aromatic, not charged, acidic, and basic side chains in Figure 1) was analyzed as shown in Table 1 (entries R-1 to R-9). As a proof of concept, to ascertain the published fragmentation mechanism from protonated and cationized species [10, 38], comparative dissociation of singly charged molecular ions (MH^+) of C-terminal peptide free acids and amides in ESI-QqTOF and MALDI-TOF/TOF experiments were undertaken. Besides, some sodiated ions were also dissociated and the recorded MS/MS spectra were compared with the protonated ones. Finally, the fragmenta-



Scheme 1. Ambiguous loss of neutral residue from N- and C-terminal peptide extremities

tion profile of the gas-phase recovered truncated peptide (through an MS³ experiment) and the corresponding synthetic sequence of such considered shortened peptide (MS² spectrum) were compared. From all these data, we found that the relative abundance of the fragment ion resulting from the C-terminal residue exclusion depended from both the amino acid nature and the MS/MS activation method (low energy collisionally activation in ESI-QqTOF versus high energy collisionally activation/metastable decomposition in MALDI-TOF/TOF).

Experimental

Chemicals and Reagents

All solvents were of analytical grade. Acetonitrile was purchased from Carlo Erba. The deionized water used in all the experiments was obtained using a Milli-Q system (Millipore, Milford, MA, USA). MALDI matrix [2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) and α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA)] were purchased from Fluka. A peptide calibration standard kit was purchased from Bruker Daltonics.

Syntheses

Peptides were synthesized on the IBMM peptide synthesis platform using the conventional methodology of solid-phase peptide synthesis using Fmoc chemistry [48] and purified by preparative LC/MS (Autopurification System; Waters, Milford, CA, USA). According to the chosen linker, the peptides were prepared as C-terminal carboxylic acids or amides. More details are available in the Supplemental Information section.

Mass Spectrometry

Mass spectrometry analyses were conducted on instruments located in the Laboratoire de Mesures Physiques of University Montpellier 2, IBMM platform of instrumentation.

ESI mass spectra were recorded on a Q-TOF I mass spectrometer (Waters, Milford, CA, USA) fitted with an electrospray ion source. Data were acquired and processed with the MassLynx software. The mass spectrometer was calibrated in the positive ion mode using 1% phosphoric acid in water/acetonitrile solution (H₂O/CH₃CN, 50/50, vol/vol). Data were acquired by the TOF analyzer at 1 acquisition/s from m/z 50 to m/z 2000 with a resolution of 5000. One hundred acquisitions were summed to produce the final spectrum. Samples were dissolved in a mixture H₂O/CH₃CN (50/50, vol/vol) and infused into the ESI source at a flow rate of 5 μ L/min. Voltages were set at +2.5 kV for the capillary and adjusted for the sampling cone. The source was heated at 80 °C. Nitrogen constituted both nebulizing and desolvation gas. The latter was heated at 150 °C. In MS/MS experiments, the second quadrupole analyzer was set in the rf mode using argon as collision gas

and the collision energy varied from 25 to 90 eV depending on the samples to get optimal fragmentation.

MALDI mass spectra were recorded on an Ultraflex III TOF/TOF instrument (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) equipped with LIFT capability. A pulsed Nd:YAG laser at a wave length of 355 nm was operated at a frequency of 100 Hz (MS data) or 200 Hz (MS/MS data) with a delayed extraction time of 30 ns. The source was operated in the positive mode. Data were acquired with the Flex Control software and processed with the Flex Analysis software. A solution of either the α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) matrix in water/acetonitrile (70/30, vol/vol) at a concentration of 10 mg/mL or the 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) matrix in water/acetonitrile (50/50, vol/vol) at a concentration of 10 mg/mL was mixed with the peptide sample in equal amount and 0.5 μ L of this solution was deposited onto the MALDI target according to the dried droplet procedure. After evaporation of the solvent, the MALDI target was introduced into the mass spectrometer ion source. External calibration was performed with the commercial peptide mixture (calibration peptide standard 2, Bruker Daltonics, Wissembourg, France). MS data were acquired under the following MS conditions. An acceleration voltage of 25.0 kV (IS1) was applied for a final acceleration of 21.95 kV (IS2). The reflectron mode was used for the TOF analyzer (voltages of 26.3 and 13.8 kV). Mass spectra were acquired from 250 laser shots, the laser fluence being adjusted for each studied sample (laser fluence 1). Ions were detected over a mass range from m/z 200 to 2000. MS/MS data were acquired under the following conditions. An acceleration voltage of 8.0 kV (IS1) was applied for a final acceleration of 7.25 kV (IS2). The reflectron mode was used for the TOF analyzer (voltages of 29.5 and 13.9 kV). Mass spectra were acquired from 600 to 800 laser shots, the laser fluence being adjusted for each studied peptide above the threshold for generation of molecular ions (laser fluence 2 > laser fluence 1). MS/MS experiments were performed under laser induced dissociation (LID) conditions with the LIFT cell voltage parameters set at 19.0 kV (LIFT 1) and 3.2 kV (LIFT 2) for a final acceleration of 29.5 kV (reflector voltage) and a pressure in the LIFT cell around 4×10^{-7} mbar. The precursor ion selector was set manually to the first monoisotopic peak of the molecular ion pattern for all analyses. For LID experiments, no collision gas was added (gas off spectra). For LID/CID experiments (gas on spectra), the same tuning was used but argon was allowed to fill the collision cell (pressure around 2×10^{-7} mbar).

Results and Discussion

Among all available peptide free acids dissociated upon CID on a QqTOF mass analyzer configuration (Table S1 of the Supplemental Information section), for roughly 25% of the available MS/MS synthetic peptide data we observed an abundant fragment ion that corresponded seemingly to a

truncated sequence where the residue in the C-terminal position has been lost. As expected from published data on small arginine-containing peptides [7–10], this dissociation only occurred from the protonated precursor ion leading to a single atypical fragment ion in the upper mass range of the MS/MS spectrum. The loss of a neutral residue was only observed for peptides in the MS/MS data set corresponding to the free acids. Moreover, in that category, only peptides bearing a basic amino acid in their sequence such as arginine, histidine and lysine revealed C-terminal exclusion provided the singly charged precursor ion was selected for activation/dissociation. These two constraints must be simultaneously satisfied to trigger the C-terminal sequence truncation.

The 41 peptide free acids (over 152 entries) exhibiting such amino acid exclusion are reported in Table 1. They are classified according to the basic residue present within the sequence, i.e., arginine (entries R-1 to R-18), histidine (entries H-1 to H-6), or lysine (entries K-1 to K-4), which are required to trigger the C-terminal exclusion with fair to high intensities. Peptides possessing multiple basic residues were counted separately (entries B-1 to B-9). Obviously, the C-terminal position has not been considered for such a categorization, this amino acid being lost as a neutral molecule. It should be noted that few tryptic peptides that were all terminated by lysine behaved unexpectedly upon collision-induced activation of the singly charged molecular ion (roughly 10% of all tryptic peptides). Although these peptides did not contain any basic amino acid except the C-terminal one (K), they produced the residue exclusion. This has not been observed previously, the formation of ($b_{n-1} + H_2O$) ion being only known up to now to be promoted by the presence of basic amino acids in a non-C-terminal position [7, 10]. In particular, such behavior in CID has been reported for deprotonated peptides containing C-terminal glutamic acid, aspartic acid, or serine residues [9]. Nevertheless, the corresponding fragment ion issued from non-basic residue-containing tryptic peptides was always recorded with a low abundance as depicted in Table 1. These C-terminal lysine peptides were thus considered separately (entries X-1 to X-4).

To illustrate this specific dissociation pathway, we choose the two arginine-containing peptide free acids ALGSRSA-GYP and WFAPPRVGYL (Table 1, entries R-15 and R-18, respectively), giving rise to an abundant loss of 97 Da (proline residue, P) and 113 Da (leucine residue, L) from the MH^+ precursor ions (R-15: m/z 978.5 \rightarrow m/z 881.5 and R-18: m/z 1205.6 \rightarrow m/z 1092.4, respectively) as displayed in Figure 2. More examples of histidine- and lysine-containing peptides are provided in the Supplemental Information section (Figures S1 to S3, entries H-5, K-4, and X-1 in Table 1).

In the search for previous description of such elimination of the C-terminal residue during peptide sequencing in proteomics studies, fragment ions assigned as ($b_n + H_2O$)⁺ or ($b_{n-1} + H_2O$)⁺ ions has been occasionally noted on few

published MS/MS spectra of monoprotonated peptides [49, 50], but they were not considered significant for bioinformatics tools due to their very low relative abundance. Since peptide sequencing is most of the time undertaken in the positive mode by dissociation of singly and multiply charged molecular ions, we decided to further investigate this rather abundant ion formation to identify the experimental conditions prerequisite for such amino acid neutral loss in the positive mode.

At this stage of our studies, we needed to answer several questions to refine the precise context of this C-terminal rearrangement:

- Is it dependent on the ion activation method?
- Is the free carboxylic acid function really compulsory for exclusion?
- Is the charge state of the selected precursor ion actually playing a role?
- Is it dependent on the nature of the amino acid positioned at the C-terminus?
- Is the basic residue necessary for the exclusion behavior?
- What is the significance of the exclusion pathway compared with the production of all other non-scrambled sequence fragment ions, which are not directly issued from the b_n - y_m backbone amide pathway?

Influence of Precursor Ion Activation Method on C-Terminal Residue Exclusion

To answer the first question, all 41 peptide free acids previously analyzed in ESI-QqTOF were subjected to MALDI-TOF/TOF experiments making available two sets of MS/MS spectra recorded with complementary dissociation techniques based on low- and high-energy CID fragmentations. In contrast to the former ESI-MS/MS setup, MALDI-TOF/TOF is not only limited to CID but allows also dissociation induced by laser irradiation known as laser-induced dissociation (LID) [51]. In such a case, no gas was added to the collision cell; only variation of the laser fluence in the ion source was employed to trigger the dissociation processes according to metastable fragmentation in a field free region [52]. Given the availability of both LID and LID/CID high energy dissociation regimes, MALDI-TOF/TOF constitutes a major versatile analytical tool in proteomics [53, 54] and more generally in any field requiring high throughput analyses [55]. The same results were obtained under all dissociation conditions as depicted in Table 1. All C-terminal amino acid exclusions that were detected in low energy CID were also seen in LID and LID/CID MS/MS spectra. The corresponding fragment ion, i.e., the protonated shortened peptide, was as abundant in MALDI as in ESI MS/MS, as seen in Figures 2 and 3 for instance. In a high number of cases, this ion signal was even more intense in MALDI than in ESI dissociations (Table 1). To evaluate the relative abundance of the fragment ion under interest, the

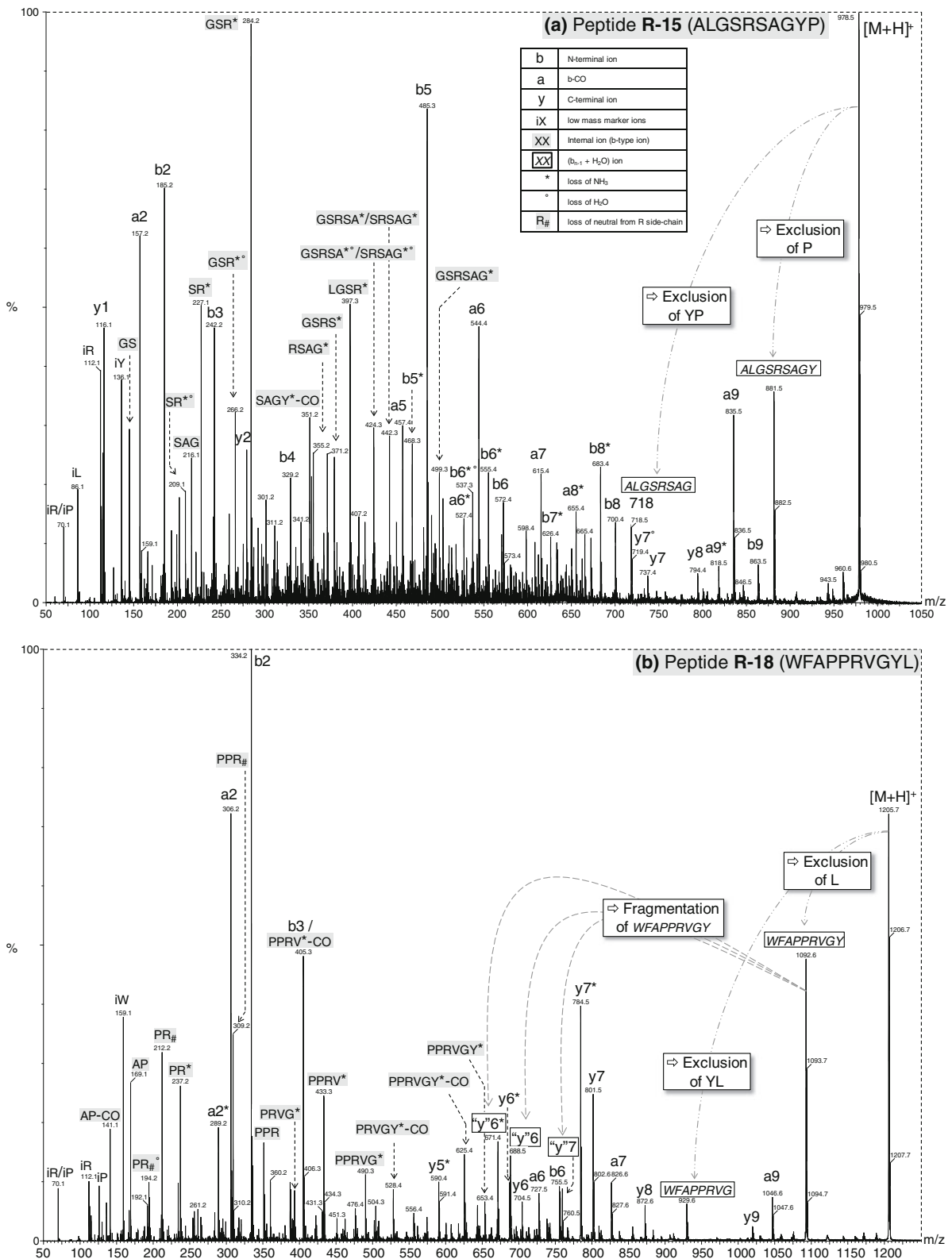


Figure 2. ESI MS/MS spectra upon CID of the [M+H]⁺ precursor ion of (a) peptide R-15 (ALGSRASAGYP), (b) peptide R-18 (WFAPPRVGYL)

precursor ion was not considered since ESI and MALDI data were not acquired under the same MS/MS process. Hence, the signal related to the C-terminal residue exclusion was measured according to the most intense fragment signal (base peak of the MS/MS spectrum) as described in Table 1. Changing the collision energy or the laser fluence in CID and LID MS/MS experiments did not really alter the abundance of the observed shortened peptide ion remaining weak (+), fair (++), abundant (+++), or very abundant (++++). Moreover, to enlarge the scope of such observation, other experimental parameters were also modified such as the nature of the matrix and the combination of precursor ion activation (LID and LID combined with CID). For all studied 37 peptide dissociations, the MS/MS data recorded with 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix were very similar to the ones with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid. No major difference was noticed between high energy LID and LID/CID regimes in terms of peptide fragment ion production, as already observed in previous MALDI-TOF/TOF studies [24, 25, 56]. Finally, some peptides that did not exhibit the exclusion in ESI-QqTOF were also tested in MALDI-TOF/TOF and as expected no truncated protonated peptide was detected. The C-terminal residue exclusion was thus not dependent on the precursor ion vibrational activation method.

Influence of the C-Terminal Backbone Function on C-Terminal Residue Exclusion

None of the peptides terminated by an amide function (240 sequences, Table S1) exhibited the C-terminal neutral loss, indicating that the presence of a carboxylic acid at the C-terminus was compulsory to trigger the residue exclusion, while keeping the terminal hydroxyl group onto the produced truncated peptide ion. To reinforce this statement, some of the peptides exhibiting the C-terminal exclusion were prepared as amides, the C-terminal carboxylic acid function being replaced by the amide function as the only modification. As expected, the latter amidated sequences did not lose their final residue. Besides, regarding these two peptide free acid and amide MS/MS data subsets, sodiated peptide free acids showed a charge-mediated rearrangement leading to the loss of the last residue whereas the sodiated peptide amides were found to behave differently, showing no such C-terminal amino acid exclusion. Such results were in good agreement with collision activated dissociation experiments that were observed in previous studies with sodiated C-terminal free acid or amide peptides [36, 39].

To ascertain these results, two analytical strategies were undertaken by performing multiple dissociation stages and by fragmenting sodiated molecular ions.

First, MS³ experiments were conducted to dissociate the shortened peptide fragment ion. For instance, the MS³ mass spectra recorded in ESI-QqTOF from the truncated C-terminal fragment of the two selected singly protonated peptide free acids (ALGSRAGY from ALGSRAGYP and

WFAPPRVGY from WFAPPRVGYL) are reproduced in Figure 4. These mass spectra can be compared with the MS/MS data recorded in both CID ESI-QqTOF and LID MALDI-TOF/TOF shown in Figures 2 and 3, respectively. As expected, the truncated ions that were dissociated showed again the exclusion of the C-terminal residue while keeping the other N-terminal related sequences ions unchanged, proving that the peptide structural modification only affected the C-terminal part and confirming the structure of such a sequence fragment ion. Moreover, to gain confidence in the attribution of a ($b_{n-1}+H_2O$) ion for the truncated peptide fragment ion and gain better insights into the rupture pathway, the MS³ data of two peptides (R-1: FPARVGS and R-4: FPARVGK) were matched up to the MS/MS spectrum of the corresponding synthetic truncated peptide (FPARVG) as displayed in Figure 5. The two MS³ were similar to the MS² data of the short synthetic peptide. The fragment ion produced by C-terminal residue exclusion was certainly structurally very close to a linear protonated sequence.

Second, sodiated molecular ions of peptide free acids (MNa^+) were fragmented and the MS/MS data were compared with the ones recorded from the corresponding protonated species (MH^+). Regarding the former, the exclusion of the C-terminal residue was observed as expected from literature data [36, 39] (Figure S4, entry K-4). Besides, most of the fragment ions that were detected from the MNa^+ precursor ion corresponded to the sodiated or protonated species of the sequence fragment ions recorded from the MH^+ species. This experiment allowed gathering additional information leading to the C-terminal sequence restriction from charge-sequestered molecular ion as proposed by Bythell et al. [10] and Lebrilla et al. [39].

Influence of the Charge State of the Precursor Ion on C-Terminal Residue Exclusion

Although it has been depicted in the literature that some peptides were prompt to lose a part of their chain as a neutral molecule both from the N- and C-termini of their sequence, it was only described from doubly charged precursor ions resulting in doubly charged sequence ions (b_n^{2+} and y_m^{2+} series) [57]. The exclusion of one residue from doubly charged molecular ion dissociation was never spotted in our peptide ESI-QqTOF MS/MS database. The lack of mobile proton was thus necessary for the rearrangement mechanism. Trapping all ionization protons was obviously more difficult to achieve from multiply charged ions of proteolytic peptides compared with singly charged species. Taking into account that most of the proteomic studies are currently carried out according to shotgun strategies involving the collision-induced dissociations in ESI-MS/MS of doubly- and triply charged precursor ions [58], the described exclusion phenomenon mainly concerns sequencing methodologies based on MALDI-TOF/TOF analyses. This atypical

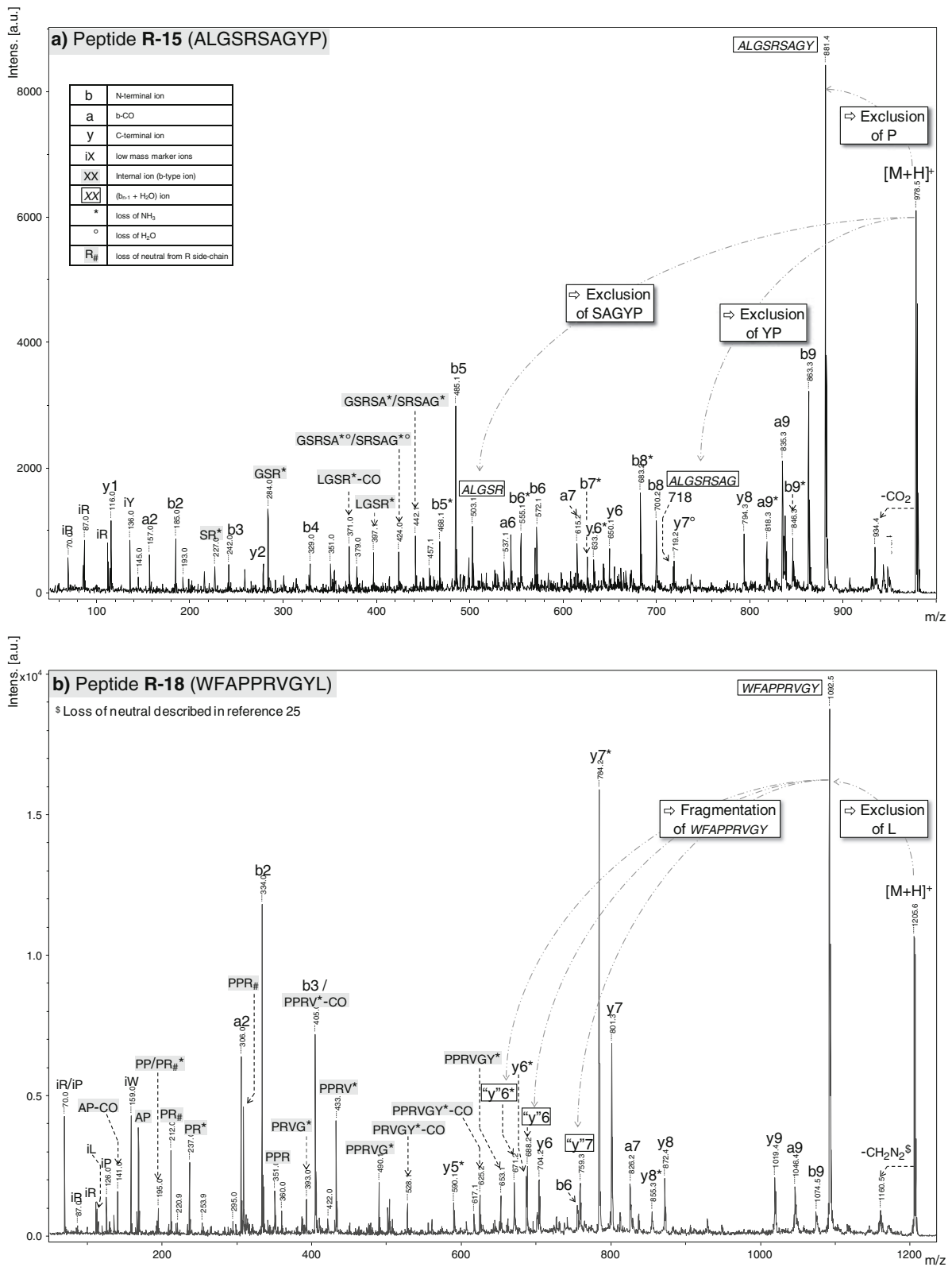


Figure 3. LID MALDI MS/MS spectra of the $[M+H]^+$ precursor ion of (a) peptide R-15 (ALGSRSAAGYP), (b) peptide R-18 (WFAPPRVGYL)

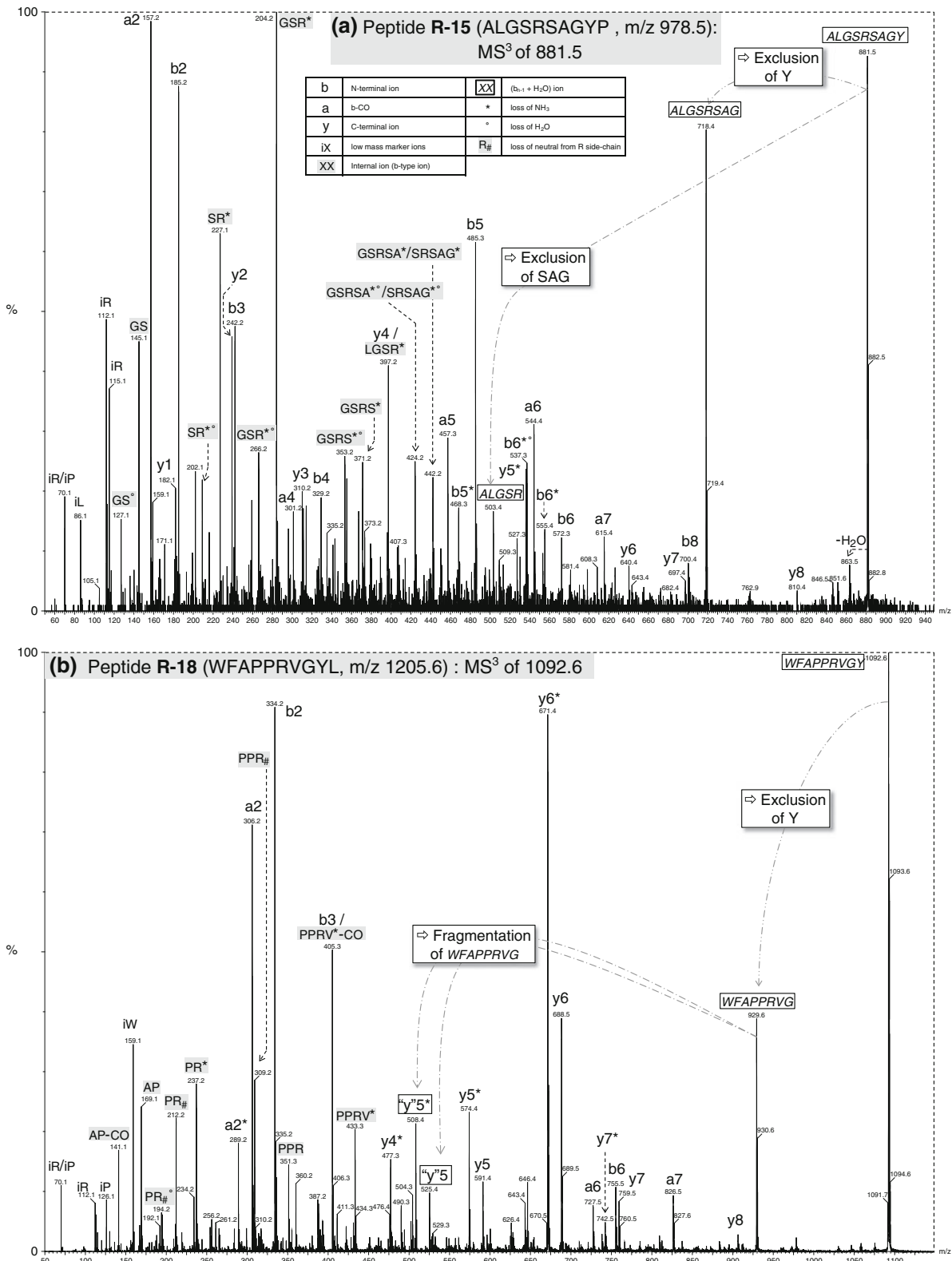


Figure 4. ESI MS³ spectra upon CID of the [(M - X) + H]⁺ precursor ion of **(a)** peptide R-15 (ALGSR^{*}SAGYP), **(b)** peptide R-18 (WFAPPRVGYL)

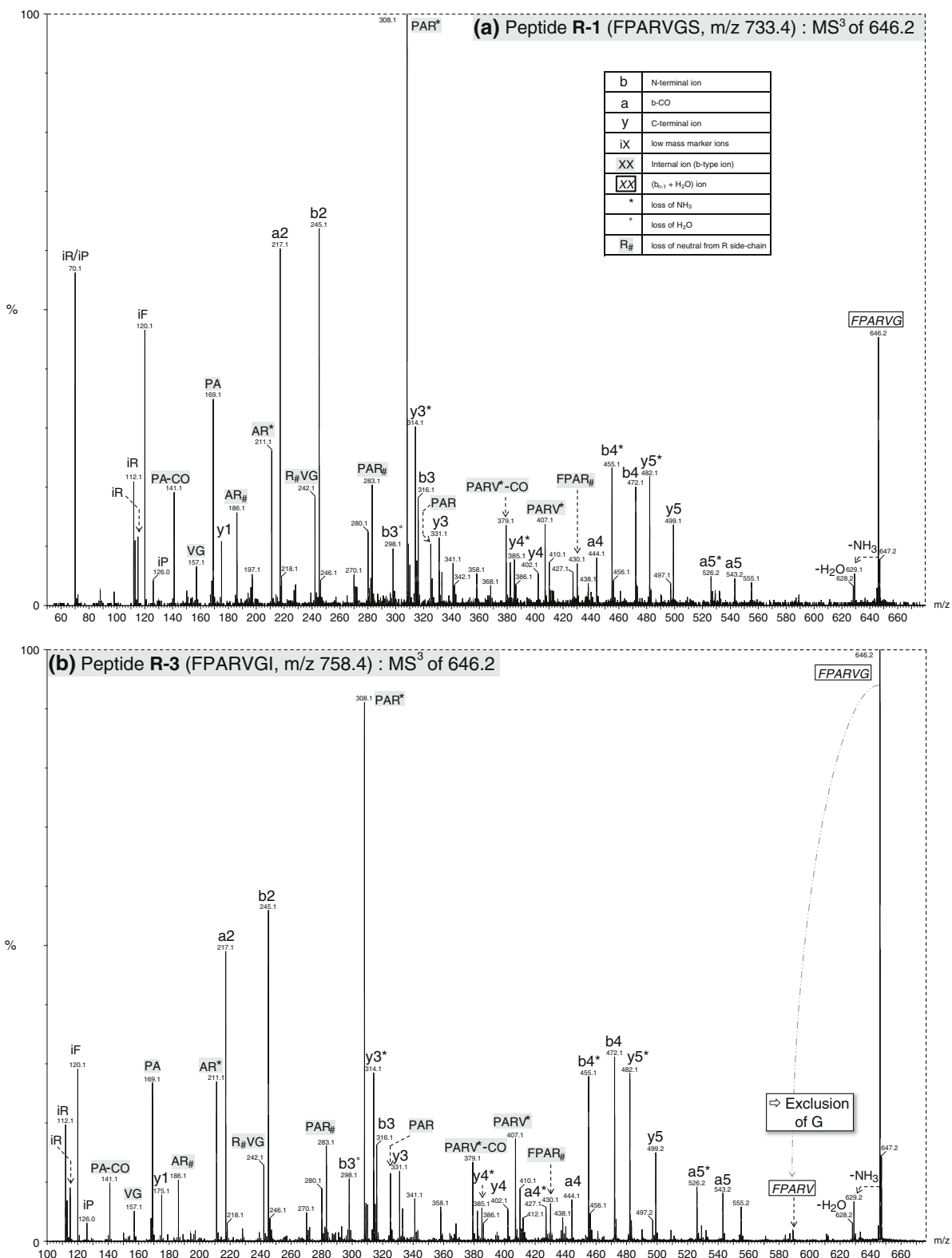


Figure 5. ESI MS³ spectra upon CID of the [(M - X)+H]⁺ precursor ion of (a) peptide R-1 (FPARVGS), (b) peptide R-3 (FPARVGI), and ESI MS/MS spectra upon CID of the [M+H]⁺ precursor ion of (c) peptide R-19 (FPARVG)

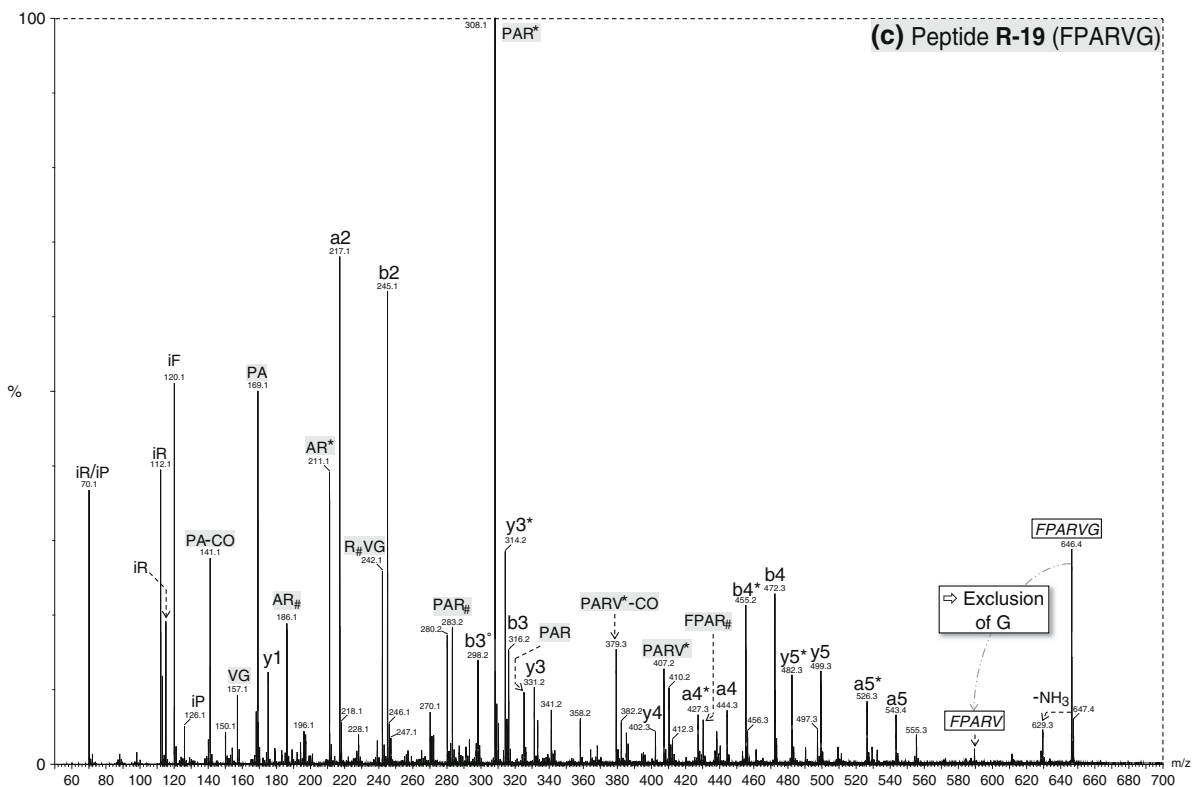


Figure 5. (continued)

fragmentation might be deleterious for efficient correct sequence assignment, especially when proteolysis is carried out with others enzymes than trypsin such as Lys-N [28], Asp-N [59], and Glu-C [60] proteases, which produce peptides bearing arginine and histidine anywhere within the proteolytic sequences.

Influence of the Amino Acid Positioned at the C-Terminus on C-Terminal Residue Exclusion

A series of peptide free acids differing from the nature of the amino acid at the C-terminus (FPARVG \underline{X}) were prepared to ascertain the influence of this residue on the exclusion. At least one amino acid from each class (aliphatic, aromatic, not charged, acidic, and basic side chains) was selected for the determination of the significance of the C-terminal position (\underline{X} =I, Y, S, C, Q, E, R, K, H). All peptides with different molecular ion m/z values exhibited upon activation the same fragment ion at m/z 646 issued from the amino acid exclusion and corresponding to the common protonated FPARVG sequence ion (Figure 6, entries R-1, R-4, and R-8 in Table 1). Besides, as discussed previously, the MS/MS spectrum of the synthetic FPARVG peptide was identical to any of the MS³ data recorded from the m/z 646 (exclusion ion present in all dissociation spectra). Thus,

production of such a non-scrambled fragment ion was not dependent on the nature of the amino acid located at the extreme sequence end undergoing the rearrangement. However, the abundance of this ion was affected. Very surprisingly, in contrast to literature data [7, 9, 10], the presence of a basic residue at the C-terminal position provided the most intense signal for the neutral loss, as demonstrated in Table 1, by comparing the relative abundance of the m/z 646 ion both in ESI- and MALDI-MS/MS (Figure 6, Figures S5 and S6, entries R1 to R-9). Altogether, the exclusion occurred from all classes of amino acids (Table 1). All aliphatic, aromatic, basic, and acid residues were excluded at least once. Only the loss of methionine, threonine, and asparagine belonging to the non-charged residues was not exemplified in our peptide free acid data set, whereas serine, proline, cysteine, and glutamine were successfully tested.

Necessity of the presence of at least one basic amino acid on C-terminal residue exclusion

Provided that singly charged precursor ions of peptide free acid were activated, only sequences bearing a basic residue (R, H, or K) showed the C-terminal neutral exclusion. Above all, it should be emphasized that arginine caused the most outstanding exclusion as previously observed by others [6–10]. Indeed, compared with histidine and lysine, the

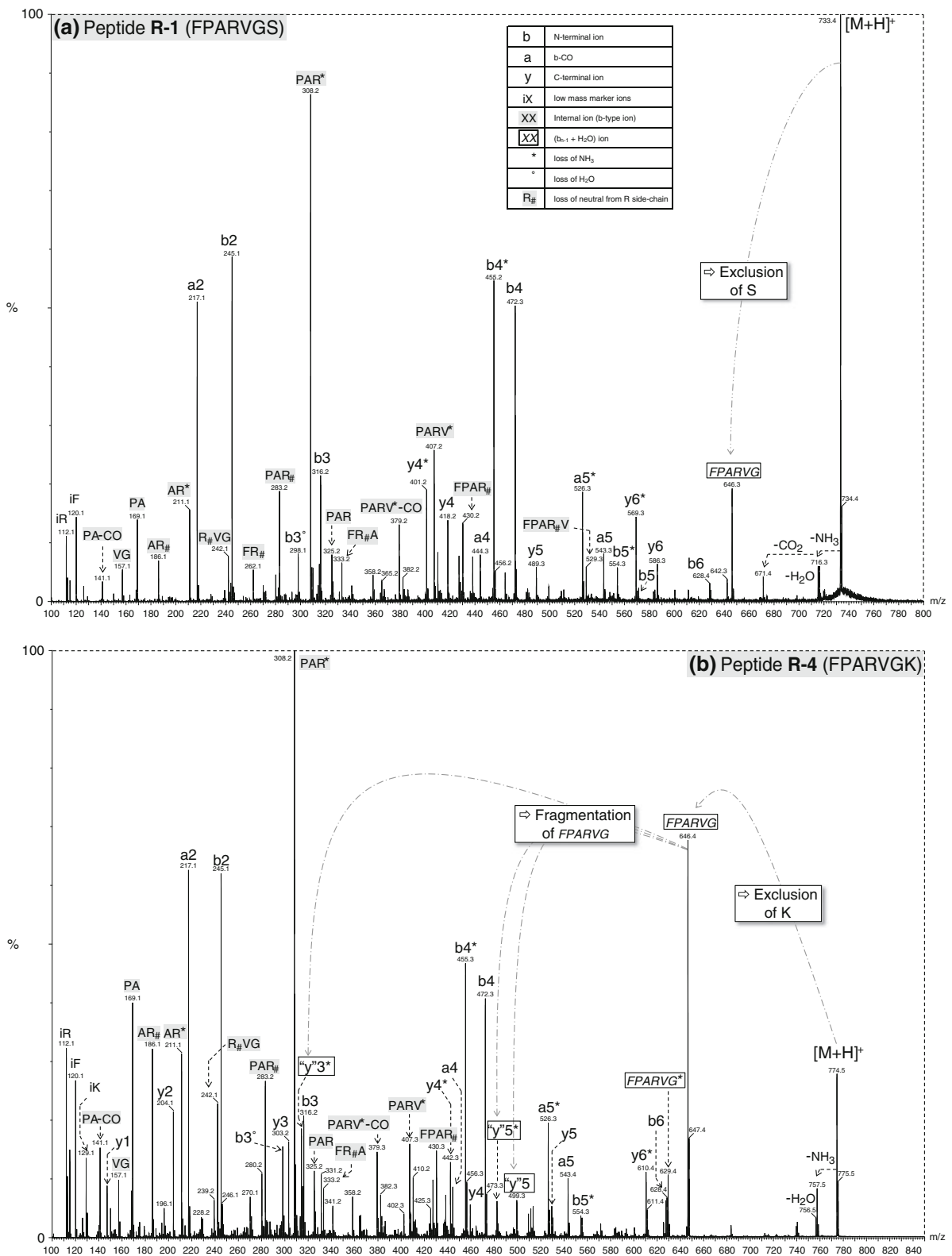


Figure 6. ESI MS/MS spectra upon CID of the $[M+H]^+$ precursor ion of (a) peptide R-1 (FPARVGS), (b) peptide R-4 (FPARVGK), and (c) peptide R-8 (FPARVGR)

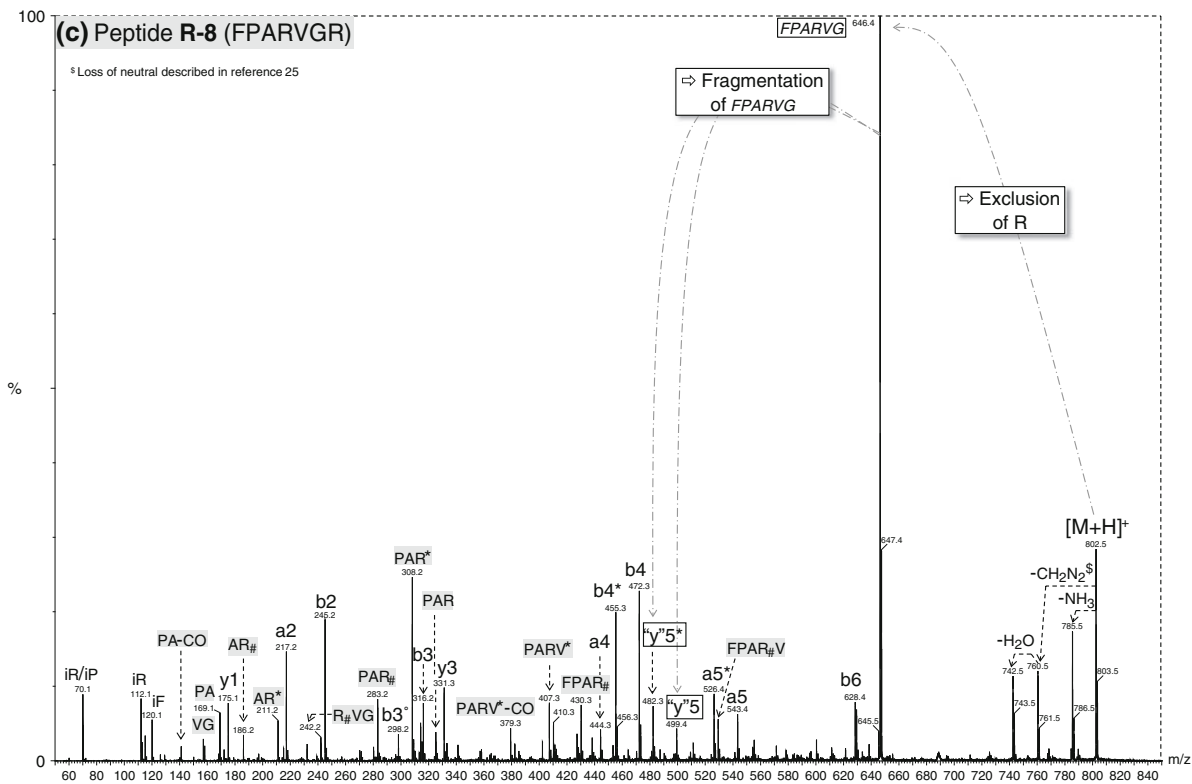


Figure 6. (continued)

presence of arginine within the chain led to the most abundant truncated peptide, which is encountered in the case of trypsin miscleavage of the C-terminal protein sequence or with other digestion enzymes (Lys-N, Asp-N, Glu-C). This exclusion signal was even more intense, provided that another basic residue (R, H, or K) was located at the C-terminal position. The latter situation with C-terminal R and K corresponds to trypsin miscleavage peptides (Table 1, entries R-4, R-8, B-7). When histidine and lysine were present within the sequence, the exclusion was less prominent even for tryptic peptides terminated by arginine (Table 1, entries H-2, H-5, H-6) or by lysine (Table 1, entries H-3, H-4). The relative position of the basic residue sequestering the ionizing proton in the sequence did not significantly influence the C-terminal exclusion (Table 1, entries R-11, R-12). On the other hand, we have unexpectedly observed lysine exclusion for some lysine-terminated tryptic peptides that did not contain any other additional basic residue (Table 1, entries X-1 to X-4). The fragment ion was always weak and this behavior was never encountered with C-terminal arginine-terminated tryptic peptides. Considering all these results, in the context of trypsin digestion, the detection of an abundant truncated ion from the singly charged precursor ion strongly indicated a miscleavage peptide bearing arginine within the chain. Besides, the neutral loss designated the C-terminal residue (loss of 128 for K and loss of 156 for R). For tryptic peptides that were assigned as miscleavage sequence in conventional proteomic

shotgun workflow, it could be judicious to perform the dissociation of the singly charged molecular ion, either in ESI- or MALDI-MS/MS, to ascertain the sequencing output by observing, or not, the expected neutral loss of 128 or 156 Da.

Importance of the Exclusion Pathway among the Production of Non-Scrambled Sequence Fragment Ions Other than $b_n/a_n/y_m$ Ions

Efficient peptide sequencing relies on the extensive formation of complementary b_n and y_m fragment ion series giving information on both N-terminal and C-terminal chains, respectively. However, in addition to such common protonated amide backbone dissociation producing direct sequence ions, i.e., protonated five-membered ring oxazolones (b ions) and protonated truncated peptides (y ions), other fragmentation pathways have been reported in the literature [46]. Indeed, after the ionizing proton migration along the peptide chain, several dissociation mechanisms are in competition, leading to the production of ions that may not be directly related to the initial primary sequence [4]. Such ions formed by rearrangement and multiple bond cleavages disturb the MS/MS spectra and may even lead to incorrect sequence assignment. One illustration of such detrimental behavior is known as peptide scrambling by means of cyclization and reopening of b_n ions [12, 13]. The extent of such nondirect sequence fragment ion formation and the impact of these sequence permutations on peptide

identification relevance in shotgun proteomics studies are under debate today [14, 15]. Despite the great interest raised by the scrambling phenomenon [12–22], less attention has been devoted in the proteomics community to the presence of fragment ions that are not produced by the conventional b_n - y_m backbone amide pathway but that retain the primary sequence information. As such, one can mention, first, nonspecific fragmentation by the loss of neutral molecules (mainly H_2O , NH_3 , CO , ...) [61, 62], and second, the production of internal fragment ions [63, 64], especially when residues such as proline, histidine, and arginine were present in the sequence [23, 24]. These ‘parasite’ additional ions complicated the MS/MS spectra, which were overall exhibiting lots of ion series (b_n , a_n , y_m , and so-called ‘ b_n -type’ internal ions), but they are less deleterious for correct sequencing than scrambled sequences. Although the detection of these non-scrambled internal fragments did not hamper automatic peptide MS/MS assignment in proteomic workflow [15], we believe that they can provide relevant information for *de novo* peptide sequencing, especially for the C-terminal amino acid exclusion. Thus, we have explored our peptide data set to probe the formation extent of fragment ions that keep the primary sequence unaffected but differs from the fully characterized b_n/a_n and y_m ions. As expected, the loss of water and ammonia, as well as the formation of non scrambled internal b-type ions were observed for some peptides, leading to duplicated sequence ion series on the MS/MS spectra. The C-terminal exclusion behavior contrasts with all aforementioned fragmentations initiating multiple formations of ions from the activated precursor ion (such as series of b_n , a_n , y_m , b_n-H_2O , b_n-NH_3 , internal ions, ...). Only very few ions in the MS/MS spectra were related to a C-terminal neutral loss, since in most cases, only the extreme residue was concerned and scarcely the C-terminal dipeptide or tripeptide. The fragment ions corresponding to these dissociations were not as abundant as the single amino acid exclusion. For instance, the MS/MS data of the two peptide free acids ALGSRSGYP and WFAPRVGYL (Table 1, entries R-15 and R-18, respectively) reproduced in Figure 2 showed the exclusion of a single amino acid (P or L) and formally of a dipeptide (YP or YL), the latter loss being far less intense. Even if MS³ experiments shown in Figure 4 showed the loss of tyrosine from both protonated truncated y-type fragment ions as discussed previously, it is difficult to exclude that this ion could also be directly produced from the protonated molecular ion by the loss of a neutral cyclic dipeptide (diketopiperazine). Moreover, when the fragment ion produced by a C-terminal neutral exclusion was very abundant (>50% relative abundance at least in the MS/MS spectrum), some others second generation fragmentations occurring from the protonated truncated ($b_{n-1}+H_2O$) fragment ion were observed in few cases (Figures 2b and 3b). Regarding other non-scrambled sequence ions, loss of small neutral molecules such as water and ammonia usually occurs from several fragment ions duplicating the sequence b_n and y_m

fragment ion series. In the same manner, the production of b-type internal ions are typically triggered by a specific amino acid (P, R, or H) but the length of the fragment is varying a lot leading to populated internal ion series as seen in Figures 2 and 3. In contrast, C-terminal exclusion of a single residue or even of a dipeptide produced few non-scrambled fragment ions indicating a very specific dissociation pathway that can be exploited for detailed sequence assignment (confirmation of trypsin miscleavage, determination of the amino acid at the C-terminus).

Conclusion

A rather frequent peptide backbone fragmentation occurring from basic amino acid-containing free acid sequences was pointed out by screening a data set of 392 MS/MS data gathered from the collision- and laser-induced dissociation of singly charged molecular ions. Far from being an epiphenomenon, the loss of a neutral residue can be envisaged on both N- and C-terminal sides of the peptide chain. The a_1 - y_{m-1} pathway led to a C-terminal y ion by the loss of the N-terminal residue, whereas the observed C-terminal neutral residue loss gave rise to a shortened peptide possessing the structure of a ($b_{n-1}+H_2O$) ion. Great caution must be taken when detecting the loss of a residue from the precursor ion that represents a potent pitfall especially in *de novo* peptide sequencing (N- versus C-terminal amino acid determination).

Acknowledgments

The authors thank Dr. P. Verdié, Dr. L. Mouls, and Dr. N. Shenar for participating in the peptide collection elaboration.

References

- Mann, M., Aebersold, R.: *Mass spectrometry-based proteomics*. *Nature* **422**, 198–207 (2003)
- Dongré, A.R., Jones, J.L., Somogyi, A., Wysocki, V.H.: Influence of peptide composition, gas-phase basicity and chemical modification on fragmentation efficiency: Evidence for the mobile proton model. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **118**, 8365–8374 (1996)
- Kapp, E.A., Schutz, F., Reid, G.E., Eddes, J.S., Moritz, R.L., O’Hair, R. A., Speed, T.P., Simpson, R.J.: Mining a tandem mass spectrometry database to determine the trends and global factors influencing peptide fragmentation. *Anal. Chem.* **75**, 6251–6264 (2003)
- Paizs, B., Suhai, S.: Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrom. Rev.* **24**, 508–548 (2005)
- Boyd, R., Somogyi, A.: The mobile proton hypothesis in fragmentation of protonated peptides: A perspective. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **21**, 1275–1278 (2010)
- Thorne, G.C., Ballard, K.D., Gaskell, S.J.: Metastable decomposition of peptide $[M+H]^+$ ions via rearrangement involving loss of the C-terminal amino acid residue. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1**, 249–257 (1990)
- Gonzalez, J., Besada, V., Garay, H., Reyes, O., Padron, G., Tambara, Y., Takao, T., Shimonishi, Y.: Effect of position of a basic amino acid on C-terminal rearrangement of protonated peptides upon collision-induced dissociation. *J. Mass Spectrom.* **31**, 150–158 (1996)
- Farrugia, J.M., O’Hair, R.A.J.: Involvement of salt bridges in a novel gas phase rearrangement of protonated arginine-containing dipeptides, which precedes fragmentation. *Int. J. Mass Spectrom.* **222**, 229–242 (2003)

9. Li, Z., Yalcin, T., Cassidy, C.J.: C-terminal amino acid residue loss for deprotonated peptide ions containing glutamic acid, aspartic acid, or serine residues at the C-terminus. *J. Mass Spectrom.* **41**, 939–949 (2006)
10. Bythell, B.J., Csonka, I.P., Suhai, S., Barofsky, D.F., Paizs, B.: Gas-phase structure and fragmentation pathways of singly protonated peptides with N-terminal arginine. *J. Phys. Chem. B* **114**, 15092–15105 (2010)
11. Harrison, A.G., Young, A.B., Bleiholder, C., Suhai, S., Paizs, B.: Scrambling of sequence information in collision-induced dissociation of peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 10364–10365 (2006)
12. Bleiholder, C., Osburn, S., Williams, T.D., Suhai, S., Van Stipdonk, M., Harrison, A.G., Paizs, B.: Sequence-scrambling fragmentation pathways of protonated peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 17774–17789 (2008)
13. Erlekam, U., Bythell, B.J., Scuderi, D., Van Stipdonk, M., Paizs, B., Maître, P.: Infrared spectroscopy of fragments of protonated peptides: direct evidence for macrocyclic structures of b₅ ions. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 11503–11508 (2009)
14. Yu, L., Tan, Y., Tsai, Y., Goodlett, D.R., Polfer, N.C.: On the relevance of peptide sequence permutations in shotgun proteomics studies. *J. Proteome Res.* **10**, 2409–2416 (2011)
15. Goloborodko, A.A., Gorshkov, M.V., Good, D.M., Zubarev, R.A.: Sequence scrambling in shotgun proteomics is negligible. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **22**, 1122–1124 (2011)
16. Chen, X., Yu, L., Steill, J.D., Oomens, J., Polfer, N.C.: Effect of peptide fragment size on the propensity of cyclization in collision-induced dissociation: oligoglycine b₂-b₈. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 18272–18282 (2009)
17. Molesworth, S., Osburn, S., Van Stipdonk, M.J.: Influence of size on apparent scrambling of sequence during CID of b-type ions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **20**, 2174–2181 (2009)
18. Molesworth, S., Osburn, S., Van Stipdonk, M.J.: Influence of amino acid side chains on apparent opening of cyclic b₅ ions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **21**, 1028–1036 (2010)
19. Molesworth, S., Van Stipdonk, M.J.: Apparent inhibition by arginine of macrocyclic b ion formation from singly charged protonated peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **21**, 1322–1328 (2010)
20. Bythell, B.J., Knapp-Mohammady, M., Paizs, B., Harrison, A.G.: Effect of the His residue on the cyclization of b ions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **21**, 1352–1363 (2010)
21. Saminathan, I.S., Wang, X.S., Guo, Y., Krakovska, O., Voisin, S., Hopkinson, A.C., Siu, K.W.M.: The extent and effects of peptide sequence scrambling via formation of macrocyclic b ions in model peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **21**, 2085–2094 (2010)
22. Atik, A.E., Yalcin, T.: A systematic study of acidic peptides for b-type sequence scrambling. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **22**, 38–48 (2011)
23. Mouls, L., Aubagnac, J.-L., Martinez, J., Enjalbal, C.: Low energy peptide fragmentations in an ESI-Q-ToF type mass spectrometer. *J. Proteome Res.* **6**, 1378–1391 (2007)
24. Shenar, N., Sommerer, N., Martinez, J., Enjalbal, C.: Comparison of LID versus CID activation modes in tandem mass spectrometry of peptides. *J. Mass Spectrom.* **44**, 621–632 (2009)
25. Dupré, M., Cantel, S., Verdié, P., Martinez, J., Enjalbal, C.: Sequencing Lys-N Proteolytic Peptides by ESI and MALDI Tandem Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc. Mass Spectrom.* **22**, 265–279 (2011)
26. Mouls, L., Subra, G., Aubagnac, J.-L., Martinez, J., Enjalbal, C.: Tandem mass spectrometry of amidated peptides. *J. Mass Spectrom.* **41**, 1470–1483 (2006)
27. Olsen, J.V., Ong, S.-E., Mann, M.: Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol. Cell. Proteom.* **3**, 608–614 (2004)
28. Nonaka, T., Hashimoto, Y., Takio, K.: Kinetic characterization of lysine-specific metalloendopeptidases from *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies. *J. Biochem.* **124**, 157–162 (1998)
29. Hohmann, L., Sherwood, C., Eastham, A., Peterson, A., Eng, J.K., Eddes, J.S., Shteynberg, D., Martin, D.B.: Proteomic analyses using *Grifola frondosa* metalloendopeptidase Lys-N. *J. Proteome Res.* **8**, 1415–1422 (2009)
30. Wysocki, V.H., Tsaprailis, G., Smith, L.L., Breci, L.A.: Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *J. Mass Spectrom.* **35**, 1399–1406 (2000)
31. Bythell, B.J., Suhai, S., Somogyi, A., Paizs, B.: Proton-driven amide bond-cleavage pathways of gas-phase peptide ions lacking mobile protons. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 14057–14065 (2009)
32. Tsaprailis, G., Somogyi, A., Nikolaev, E.N., Wysocki, V.H.: Refining the model for selective cleavage at acidic residues in arginine-containing protonated peptides. *Int. J. Mass Spectrom.* **195/196**, 467–479 (2000)
33. Paizs, B., Suhai, S., Hargittai, B., Hruby, V.J., Somogyi, A.: Ab initio and MS/MS studies on protonated peptides containing basic and acidic amino acid residues: I. Solvated proton versus salt-bridged structures and the cleavage of the terminal amide bond of protonated RD-NH₂. *Int. J. Mass Spectrom.* **219**, 203–232 (2002)
34. Huang, Y., Wysocki, V.H., Tabb, D.L., Yates III, J.R.: The influence of histidine on cleavage C-terminal to acidic residues in doubly protonated tryptic peptides. *Int. J. Mass Spectrom.* **219**, 233–244 (2002)
35. Tsaprailis, G., Nair, H., Zhong, W., Kuppanan, K., Futrell, J.H., Wysocki, V.H.: A mechanistic investigation of the enhanced cleavage at histidine in the gas-phase dissociation of protonated peptides. *Anal. Chem.* **76**, 2083–2094 (2004)
36. Tomer, K.B., Deterding, L.J., Guenat, C.: Collisionally activated dissociation spectra of sodiated peptides and peptides amides. *Bio. Mass Spectrom.* **20**, 121–129 (1991)
37. Lin, T., Payne, A.H., Glish, G.L.: Dissociation pathways of alkalinized peptides: opportunities for C-terminal peptide sequencing. *J. Am. Chem. Soc.* **12**, 497–504 (2000)
38. Kish, M.M., Wesdemiotis, C.: Selective cleavage at internal lysine residues in protonated versus metalated peptides. *Int. J. Mass Spectrom.* **227**, 191–203 (2003)
39. Feng, W.Y., Gronert, S., Fletcher, K.A., Warren, A., Lebrilla, C.B.: The mechanism of C-terminal fragmentations in alkali metal ion complexes of peptides. *Int. J. Mass Spectrom.* **222**, 117–134 (2003)
40. Polce, M.J., Ren, D., Wesdemiotis, C.: Dissociation of the peptide bond in protonated peptides. *J. Mass Spectrom.* **35**, 1391–1398 (2000)
41. Vaisar, T., Urban, J.: Probing the proline effect in CID of protonated peptides. *J. Mass Spectrom.* **31**, 1185–1187 (1996)
42. Maux, D., Enjalbal, C., Martinez, J., Aubagnac, J.-L.: New example of a proline-induced fragmentation in ESI mass spectrometry of peptides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, 1470–1475 (2002)
43. Breci, L.A., Tabb, D.L., Yates, J.R., Wysocki, V.H.: Cleavage N-terminal to proline: analysis of a database of peptide tandem mass spectra. *Anal. Chem.* **75**, 1963–1971 (2003)
44. Unnithan, A.G., Myer, M.J., Veale, C.J., Danell, A.S.: MS/MS of protonated polyproline peptides: The influence of N-terminal protonation on dissociation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 2198–2203 (2007)
45. Yalcin, T., Harrison, A.G.: Ion chemistry of protonated lysine derivatives. *J. Mass Spectrom.* **31**, 1237–1243 (1996)
46. O’Hair, R.A.J.: The role of nucleophile–electrophile interactions in the unimolecular and bimolecular gas-phase ion chemistry of peptides and related systems. *J. Mass Spectrom.* **35**, 1377–1381 (2000)
47. Farrugia, J.M., Taverner, T., O’Hair, R.A.J.: Side-chain involvement in the fragmentation reactions of protonated methyl esters of histidine and its peptides, which precedes fragmentation. *Int. J. Mass Spectrom.* **209**, 99–112 (2001)
48. Stewart, J.M., Young, J.D.: Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd edn. Pierce Chemical Company, Rockford, IL (1984)
49. Gu, C.; Somogyi, A.; Wysocki, V. H.; Medzihradsky, K. F. Fragmentation of protonated oligopeptides XLDVQL (X=L, H, K, R) by surface induced dissociation: additional evidence for the ‘mobile proton’ model. *Anal. Chim. Acta.* **397**, 247–256 (1999)
50. Tsaprailis, G., Nair, H., Somogyi, A., Wysocki, V.H., Zhong, W., Futrell, J.H., Summerfield, S.G., Gaskell, S.J.: Influence of secondary structure on the fragmentation of protonated peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 5142–5154 (1999)
51. Macht, M., Asperger, A., Deiningner, S.-O.: Comparison of laser-induced dissociation and high-energy collision-induced dissociation using matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight (MALDI-TOF/TOF) for peptide and protein identification. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 2093–2105 (2004)
52. Campbell, J.M., Vestal, M.L., Blank, P.S., Stein, S.E., Epstein, J.A., Yergey, A.L.: Fragmentation of leucine enkephalin as a function of laser fluence in a MALDI TOF-TOF. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 607–616 (2007)
53. Suckau, D., Resemann, A., Schuereberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., Holle, A.: A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **376**, 952–965 (2003)
54. Falkner, J.A., Kachman, M., Veine, D.M., Walker, A., Strahler, J.R., Andrews, P.C.: Validated MALDI-TOF/TOF mass spectra for protein standards. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 850–855 (2007)

M. Dupré et al.: C-terminal residue exclusion in MS/MS of peptides

55. Enjalbal, C., Martinez, J., Aubagnac, J.-L.: Mass spectrometry in combinatorial chemistry. *Mass Spectrom. Rev.* **19**, 139–161 (2000)
56. Moneti, G., Francese, S., Mastrobuoni, G., Pieraccini, G., Seraglia, R., Valitutti, G., Traldi, P.: Do collisions inside the collision cell play a relevant role in CID-LIFT experiments? *J. Mass Spectrom.* **42**, 117–126 (2007)
57. Salek, M., Lehmann, W.D.: Neutral loss of amino acid residues from protonated peptides in collision-induced dissociation generates N- or C-terminal sequence ladders. *J. Mass Spectrom.* **38**, 1143–1149 (2003)
58. Michalski, A., Cox, J., Mann, M.: More than 100,000 detectable peptide species elute in single shotgun proteomics runs but the majority is inaccessible to data-dependent LC-MS/MS. *J. Proteome Res.* **10**, 1785–1793 (2011)
59. Ingrosso, D., Fowler, A.V., Bleibaum, J., Clarke, S.: Specificity of endoproteinase Asp-N (*Pseudomonas fragi*): cleavage at glutamyl residues in two proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**, 1528–1534 (1989)
60. Drapeau, G.R., Boily, Y., Houmar, J.: Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **247**, 6720–6726 (1972)
61. Neta, P., Pu, Q.-L., Kilpatrick, L., Yang, X., Stein, S.E.: Dehydration versus deamination of N-terminal glutamine in collision-induced dissociation of protonated peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 27–36 (2007)
62. Pingitore, F., Polce, M.J., Wang, P., Wesdemiotis, C., Paizs, B.: Intramolecular condensation reactions in protonated dipeptides: carbon monoxide, water, and ammonia losses in competition. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **15**, 1025–1038 (2004)
63. Khatun, J., Ramkissoon, K., Giddings, M.C.: Fragmentation characteristics of collision-induced dissociation in MALDI TOF/TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* **79**, 3032–3040 (2007)
64. Rogalski, J.C., Lin, M.S., Sniatynski, M.J., Taylor, R., Youhnovski, N., Przybylski, M., Kast, J.: Statistical evaluation of electrospray tandem mass spectra for optimized peptide fragmentation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **16**, 505–514 (2005)

I.5.2. Illustrations complémentaires

Peptide synthesis.

La synthèse des peptides présentée dans le "supporting information" original n'a pas été incluse dans cette partie du manuscrit. Elle est consultable dans l'Annexe 3 – synthèse peptidique sur support semi-automatisée.

Table S1. Peptide dataset

Entry	Peptide sequences	M (g/mol)	C-ter	Category
1	LRAVAIA	711,44	Acid	C-ter miscleavage
2	AVAIRDA	714,37	Acid	C-ter miscleavage
3	FPAKVG I	730,40	Acid	C-ter miscleavage
4	FPARVGS	732,39	Acid	C-ter miscleavage
5	FPARVGC	748,37	Acid	C-ter miscleavage
6	FPARVGI	758,41	Acid	C-ter miscleavage
7	FPARVGQ	773,42	Acid	C-ter miscleavage
8	FPARVGE	774,40	Acid	C-ter miscleavage
9	FPARVGH	782,42	Acid	C-ter miscleavage
10	FPARVGY	808,42	Acid	C-ter miscleavage
11	FVAEKFA	810,39	Acid	C-ter miscleavage
12	FAVEKFA	810,39	Acid	C-ter miscleavage
13	PRPQLPY	869,44	Acid	C-ter miscleavage
14	ALGSR SAGYP	977,45	Acid	C-ter miscleavage
15	AFAMVGKLA E	1035,50	Acid	C-ter miscleavage
16	MLGFR SVGYA	1099,50	Acid	C-ter miscleavage
17	CLVAISARYW	1180,56	Acid	C-ter miscleavage
18	WFAPPRVGYL	1204,59	Acid	C-ter miscleavage
19	DLHG FALAMVGKLAV	1540,77	Acid	C-ter miscleavage
20	VLHDFAFAMVGKLA E	1646,78	Acid	C-ter miscleavage
21	KG FCL	566,71	Acid	Lys-N
22	KAF LHG	671,79	Acid	Lys-N
23	KAF HLG	671,79	Acid	Lys-N
24	KAF LRG	690,83	Acid	Lys-N
25	KAF RLG	690,83	Acid	Lys-N
26	KYP FEAL	867,00	Acid	Lys-N
27	KMV NLHIQ	982,19	Acid	Lys-N
28	KAD FPQLMV	1048,26	Acid	Lys-N
29	KED FPQLMV	1106,29	Acid	Lys-N
30	KYI WLSRAV	1135,36	Acid	Lys-N
31	KEAHMTIVFC SA	1336,58	Acid	Lys-N
32	KSWDTLCMAGR F	1414,65	Acid	Lys-N
33	KWFGMLADQATYN	1544,72	Acid	Lys-N
34	KATCGRVNSASMYDAI	1686,90	Acid	Lys-N
35	KTRYNGMGEQWDPD	1696,79	Acid	Lys-N
36	AVG KKKK	757,48	Acid	Miscleavage
37	FPARV GK	773,42	Acid	miscleavage
38	FPARV GK	773,42	Acid	Miscleavage
39	FPARV GR	801,46	Acid	miscleavage
40	FPARV GR	801,46	Acid	Miscleavage
41	VLHDFAFAMVGPLAEYK	1906,90	Acid	Other
42	TGVAL	358,20	Acid	Other

43	AFAL	420,22	Acid	Other
44	AFALV	519,28	Acid	Other
45	IPAVLGA	639,36	Acid	Other
46	IVAVLGA	641,38	Acid	Other
47	LSAVAIA	643,36	Acid	Other
48	LASVAIA	643,36	Acid	Other
49	LAVSAIA	643,36	Acid	Other
50	LAVAISA	643,36	Acid	Other
51	LAVAIAS	643,36	Acid	Other
52	LTAVAIA	657,37	Acid	Other
53	LATVAIA	657,37	Acid	Other
54	LAVTAIA	657,37	Acid	Other
55	LAVAITA	657,37	Acid	Other
56	LAVGIAE	671,35	Acid	Other
57	APIAGFV	673,35	Acid	Other
58	AGNVDFG	678,27	Acid	Other
59	AGVDNFG	678,27	Acid	Other
60	AGVDFGN	678,27	Acid	Other
61	ALIAGFV	689,38	Acid	Other
62	GILFAVA	689,38	Acid	Other
63	IFAVLGA	689,38	Acid	Other
64	AQGVDG	692,29	Acid	Other
65	AFCAGVE	695,27	Acid	Other
66	FPAPVGI	699,36	Acid	Other
67	FDAVAIA	705,34	Acid	Other
68	PQPQASP	723,33	Acid	Other
69	LAVGIAW	728,39	Acid	Other
70	FFAVAIA	737,38	Acid	Other
71	TNGVEYA	752,31	Acid	Other
72	FPDSAFA	753,30	Acid	Other
73	TGQVEYA	766,32	Acid	Other
74	TGVEQYA	766,32	Acid	Other
75	TGVEYAQ	766,32	Acid	Other
76	FPESAFA	767,32	Acid	Other
77	FPCDAFA	769,28	Acid	Other
78	FPCEAFA	783,30	Acid	Other
79	GEVASLTD	790,34	Acid	Other
80	FPADHFA	803,33	Acid	Other
81	FVAHEFA	819,36	Acid	Other
82	GASPQFDC	823,29	Acid	Other
83	PQPQLPF	825,40	Acid	Other
84	PQPNLPY	827,38	Acid	Other
85	PQPQLSY	831,38	Acid	Other
86	SQPQLPY	831,38	Acid	Other
87	PQPELPY	842,38	Acid	Other
88	VYAGEVAH	844,37	Acid	Other
89	VLGHYAGM	846,37	Acid	Other
90	PQPQQPY	856,37	Acid	Other
91	LQPQLPY	857,43	Acid	Other
92	LGHVASLY	858,42	Acid	Other
93	GVLGHINAC	882,40	Acid	Other
94	WGVYAPLT	905,43	Acid	Other
95	GEVAVLGHM	911,41	Acid	Other
96	AFALVGIGLG	916,49	Acid	Other

97	VAVLYAPLT	945,51	Acid	Other
98	WGVYAPLF	951,45	Acid	Other
99	GFTWGVAGY	956,40	Acid	Other
100	AEYLVGFTH	1035,46	Acid	Other
101	WGVYAPLFD	1066,47	Acid	Other
102	QFDLGHINF	1089,48	Acid	Other
103	FITDWAGIWVGFIVP	1718,84	Acid	Other
104	PICAK	530,29	Acid	Tryptic
105	SEGFK	566,27	Acid	Tryptic
106	VTEFK	622,30	Acid	Tryptic
107	FAQIR	633,36	Acid	Tryptic
108	AGVDGPK	642,31	Acid	Tryptic
109	VTEFR	650,31	Acid	Tryptic
110	AGVDGPR	670,31	Acid	Tryptic
111	DIGLVR	671,40	Acid	Tryptic
112	LAVGIAR	698,40	Acid	Tryptic
113	SWAMVK	720,33	Acid	Tryptic
114	TPSSVLK	730,42	Acid	Tryptic
115	SWAMVR	748,34	Acid	Tryptic
116	MWAENK	777,35	Acid	Tryptic
117	YICPADK	808,35	Acid	Tryptic
118	WLIAGDR	829,44	Acid	Tryptic
119	YICPADR	836,35	Acid	Tryptic
120	LGHAPFVR	877,48	Acid	Tryptic
121	YDTSIVQK	952,49	Acid	Tryptic
122	YDTSIVQR	980,49	Acid	Tryptic
123	AFISVGPLAR	1029,55	Acid	Tryptic
124	CASHTFLVR	1032,52	Acid	Tryptic
125	GEVAVLGHMK	1039,50	Acid	Tryptic
126	AFALGTIEDK	1063,50	Acid	Tryptic
127	LMYVHWVK	1074,52	Acid	Tryptic
128	NGFLMCSALK	1082,53	Acid	Tryptic
129	LMYVHWVR	1102,53	Acid	Tryptic
130	PGAHWEAGAK	1135,50	Acid	Tryptic
131	VEYLASITLK	1135,65	Acid	Tryptic
132	GNGQIVFHAAR	1168,60	Acid	Tryptic
133	GHLPTVSEAR	1179,60	Acid	Tryptic
134	WGVYAPLFDK	1194,60	Acid	Tryptic
135	ADPNYHIGETK	1243,58	Acid	Tryptic
136	MLQYGMFVER	1272,60	Acid	Tryptic
137	LESMGVDFNANK	1323,61	Acid	Tryptic
138	AEQVPLGSYDTGK	1363,66	Acid	Tryptic
139	QLDFGEVLANTGR	1418,72	Acid	Tryptic
140	IWDPSNLIQPTK	1481,79	Acid	Tryptic
141	LHFVYMGLAWAIGR	1632,86	Acid	Tryptic
142	CLYEFAFISVGPLAK	1656,86	Acid	Tryptic
143	CLYEFAFISVGPLAR	1684,86	Acid	Tryptic
144	FITDWAGIWVGFIVR	1778,90	Acid	Tryptic
145	GVAFGGVHMLGHFTAWVK	1983,90	Acid	Tryptic
146	GFITDWAGILWVGFIVPK	2018,10	Acid	Tryptic
147	GFITDWAGILWVGFIVPR	2046,10	Acid	Tryptic
148	VGLGAVPIWGLVFPALGWAIFGR	2395,36	Acid	Tryptic
149	CLVAHIGSWVAAWAYGIPVIHVR	2574,37	Acid	Tryptic
150	IGLAGWIVFAPIGLVWFAGLPVIAR	2635,54	Acid	Tryptic

151	YENGLIFMLAFAPLVHIWEAGAPFK	2833,47	Acid	Tryptic
152	FHNGLIFMFAFAPLVHIWEAGAPLR	2853,40	Acid	Tryptic
153	CKAVGIA	659,35	Amide	
154	DKAVGIA	671,36	Amide	
155	PRAVAIA	695,41	Amide	
156	RLAVAIA	711,44	Amide	
157	LRAVAIA	711,44	Amide	
158	LARVAIA	711,44	Amide	
159	LAVRAIA	711,44	Amide	
160	LAVARIA	711,44	Amide	
161	LAVAIRA	711,44	Amide	
162	LAVAIAR	711,44	Amide	
163	RDAVAIA	713,39	Amide	
164	ARDVAIA	713,39	Amide	
165	AVRDAIA	713,39	Amide	
166	AVARDIA	713,39	Amide	
167	AVAIRDA	713,39	Amide	
168	AVAIARD	713,39	Amide	
169	FPAKVGI	729,42	Amide	
170	LAVRIAC	743,45	Amide	
171	FRAVAIA	745,42	Amide	
172	KKAKKVG	756,49	Amide	
173	AKKKKVG	756,49	Amide	
174	FPARVGI	757,42	Amide	
175	LAVRIAE	769,44	Amide	
176	LAVRIAM	771,44	Amide	
177	FPALVKI	785,48	Amide	
178	PFVDRVG	787,40	Amide	
179	FPADKFA	793,38	Amide	
180	LAVRIAY	803,50	Amide	
181	FPAEKFA	807,39	Amide	
182	FVAEKFA	809,41	Amide	
183	FAVEKFA	809,41	Amide	
184	FPALVRI	813,48	Amide	
185	WRAGFAL	818,42	Amide	
186	FPRDAFA	821,39	Amide	
187	FPARDFA	821,39	Amide	
188	FAPRDFFA	821,39	Amide	
189	FPAFRDA	821,39	Amide	
190	FPAFARD	821,39	Amide	
191	FPDRFA	821,39	Amide	
192	FPADRFA	821,39	Amide	
193	FPAFDRA	821,39	Amide	
194	LAVRIAW	826,48	Amide	
195	PFVDRVC	833,42	Amide	
196	FPAERFA	835,40	Amide	
197	FPAREFA	835,40	Amide	
198	ARVQLPY	844,45	Amide	
199	PFVDRVE	859,42	Amide	
200	PFVDRVM	861,41	Amide	
201	PFVDRVH	867,40	Amide	
202	PFVDRVY	893,47	Amide	
203	PFVDRVW	916,45	Amide	
204	AVISVGKDAP	954,51	Amide	

205	ALGSR SAGYP	976,47	Amide
206	AFAMV GKLA E	1034,51	Amide
207	RKNGPLIGAF	1070,59	Amide
208	MLGFR SVGYA	1098,52	Amide
209	AFALGTREDF	1124,52	Amide
210	CLVAISARYW	1179,57	Amide
211	WFAPPRVGYL	1203,60	Amide
212	DLHGFALAMV GKLA V	1539,79	Amide
213	DLHGFALAMV GKIA V	1539,90	Amide
214	CLKEFAFISV GPLAF	1639,81	Amide
215	VLHDFAFAMV GKLA E	1645,79	Amide
216	LFVKWAVGV RALGVKAI	1825,20	Amide
217	GFITDWAGIRW VGFIVPA	2003,08	Amide
218	GFITDWAGIRW VGFIVPS	2019,07	Amide
219	GFITDWAGIRW VGFIVPC	2035,05	Amide
220	GFITDWAGIRW VGFIVPD	2047,07	Amide
221	WLVAFRGVHMA LGKFTAWVG	2244,20	Amide
222	KAKVKGK	756,49	Amide
223	AVGKKKK	756,49	Amide
224	FAFAMV GPLAEYK	1441,74	Amide
225	WAGIRW VGFIVPR	1554,89	Amide
226	LHFVKMGRACA IGR	1556,85	Amide
227	ALKEFAFISV GPLAR	1616,87	Amide
228	LHFVKMGRAWA IGR	1639,85	Amide
229	VLHDFAFAMV GPLAEYK	1905,98	Amide
230	GFITDCAGIRC VGFIVPR	1922,00	Amide
231	GFITDWAGIRW VGFIVPK	2060,10	Amide
232	GFITDWAGIRW VGFIVPR	2088,10	Amide
233	YENGLIFMLA FAPLVHIWEAGAPFK	2832,40	Amide
234	GVAL	357,22	Amide
235	AFAL	419,23	Amide
236	AFALV	518,30	Amide
237	AFALVG	575,32	Amide
238	WLDF	578,26	Amide
239	NSAAGFG	621,26	Amide
240	CPAVGIA	628,31	Amide
241	APALVGI	638,38	Amide
242	IPAVLGA	638,38	Amide
243	PVAVAIA	638,38	Amide
244	DPAVGIA	640,33	Amide
245	AVALVGI	640,39	Amide
246	IVAVLGA	640,39	Amide
247	SLAVAIA	642,37	Amide
248	LSAVAIA	642,37	Amide
249	LASVAIA	642,37	Amide
250	LAVSAIA	642,37	Amide
251	LAVASIA	642,37	Amide
252	LAVAI SA	642,37	Amide
253	LAVAIAS	642,37	Amide
254	CLAVGIA	644,34	Amide
255	LAVGIAC	644,37	Amide
256	GLAVFSG	648,33	Amide
257	PDAVAIA	654,34	Amide
258	D LAVGIA	656,35	Amide

259	TLAVAIA	656,39	Amide
260	LTAVAIA	656,39	Amide
261	LATVAIA	656,39	Amide
262	LAVTAIA	656,39	Amide
263	LAVATIA	656,39	Amide
264	LAVAITA	656,39	Amide
265	LAVAIAT	656,39	Amide
266	TAGFGTN	665,29	Amide
267	LAVGIAE	670,37	Amide
268	APIAGFV	672,36	Amide
269	GPLFAVA	672,36	Amide
270	LAVGIAM	672,37	Amide
271	AVIAGFV	674,38	Amide
272	GVLFAVA	674,38	Amide
273	AGNVDFG	677,29	Amide
274	AGVDNFG	677,29	Amide
275	AGVDFGN	677,29	Amide
276	QSGVAFA	677,32	Amide
277	CFAVGIA	678,32	Amide
278	LAVGIAH	678,40	Amide
279	AVFPAIA	686,38	Amide
280	AVAFPIA	686,38	Amide
281	PFAVAIA	686,38	Amide
282	AFALVGI	688,39	Amide
283	ALIAGFV	688,39	Amide
284	GILFAVA	688,39	Amide
285	IFAVLGA	688,39	Amide
286	FVAVAIA	688,39	Amide
287	DFAVGIA	690,34	Amide
288	AQGVDFG	691,30	Amide
289	AFCAGVE	694,28	Amide
290	IGEGHLA	694,35	Amide
291	AFCAGVM	696,28	Amide
292	FPAPVGI	698,38	Amide
293	YPAVAIA	702,37	Amide
294	PYAVAIA	702,37	Amide
295	FDAVAIA	704,35	Amide
296	SAILFGV	704,39	Amide
297	YVAVAIA	704,39	Amide
298	LAVGIAY	704,42	Amide
299	DMAVGIC	706,28	Amide
300	QAHMGGL	711,32	Amide
301	FPALVGI	714,41	Amide
302	CMAVGIM	722,30	Amide
303	LAVGIAW	727,40	Amide
304	FFAVAIA	736,39	Amide
305	FPAHVGI	738,38	Amide
306	AFALVGIG	745,41	Amide
307	PYVACAE	750,31	Amide
308	AFCAGVW	751,32	Amide
309	TNGVEYA	751,32	Amide
310	AWLGAHV	751,38	Amide
311	PYVACAM	752,30	Amide
312	FPSDAFA	752,32	Amide

313	FPDSAFA	752,32	Amide
314	FYAVAIA	752,39	Amide
315	YFAVAIA	752,39	Amide
316	FPALVPI	754,44	Amide
317	TGQVEYA	765,33	Amide
318	TGVEQYA	765,33	Amide
319	TGVEYAQ	765,33	Amide
320	FPSEAFA	766,33	Amide
321	FPESAFA	766,33	Amide
322	FPCDAFA	768,30	Amide
323	FPDCAFA	768,30	Amide
324	FPCEAFA	782,31	Amide
325	FPECAFA	782,31	Amide
326	GEVASLTD	789,35	Amide
327	PQPQQPP	789,38	Amide
328	QMFLAGQ	792,36	Amide
329	FPALVHI	794,44	Amide
330	AQVQLPF	800,42	Amide
331	FPADHFA	802,35	Amide
332	AQVNLPY	802,40	Amide
333	PYVACAW	807,34	Amide
334	FPAEHFA	816,36	Amide
335	FPAHEFA	816,36	Amide
336	AQVELPY	817,40	Amide
337	FVAHEFA	818,37	Amide
338	GASPQFDC	822,30	Amide
339	VYAGEVAH	843,39	Amide
340	VLGHYAGM	845,39	Amide
341	LGHVASLY	857,44	Amide
342	AFALVGIGL	858,49	Amide
343	GVLGHINAC	881,42	Amide
344	WGVYAPLT	904,44	Amide
345	GEVAVLGHM	910,43	Amide
346	AFALVGIGLG	915,51	Amide
347	VAVLYAPLT	944,52	Amide
348	WGVYAPLF	950,46	Amide
349	GFTWGVAGY	955,42	Amide
350	PGAHWEAGA	1006,46	Amide
351	WNQPSGPGVA	1010,45	Amide
352	GNGQIVFHAA	1011,48	Amide
353	MLGAISVG YD	1023,46	Amide
354	DYLGW LDF	1026,44	Amide
355	AEYLVGFTH	1034,48	Amide
356	DFAAISVG YL	1053,50	Amide
357	MLGFISVG YD	1055,50	Amide
358	WGVYAPLFD	1065,49	Amide
359	CFAPMSVGFL	1069,46	Amide
360	CLVAISAGYW	1080,50	Amide
361	QFDLGHINF	1088,50	Amide
362	WFAPPSVG YL	1134,54	Amide
363	DFSWATVGFE	1156,48	Amide
364	FLSDTAAITVGFLAM	1554,74	Amide
365	PIGWGLVIAPWVAFGLA	1765,00	Amide
366	VGLGAVPIWGLVFPALGWAIFGV	2337,30	Amide

367	I G L A G W I V F A P I G L V W F A G L P V I A P	2575,50	Amide
368	Y E N G L I F M L A F A P L V H I W E A G A P F A	2775,30	Amide
369	V T E F K	621,32	Amide
370	S F L L R	633,37	Amide
371	A G V D G P K	641,32	Amide
372	V T E F R	649,33	Amide
373	A G V D G P R	669,33	Amide
374	A P D G A L K	669,35	Amide
375	L A V G I A R	697,40	Amide
376	A S F L L R	704,40	Amide
377	H A G L G E K	709,36	Amide
378	S W A M V K	719,35	Amide
379	S W A M V R	747,35	Amide
380	L A Q F V G K	760,42	Amide
381	C N Y A L G R	794,35	Amide
382	Y I C P A D K	807,36	Amide
383	F P A E F A K	807,39	Amide
384	F P A F A D R	821,39	Amide
385	Y I C P A D R	835,37	Amide
386	I W G L M A R	844,44	Amide
387	L M G V H C V R	912,48	Amide
388	L M Y V H G V R	972,53	Amide
389	A F I S V G P L A R	1028,56	Amide
390	L M Y V H W V K	1073,54	Amide
391	L M Y V H W V R	1101,54	Amide
392	C L V A H I G S W V A A W A Y G I P V I H V G R	2573,30	Amide

Figure S1. a) ESI MS/MS spectra upon CID of the $[M+H]^+$ precursor ion of peptide H-5 (GNGQIVFHAAR) and b) LID MALDI MS/MS spectra of peptide H-5 (GNGQIVFHAAR).

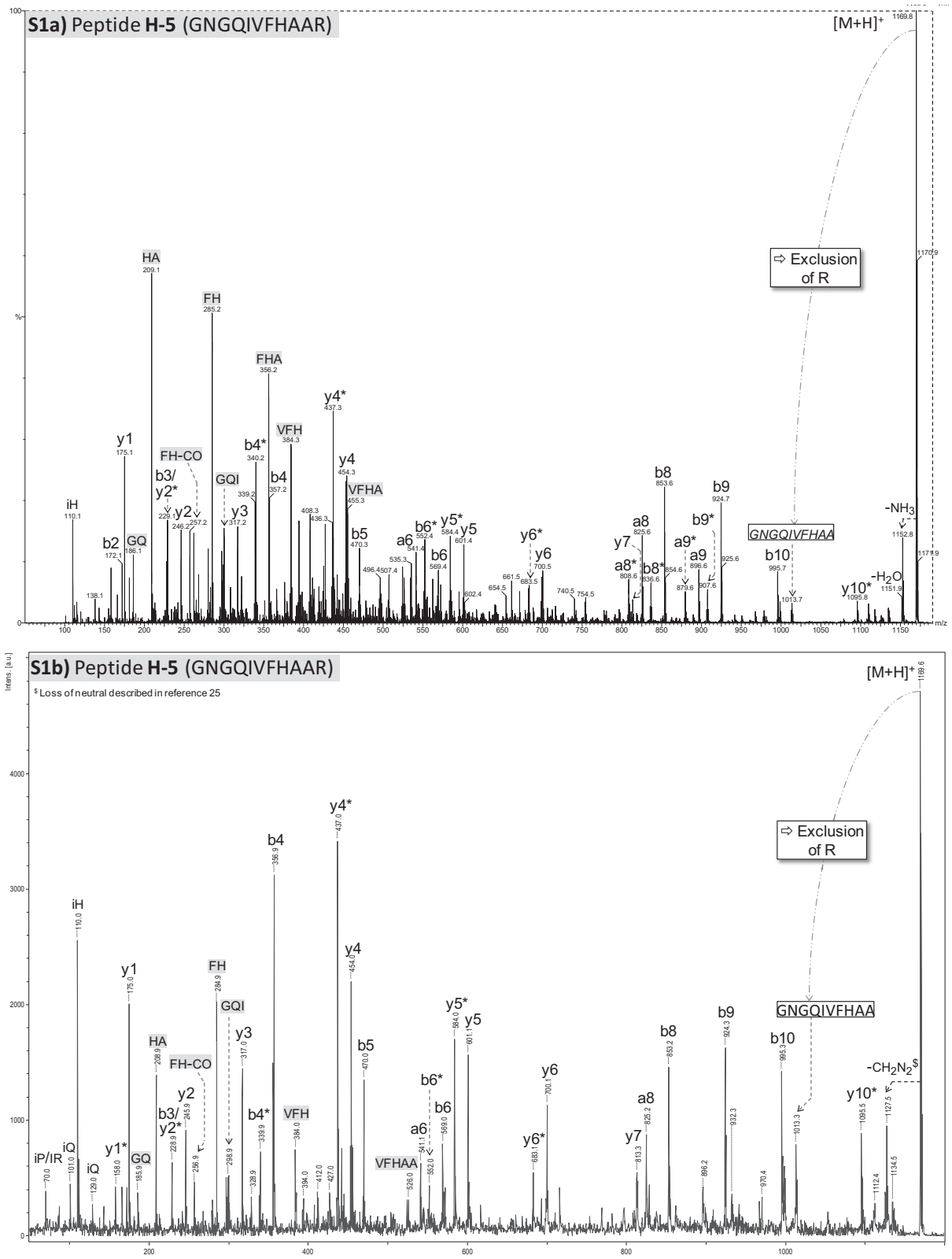


Figure S2. a) ESI MS/MS spectra upon CID of the $[M+H]^+$ precursor ion of peptide K-4 (KEDFPQLMV) and b) LID MALDI MS/MS spectra of peptide K-4 (KEDFPQLMV).

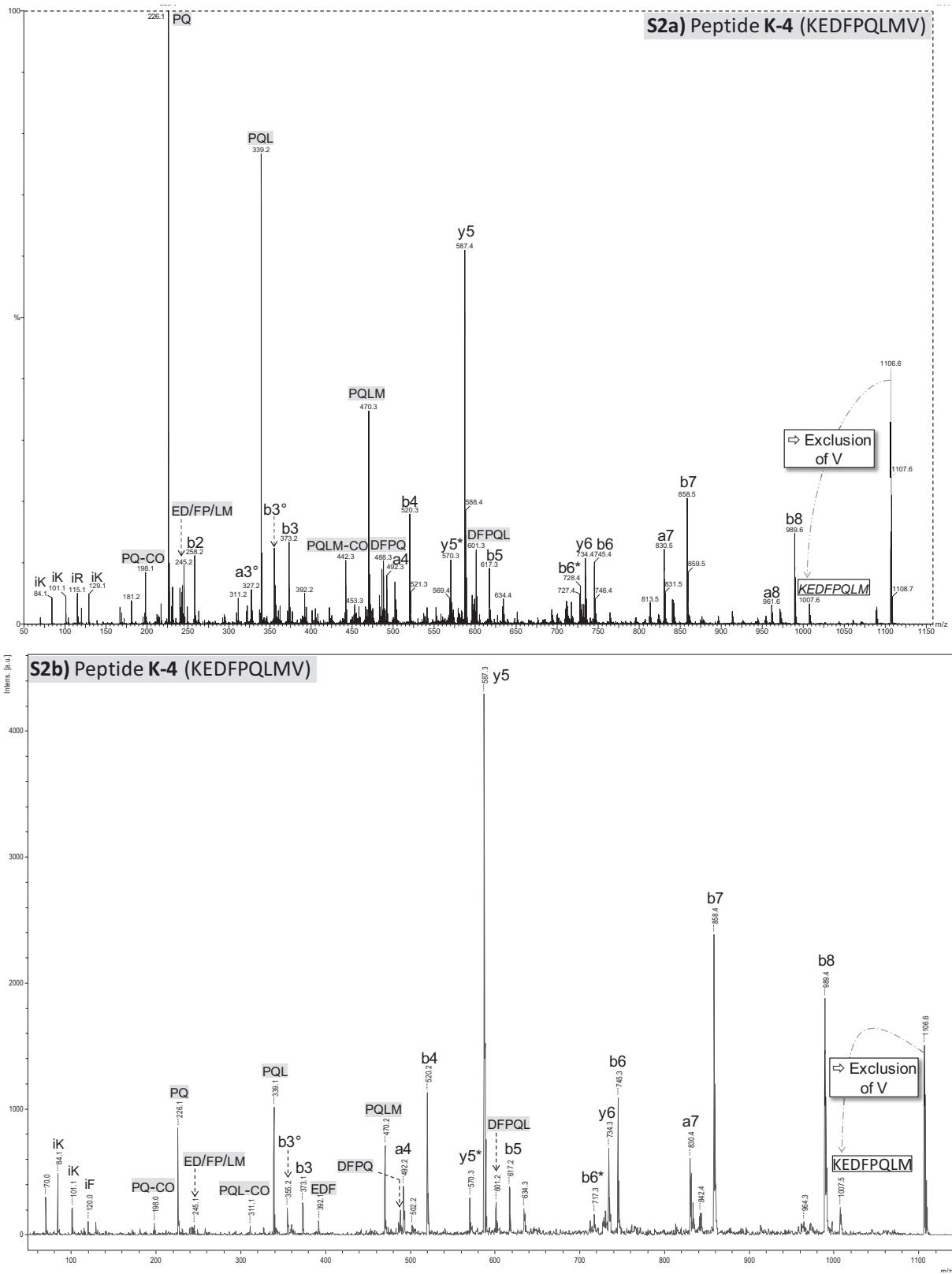


Figure S3. a) ESI MS/MS spectra upon CID of the $[M+H]^+$ precursor ion of peptide X-1 (PICKAK) and b) LID MALDI MS/MS spectra of peptide X-1 (PICKAK).

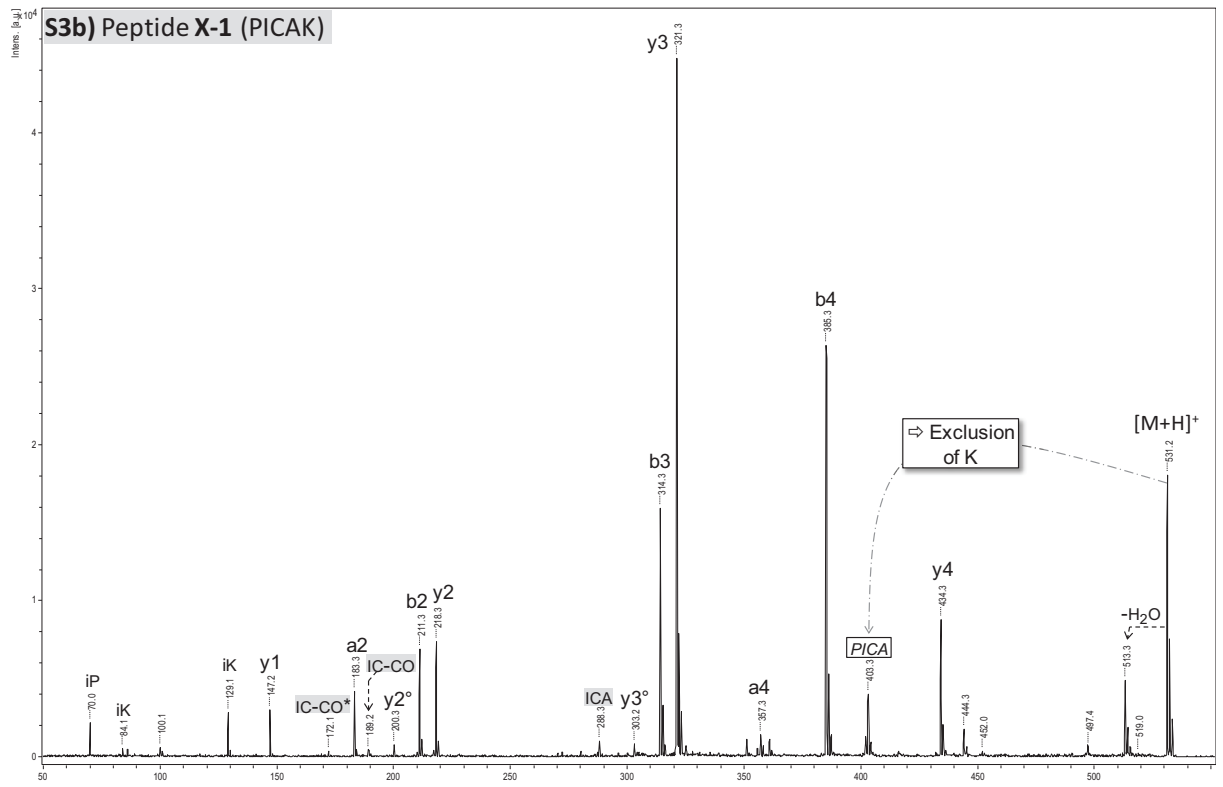
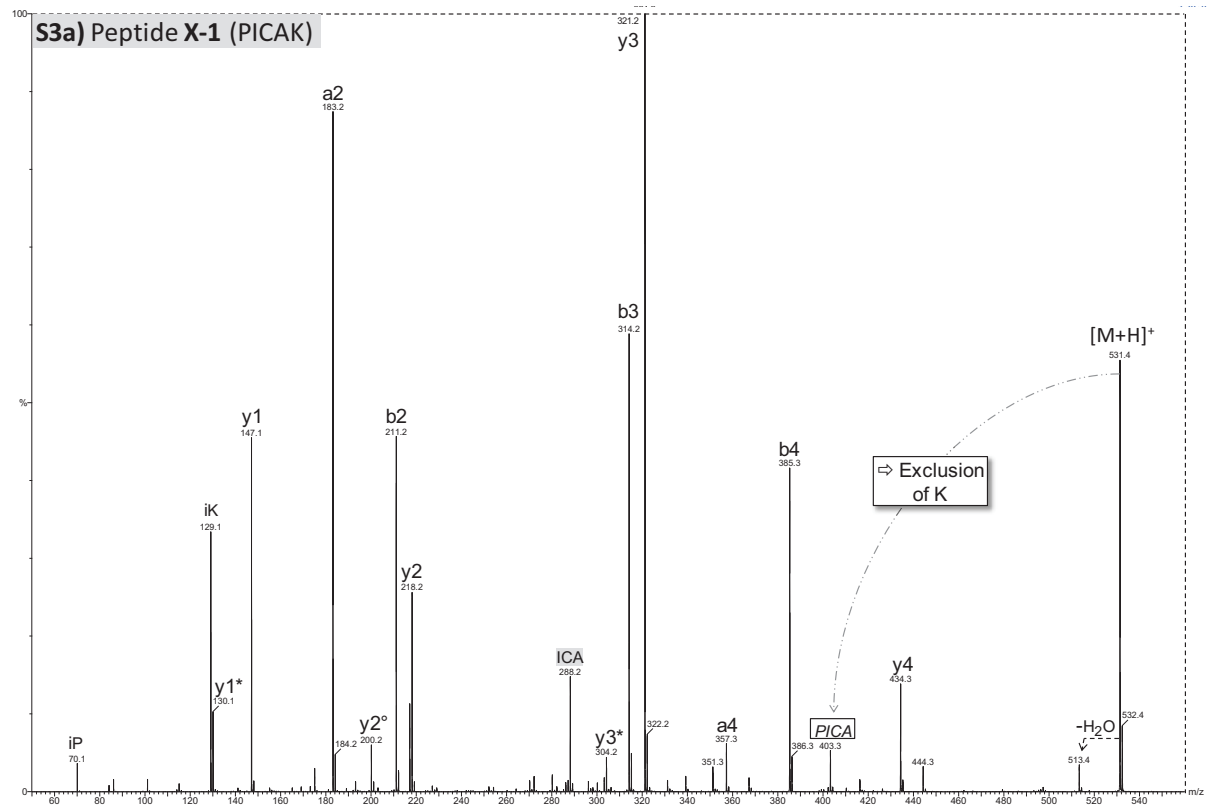


Figure S4. LID MALDI MS/MS spectra of the $[M+Na]^+$ precursor ion of peptide K-4 (KEDFPQLMV).

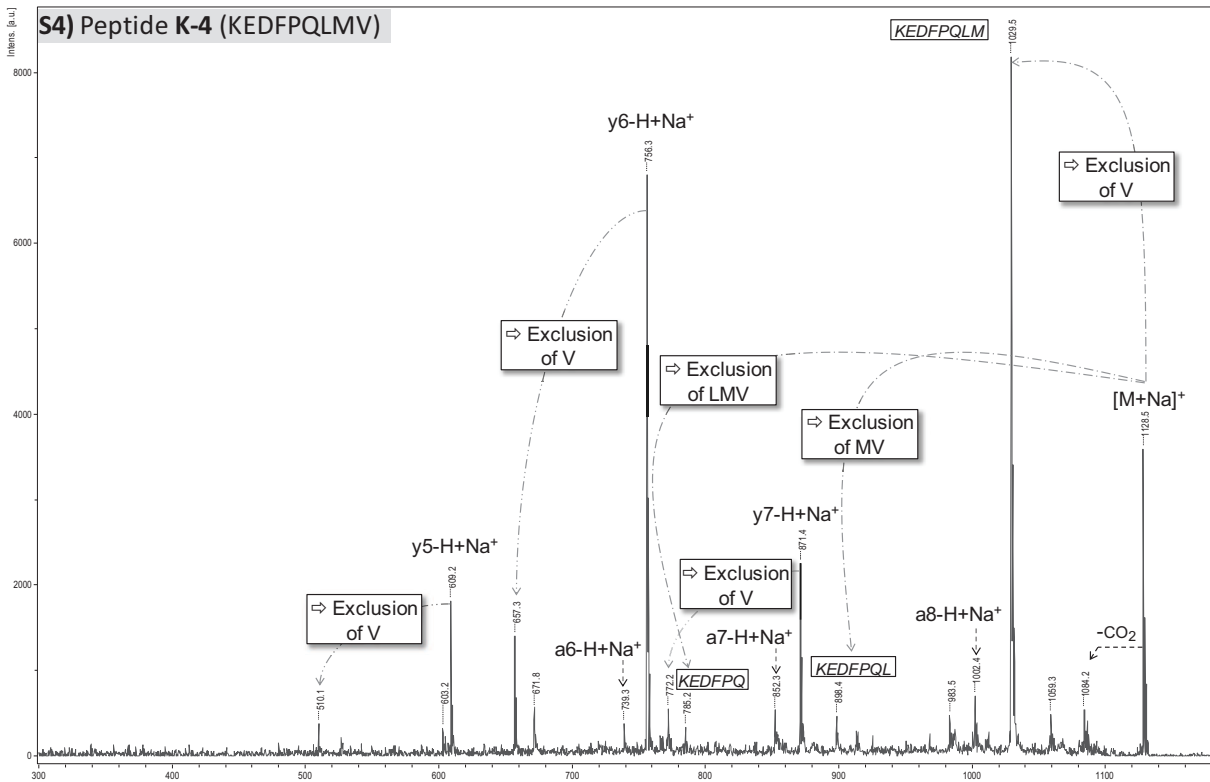
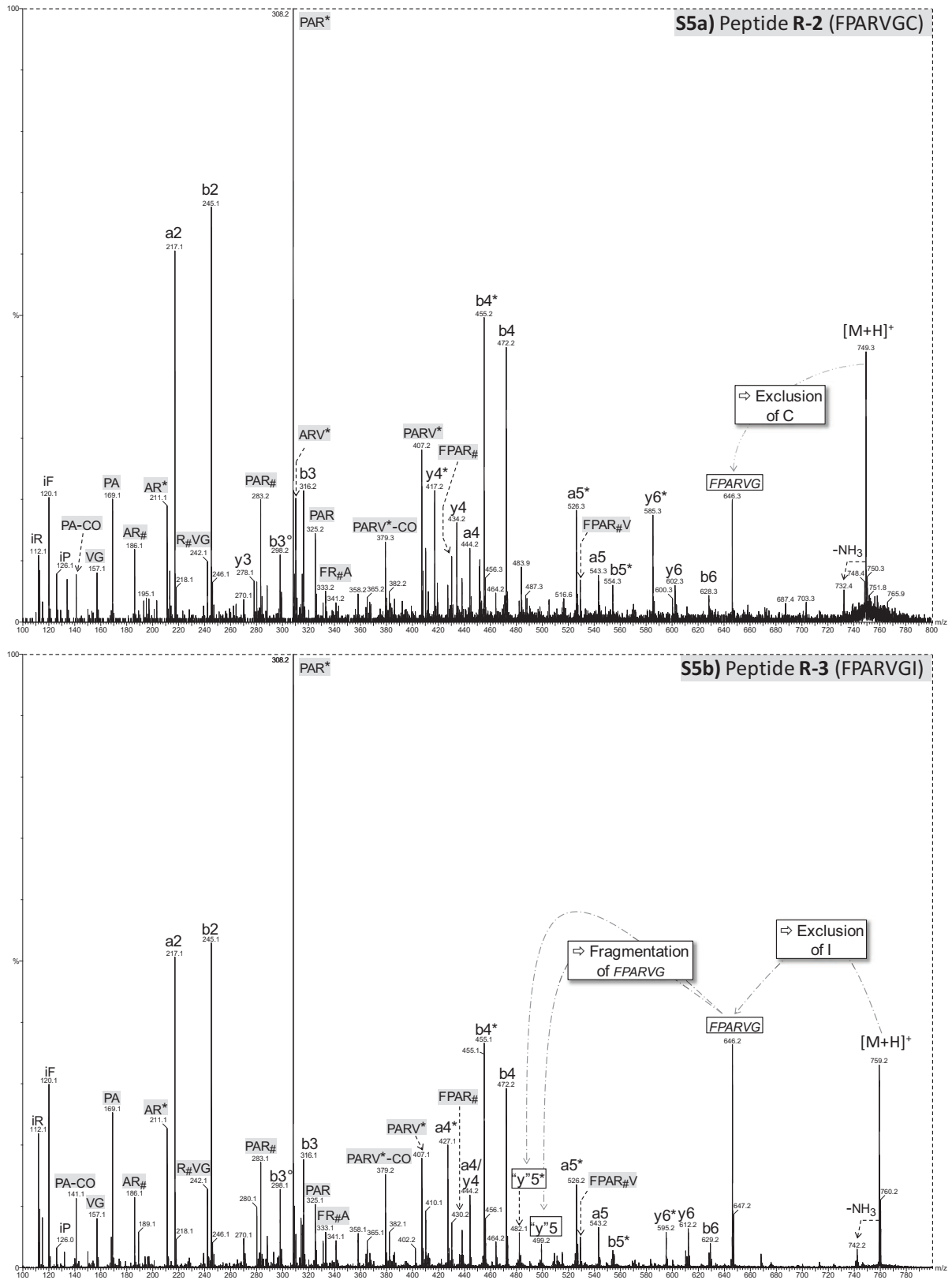
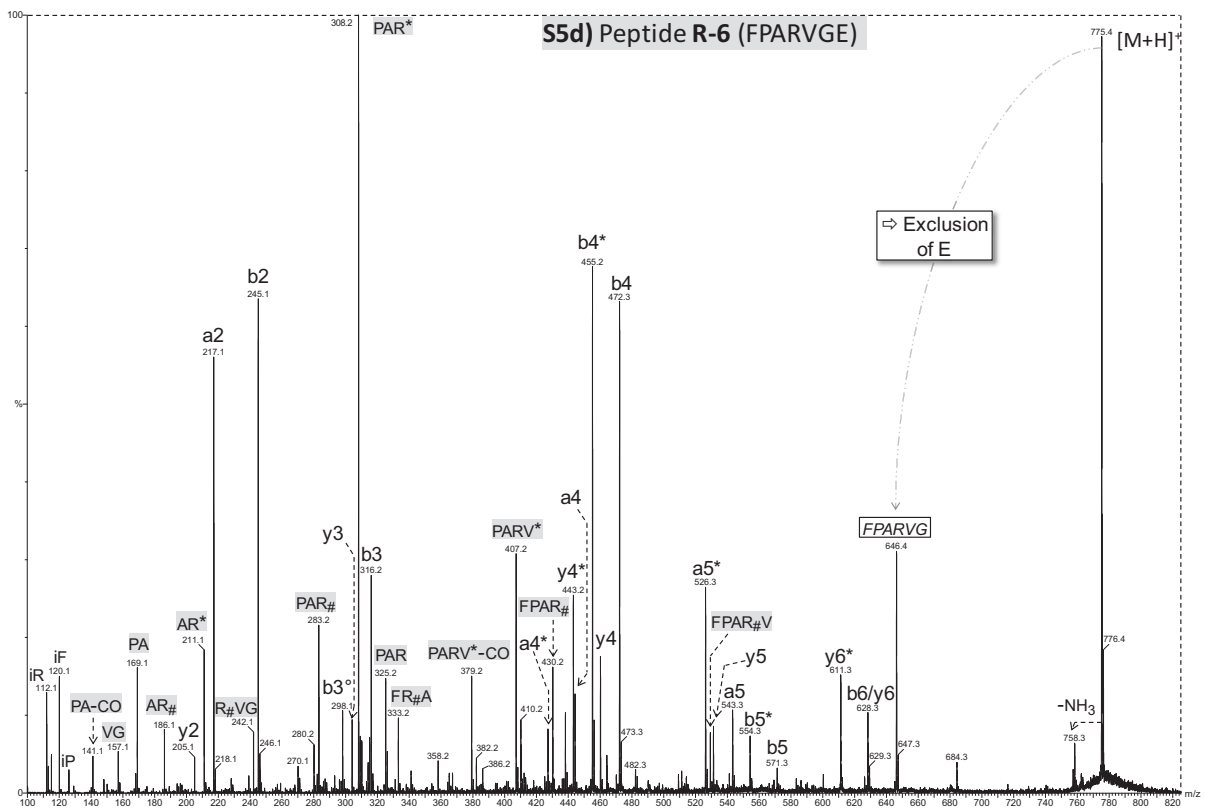
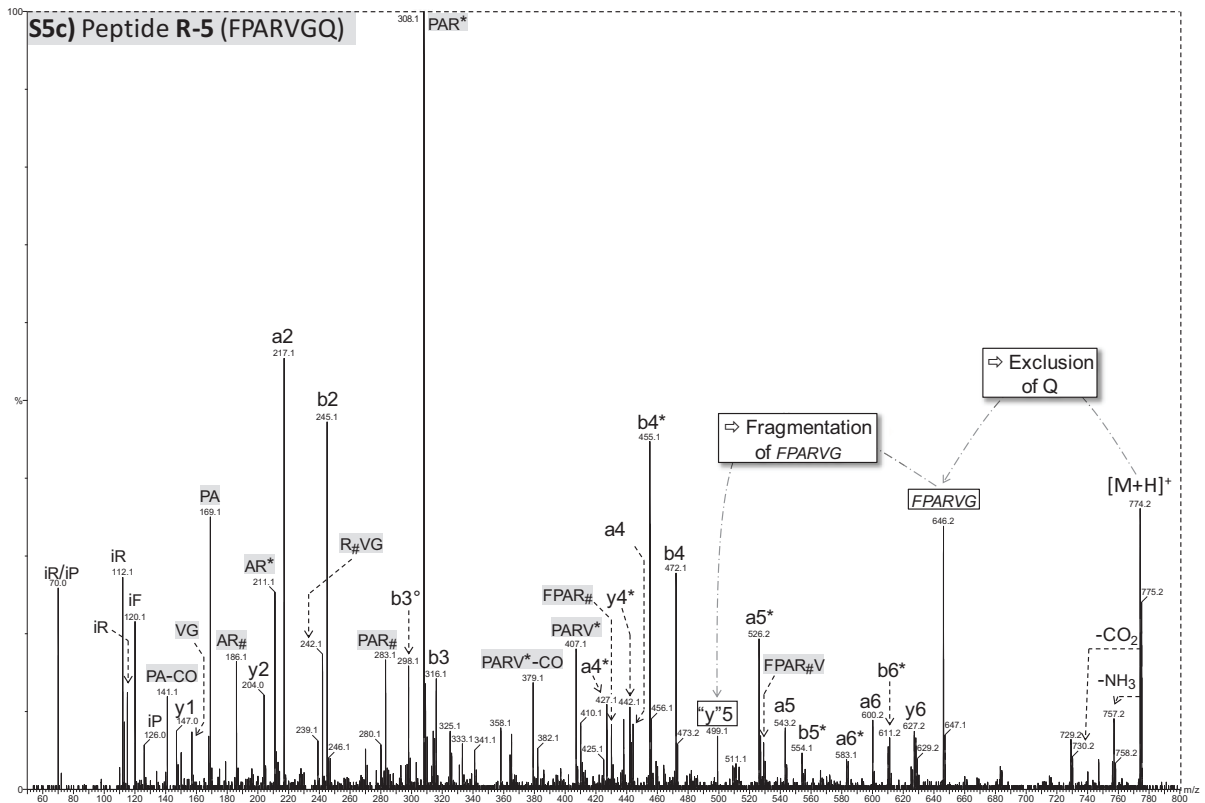


Figure S5. ESI MS/MS spectra upon CID of the $[M+H]^+$ precursor ion of a) peptide R-2 (FPARVGC), b) peptide R-3 (FPARVGI), c) peptide R-5 (FPARVGQ), d) peptide R-6 (FPARVGE), e) peptide R-7 (FPARVGH), f) peptide R-9 (FPARVGY).





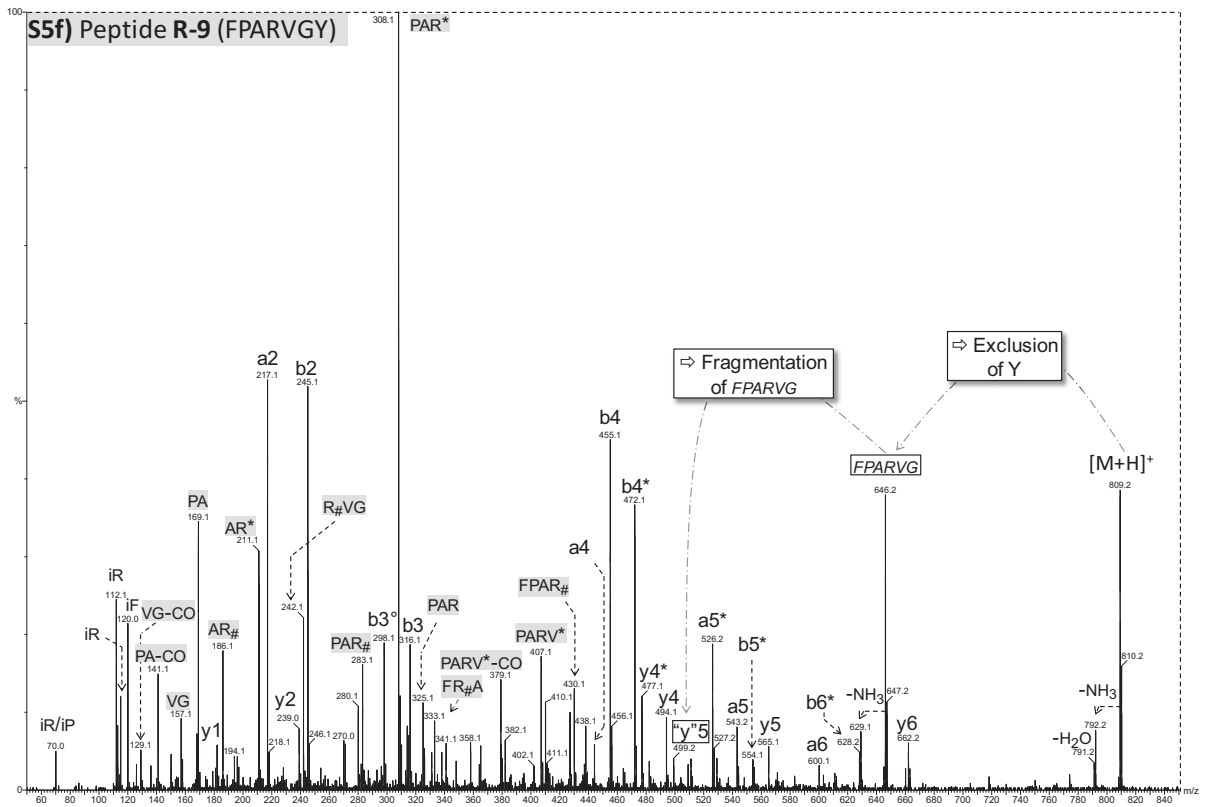
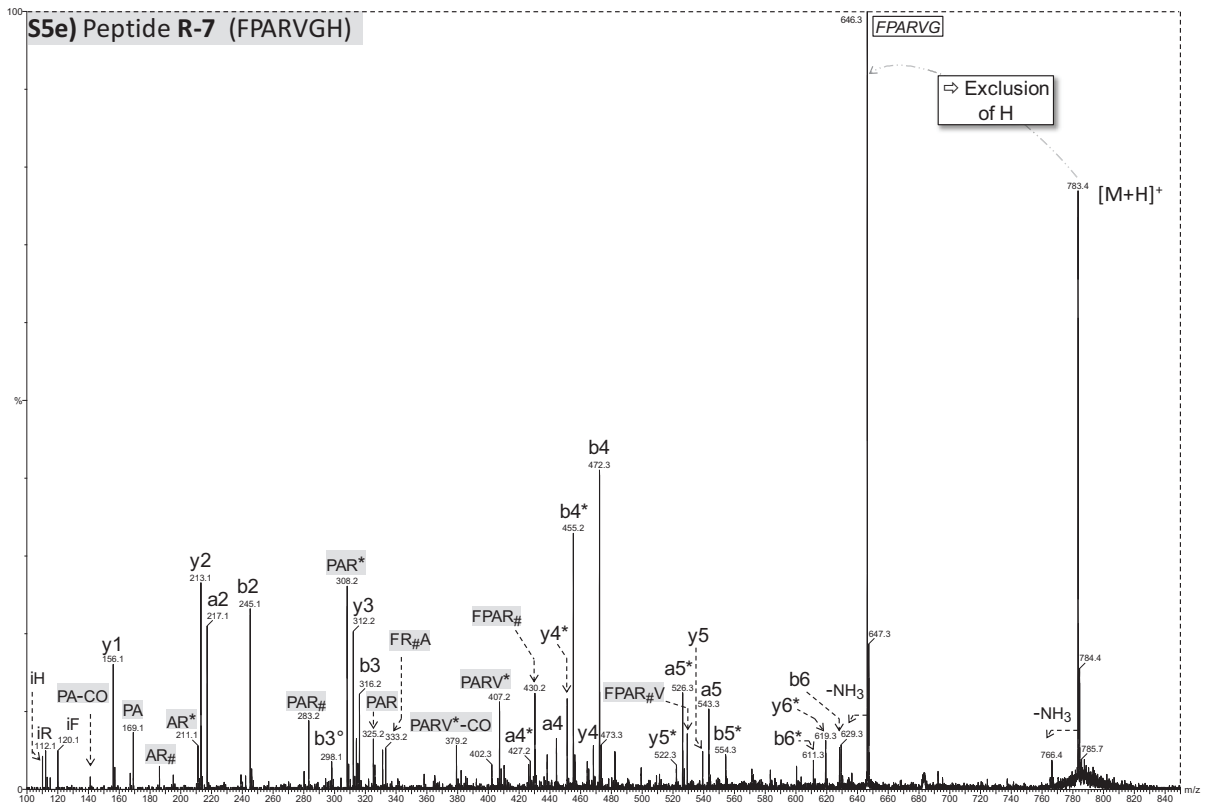
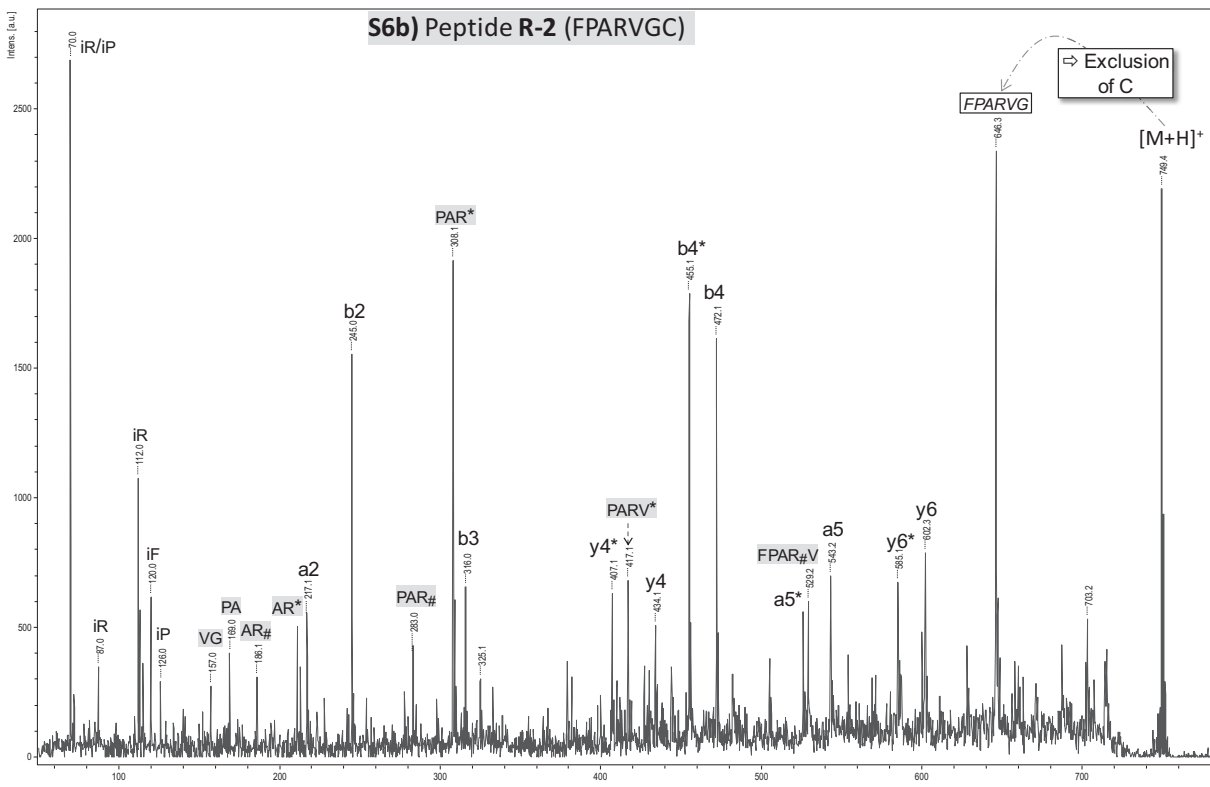
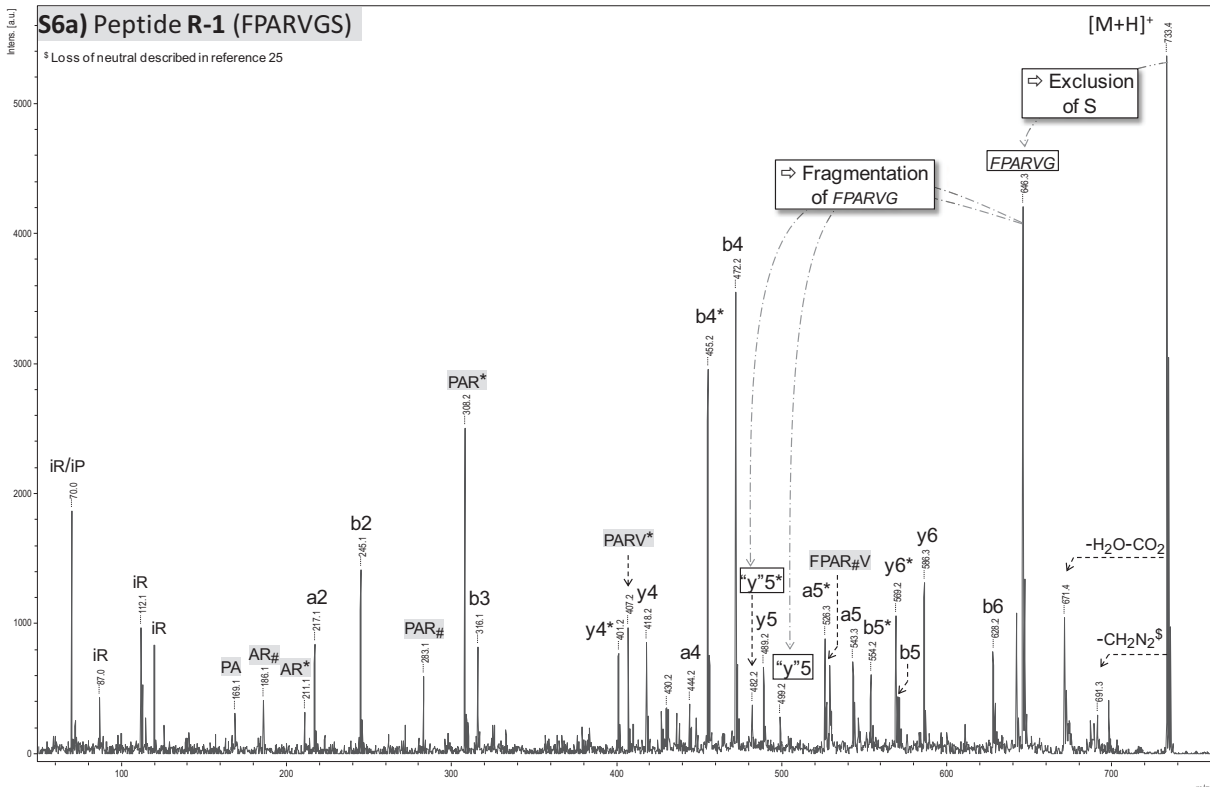
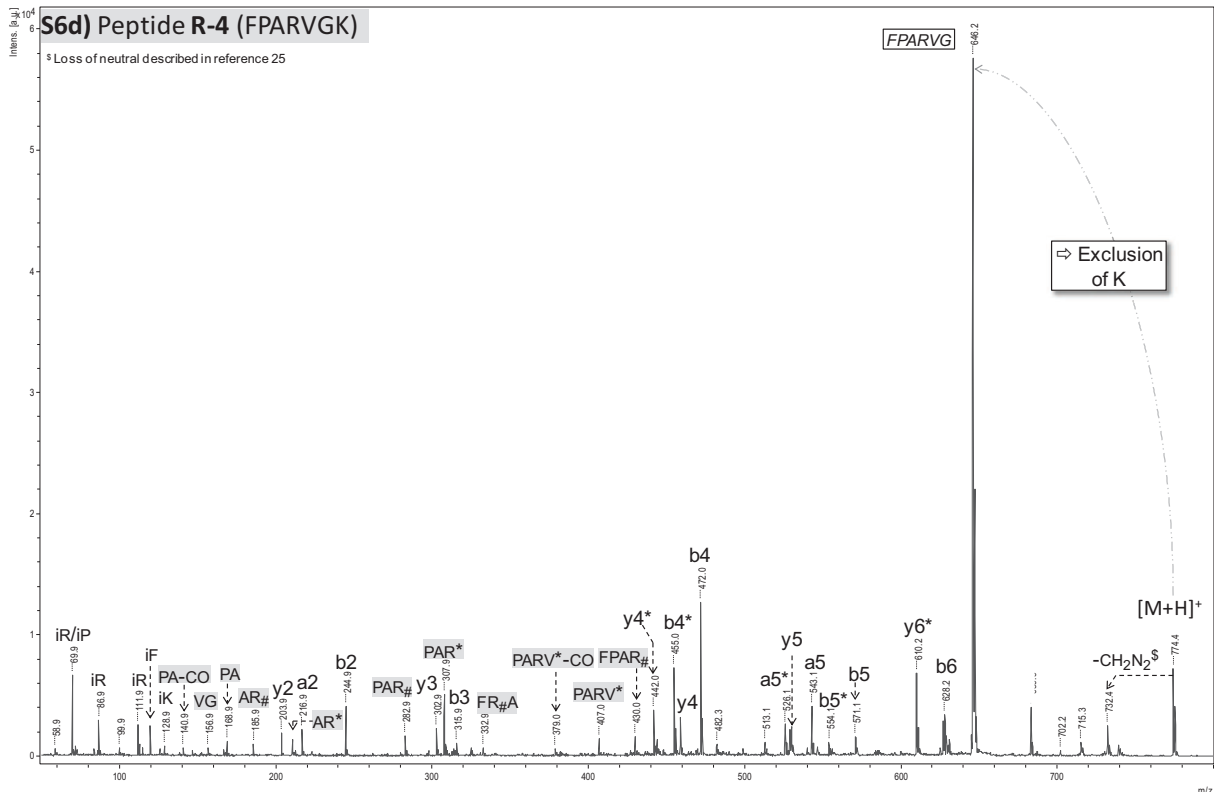
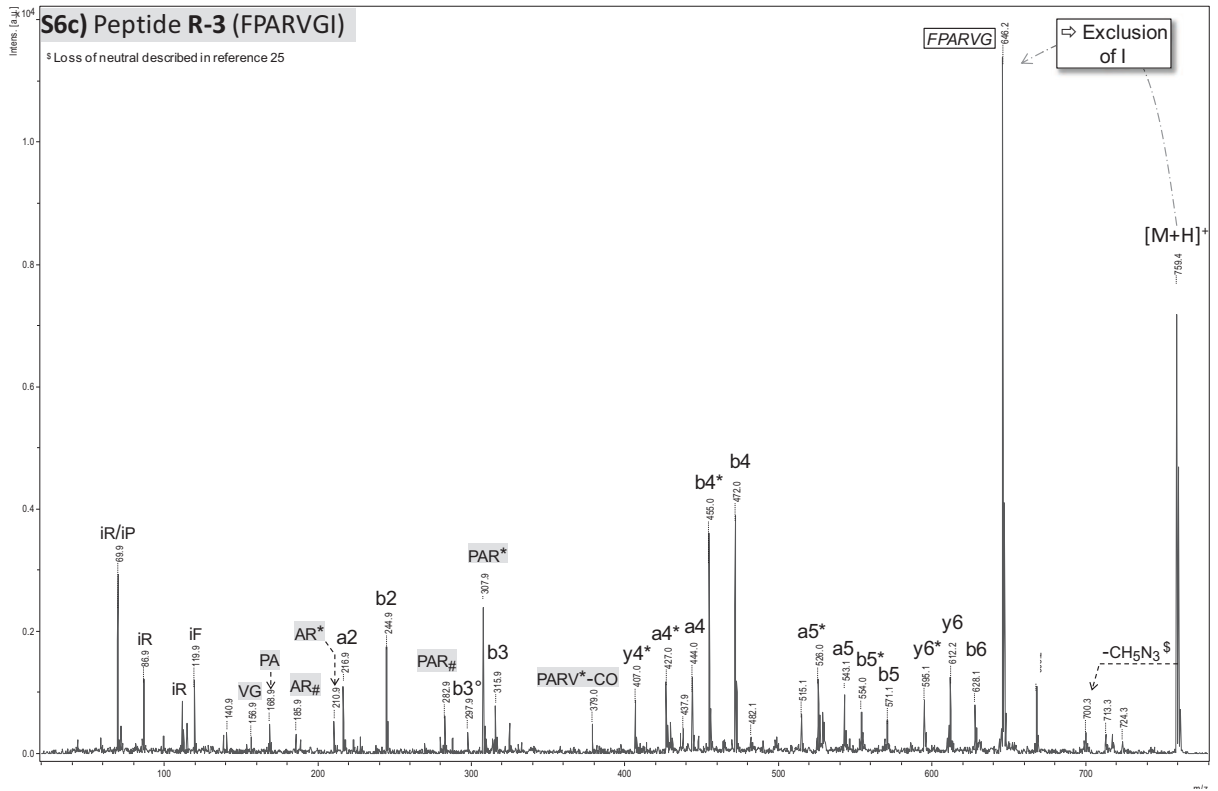
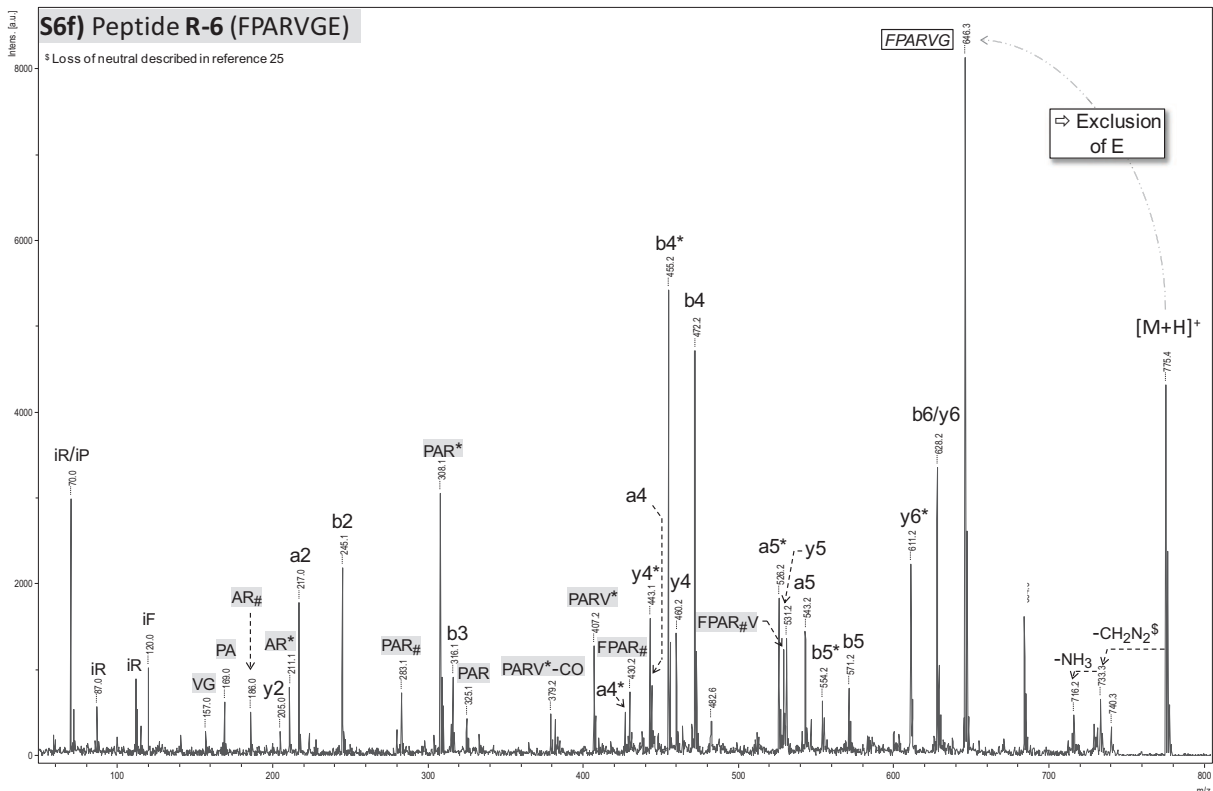
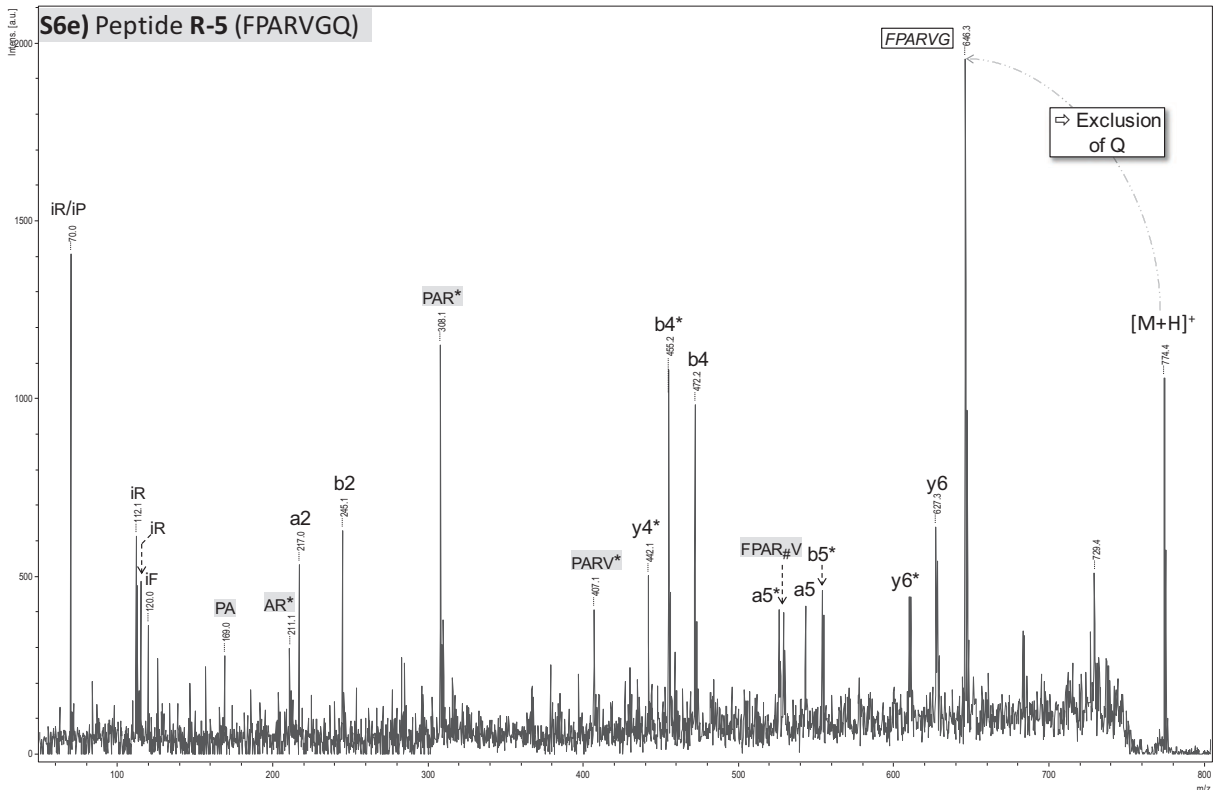
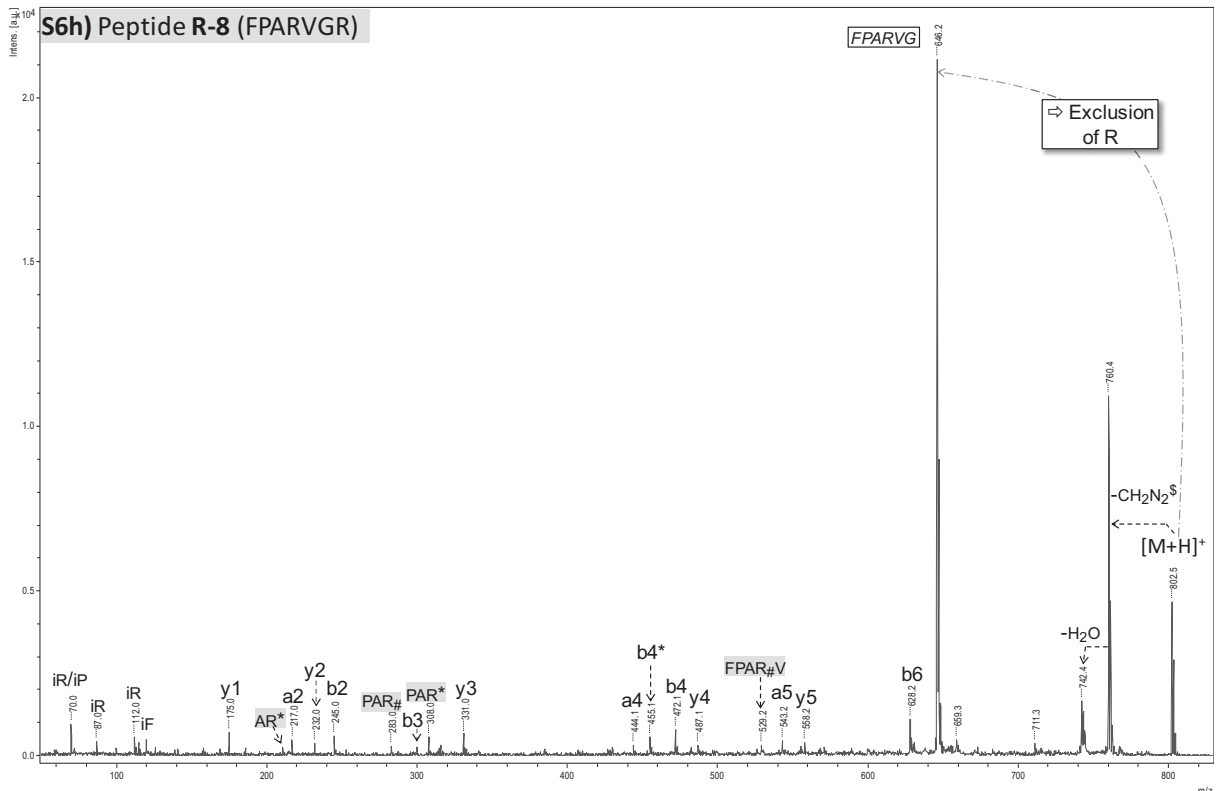
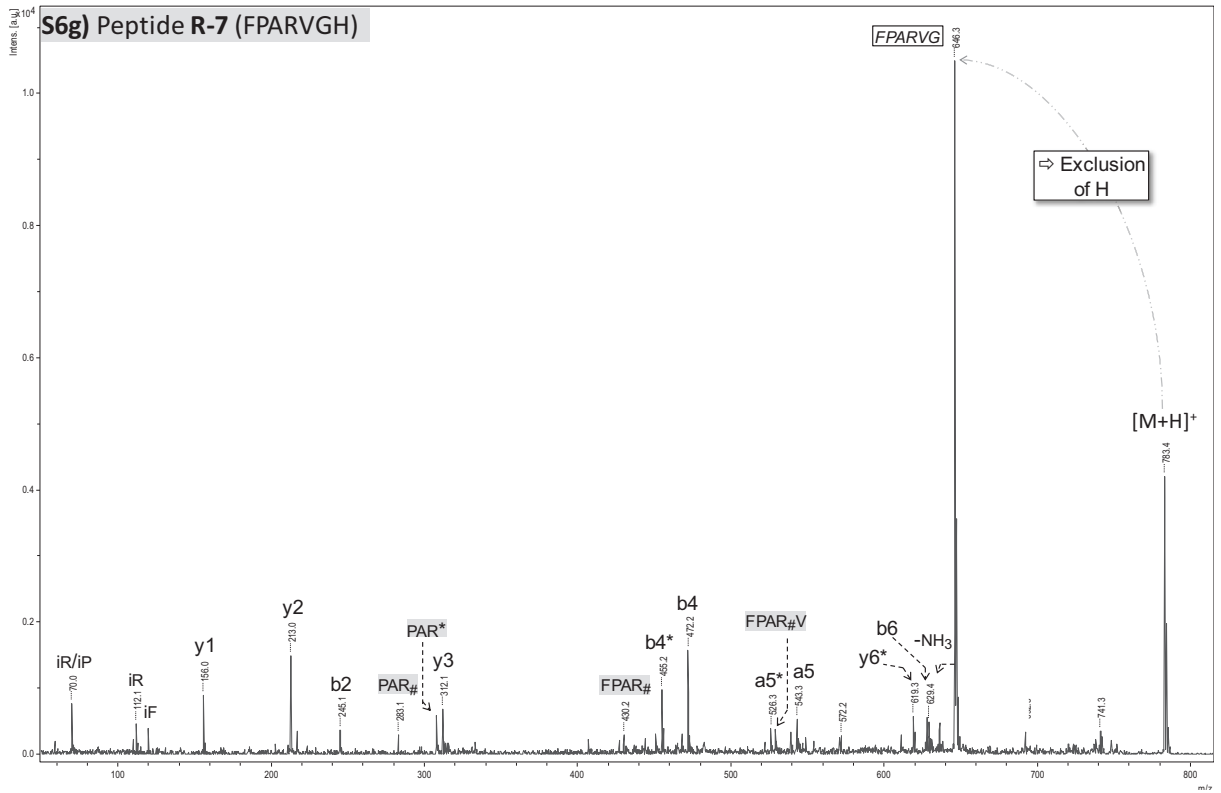


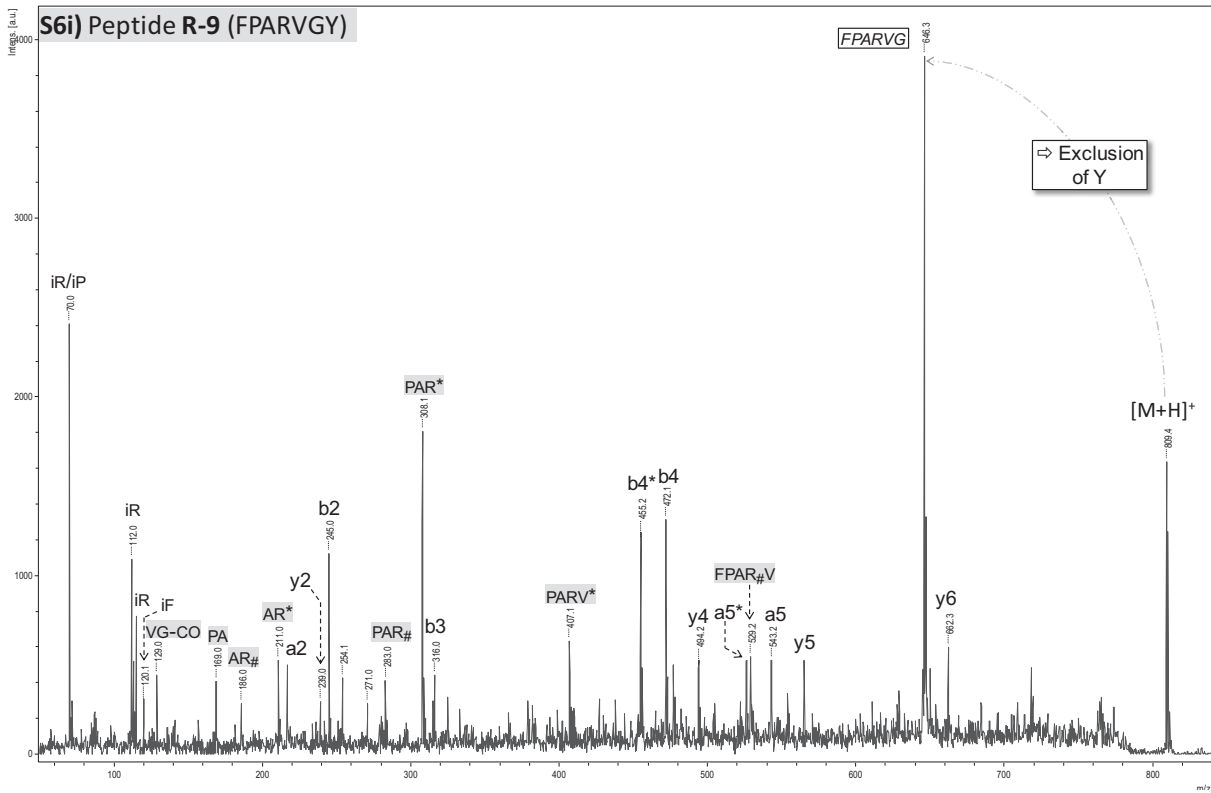
Figure S6. LID MALDI MS/MS spectra of a) peptide R-1 (FPARVGS), b) peptide R-2 (FPARVGC), c) peptide R-3 (FPARVGI), d) peptide R-4 (FPARVGK), e) peptide R-5 (FPARVGQ), f) peptide R-6 (FPARVGE), g) peptide R-7 (FPARVGH), h) peptide R-8 (FPARVGR), i) peptide R-9 (FPARVGY).











CHAPITRE II. ANALYSE PAR DESORPTION/IONISATION LASER SUR SUPPORTS INERTES DE TYPE POUDRE

II.1. Généralités

Nous avons choisi de ne présenter dans cette partie que les résultats obtenus à partir du support de type poudre constitué par les nanoparticules de silice non poreuses. Les évaluations des autres matrices inertes particulières ne seront donc pas discutées dans le manuscrit. Ce choix a été gouverné par les conclusions réalisées lors d'études LDI effectuées sur l'ensemble des supports de type poudre. Il a également été conditionné par le fait que les résultats obtenus à partir des autres substrats (notamment de titane) ne sont pas encore suffisants pour être publiés.

Toutefois, pour comprendre le déroulement des recherches et les raisons qui nous ont amené à discuter préférentiellement les nanoparticules de silice non poreuses, il est rappelé de manière générale les résultats obtenus à partir des autres supports. Pour ce faire, il est important de préciser que l'efficacité des matrices inertes a été jugée sur différents critères concernant :

- d'une part la mise en œuvre de la technique, principalement évaluée sur l'homogénéité et stabilité du dépôt sur la cible MALDI en acier,
- d'autre part sur les résultats obtenus en spectrométrie de masse à travers la pollution du spectre de masse dans les basses masses, le signal sur bruit des ions, la puissance laser requise, et la proportion des ions sous la forme protonée.

La **Figure C-12** récapitule ces critères et présente de façon simplifiée les résultats obtenus sur les différents supports de type poudre.

	Gel de silice	Silice mésoporeuse	NPs de silice non poreuses	NPs de Titane	NTs de Titanates
Protocole expérimental					
<u>Substrat</u>	Commercial	Synthétique	Synthétique	Commercial	Synthétique
Accès / coût	✓	~	✓	✓	✗
<u>Manipulation</u>	✗	✓	✓	✓	~
Mise en suspension / Réalisation du dépôt	✗	~	✓	✓	~
Homogénéité du dépôt de la matrice	~	~	~	~	~
Détection de peptides purs					
Effet d'un adjuvant d'ionisation	~	~	✓	~	~
Signal sur bruit	~	~	✓	~	~
% espèces protonées	✗	✗	✓	✗	✗
Peu d'interférences dans les faibles m/z	~	✓	✓	✓	✓
Répétabilité (3 analyses/peptides)	✓	✓	✓	✓	✓
Performances globales	✗	~	✓	✓	~

Légende

✓ Satisfaisant

~ Acceptable

✗ Insuffisant

Figure C-12. Comparaison des approches de type poudre.

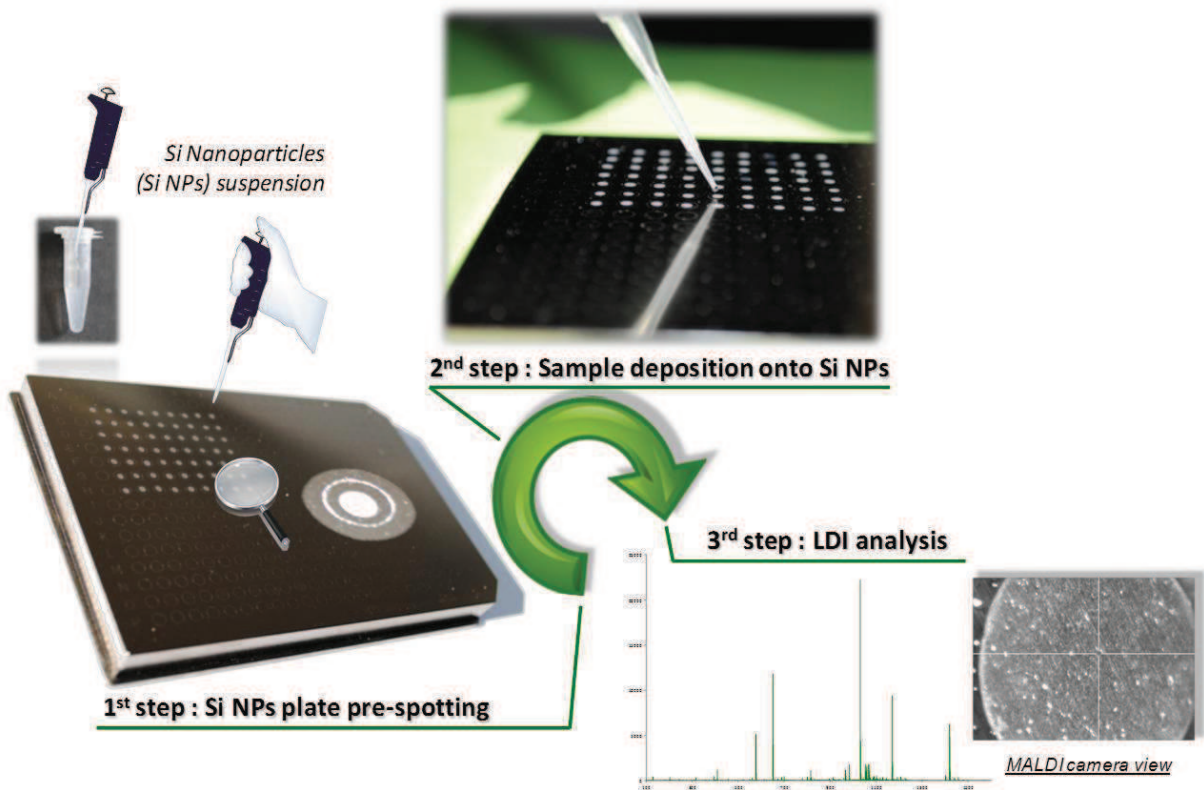
Dans un premier temps, le potentiel des matrices siliciques particulières a été évalué. Les performances LDI des trois silices non modifiées (gel de silice, nanoparticules de silice et silice mésoporeuse) ont été comparées pour l'analyse d'une sélection de peptide. Il a été observé de meilleurs résultats pour l'analyse de peptides avec les nanoparticules de silice non poreuses. Dans un second temps, les matrices de silice modifiées ont également été employées pour observer si des effets bénéfiques étaient amenés par la présence de matrices organiques utilisées traditionnellement en MALDI. Malheureusement, sur les échantillons testés, aucune des matrices inertes modifiées avec les molécules organiques (HCCA ou DHB) n'ont révélé un potentiel supérieur à leurs analogues non modifiés.

Les deux substrats de titane ont également fait l'objet d'études importantes et ont été comparés entre eux, mais aussi avec les nanoparticules de silice. En règle générale, les nanoparticules de titane ont présenté des performances pour l'analyse de peptides supérieures aux nanotubes de titanate. Cependant, les résultats obtenus avec des substrats de titane se sont révélés moins attractifs que ceux acquis avec les particules de silice non poreuses. Une problématique importante observée avec ces substrats de titane a été une forte propension à la formation d'espèces cationisées, ce qui peut induire une limitation dans le cadre de la mise en œuvre de la spectrométrie de masse en tandem. Toutefois, il faut mentionner que dans le cadre de cette thèse, l'évaluation de la détection d'échantillons autre que les peptides a également été appréciée (résultats non mentionnés). Dans ce contexte, les substrats de titane, et plus particulièrement les nanoparticules de titane ont abouti à des résultats intéressants pour la détection de petits polymères synthétiques. Ils feront potentiellement l'objet d'études complémentaires menant à publier ces résultats.

Par conséquent, parmi les supports testés, les nanoparticules de silice ont été sélectionnées comme le meilleur candidat pour poursuivre les investigations approfondies sur la mise en œuvre, l'optimisation et la validation de la méthode. Les résultats obtenus pour l'analyse de peptides synthétiques et de peptides issus de digestats tryptiques sont présentés et discutés dans l'[Article 3: Silica nanoparticles pre-spotted onto target plate for LDI mass spectrometry analyses of peptides](#) publié dans le journal *Analytica Chimica Acta*.

II.2. Analyses de peptides et de digestats tryptiques sur un support de type poudre

II.2.1. Article 3: Silica nanoparticles pre-spotted onto target plate for LDI mass spectrometry analyses of peptides





Silica nanoparticles pre-spotted onto target plate for laser desorption/ionization mass spectrometry analyses of peptides

Mathieu Dupré^a, Sonia Cantel^a, Jean-Olivier Durand^b, Jean Martinez^a, Christine Enjalbal^{a,*}

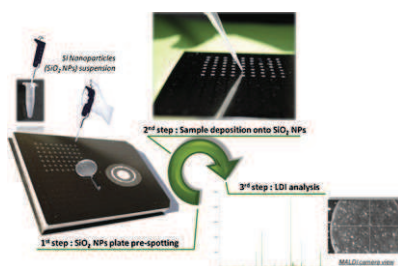
^a Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247, Universités Montpellier 1 et 2, CNRS, Université Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, Bâtiment Chimie (17), 34095 Montpellier Cedex 5, France

^b Institut Charles Gerhardt, UMR 5253, CNRS, Université Montpellier 2, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France

HIGHLIGHTS

- ▶ We present a new pre-spotted MALDI target for peptide detection and sequencing.
- ▶ The inert substrate consists of silica nanoparticles easily prepared by sol-gel chemistry.
- ▶ This very efficient LDI-promoting support produces ions from few femtomoles of mixtures of peptides.
- ▶ Rapid MS profiling and subsequent MS/MS analyses are achieved.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 April 2012

Received in revised form 20 June 2012

Accepted 24 June 2012

Available online 11 July 2012

Keywords:

Peptide

LDI-MS

SALDI-MS

Matrix-free

Silica nanoparticles

Pre-spotted target

ABSTRACT

We report on the simple deposition of Stöber silica nanoparticles (SiO₂ NPs) on conventional MALDI target plate for high throughput laser desorption/ionization mass spectrometry (LDI-MS) analyses of peptide mixtures with sensitivity in the femtomolar range. This low-cost easily prepared material allowed straightforward LDI experiments by deposition of the studied samples directly onto a pre-spotted MALDI plate. This analytical strategy can be performed in any laboratory equipped with a MALDI-TOF instrument. All key benefits of organic matrix-free technologies were satisfied while maintaining a high level of detection performances (sensitivity and reproducibility/repeatability). In particular, sample preparation was simple and detection in the low mass range was not hampered by matrix ions. Imaging studies were undertaken to query sample dispersion into the inert SiO₂ NPs and to help into the search of the best experimental conditions producing homogeneous analyte distribution within the deposit. In contrast to commercial disposable LDI targets designed for single use and requiring an adaptor such as NALDI™, the proposed SiO₂ NPs pre-spotting on a MALDI target plate allowed very easily switching between MALDI and LDI experiments. They can be conducted either simultaneously (positions with an organic matrix or SiO₂ NPs) or in the row (support prepared in advance, stored and washed after use). The overall cost and versatility of the methodology made it very attractive to MALDI users in many domains (peptidomics, proteomics, metabolomics).

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

LDI mass spectrometry using specific inert materials to promote ion formation has been widely investigated within the last

decade. Following the pioneering work of Tanaka [1], these inorganic substrates were initially investigated as mixtures with an organic compound, usually a matrix used in Desorption/Ionization techniques (FAB or MALDI mass spectrometry) [2,3]. To avoid the production of matrix ions detected in the low mass range of the mass spectra, the single use of inert substrates was then preferred [4–6]. Among different available materials conditioned as powders or surfaces, silica- and silicon-based substrates were thus employed

* Corresponding author. Tel.: +33 467 14 38 19; fax: +33 467 14 48 66.
E-mail address: enjalbal@univ-montp2.fr (C. Enjalbal).

as potent LDI-promoting agents, due to their accessibility, their well-controlled synthesis processes and also their interesting optical properties. This way was first developed by Siudzak in 1999 with the DIOS method (Desorption/Ionization On porous Silicon) [7,8], followed by other porous silicon-substrates and silica derivatives [9–14]. In order to get insight into desorption/ionization mechanisms occurring from these silica/silicon-based surfaces, the physical properties of the studied materials were also investigated [15,16]. To date, the influence of the pore size on ion formation is still under debate [17–19]. More recently, the extensive development of nanoscale objects increased the potential of silica/silicon-based nanomaterials as LDI substrates. Nanoparticles [20,21], thin films [22–24] as well as more ordered three-dimensional architectures [25–28] including nanowires [29–33] provided extremely interesting LDI performances, especially for the sensitive analysis of peptides [28,33]. It should be noticed that disposable ready-to-use target plates designed to perform LDI experiments from silica/silicon-based substrates can be purchased: in addition to the original DIOS target (MassPREP™) [34,35], NALDI™ (three-dimensional silicon architecture) became recently commercially available and was found to be particularly valuable for the analysis of peptides and small organic compounds [34,36].

Following these trends, we have successfully investigated silica, either as a powder (amorphous chromatographic material) [14] or as a nanostructured surface [28], to promote efficient peptide detection in LDI-MS experiments. Taking into account the pro and cons of each strategy, we turned to silica nanoparticles (SiO₂ NPs) to achieve low-cost high throughput LDI analyses of small biomolecules. First, Stöber nanoparticles were more easily prepared according to sol–gel well mastered processes than surfaces, allowing direct access to low cost materials. Second, no specific device is required to perform the LDI-MS analyses since small volumes of nanoparticles suspended in aqueous solvent could be very easily pipetted and spotted onto any conventional MALDI target plate. The LDI-MS workflow (sample deposit onto silica spots, air-drying, MALDI plate introduction into the ion source and data acquisition) was thus very convenient. Finally, the ready-to-use pre-spotted MALDI target plates could be prepared in advance saving time and consumables along the experimental process.

To explore such straightforward LDI-MS methodology, silica nanoparticles presenting a narrow size distribution around 200 nm were pre-spotted on a standard MALDI target plate. An array of model peptides mimicking those found in typical protein digests was analyzed. Through this set of LDI experiments, we were able to optimize the detection conditions according to sample and source tuning. The presence of an organic additive that is sometimes reported for LDI-MS analyses [37,38] and the mode of laser irradiation (laser fluence and focus) were also optimized for sensitive detection. Additionally, imaging experiments were performed to probe the sample distribution within the inert SiO₂ NPs spot. Finally, the performances of the investigated silica nanoparticles (limit of detection, resolution, S/N ratios) were evaluated to assess peptide detection sensitivity. Particular attention was devoted to method reproducibility and robustness.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and reagents

All solvents were of analytical grade. Methanol was purchased from Fisher and acetonitrile from Carlo Erba. The deionized water used in all experiments was obtained using a Milli-Q system (Millipore, Milford, USA). A peptide calibration standard kit was purchased from Bruker Daltonics. Methanol, ammonium

hydroxide, citric acid, diammonium hydrogen citrate, diammonium sulfate, trifluoroacetic acid, ammonium trifluoroacetate, perfluorooctane sulfonic acid, potassium perfluorooctane sulfonate, tetraethylammonium salt of perfluorooctane sulfonate were obtained from Merck (VWR, France).

2.2. Preparation of silica nanoparticles (SiO₂ NPs)

The silica nanoparticles were prepared according to published procedure [39]. To a solution of ammonium hydroxide (30 wt% of ammonia, 6 mL) in methanol (99.9%, 24 mL), tetraethoxysilane (TEOS, 99.9%, 0.2 mL) was added dropwise under vigorous magnetic stirring to initiate the hydrolysis reaction. The resulting solution was stirred at room temperature for approximately 2 h before it was transferred to the ultrafiltration cell. After centrifugation, the synthesized nanoparticles were rinsed extensively with distilled water and ethanol under sonication to ensure removal of all unreacted reactants. This step was repeated three times. The SiO₂ NPs were then dried at room temperature during two days.

2.3. Material characterization

Transmission electron microscopy (TEM) measurements were carried out with a JEOL 1200 EXII microscope at 100 kV. Dynamic Light Scattering (DLS) experiments were run using a Cordouan Vasco 135 apparatus, with a 75 mW laser source operating at 658 nm.

2.4. Synthetic model peptides

Peptides were synthesized on the IBMM peptide synthesis platform using the conventional methodology of solid-phase peptide synthesis using Fmoc chemistry [40] and purified by preparative LC/MS (Autopurification system, Waters Milford, CA). All peptides were prepared as C-terminal carboxylic acids and their sequences were designed to mimic proteolytic digests performed with either trypsin or Lys-N [41]. More details are found in the supplementary material. Prior to use, peptides were dissolved in deionized water at a 10⁻³ M concentration. These stock solutions were then diluted in deionized water or in deionized water containing an organic additive [1 mM of citric acid, 1 mM of diammonium hydrogen citrate (referred thereafter as ammonium citrate), 1 mM of diammonium sulfate, 1% (v/v) of trifluoroacetic acid, 1 mM of ammonium trifluoroacetate, 0.5 mM of perfluorooctane sulfonic acid, 0.5 mM of potassium perfluorooctane sulfonate (denoted in the paper PFOS), 0.5 mM of tetraethylammonium salt of perfluorooctane sulfonate] in order to have 10⁻⁴ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁶ M and 10⁻⁷ M final peptide concentrations.

2.5. Mass spectrometry

Mass spectrometry analyses were performed on instruments located in the IBMM platform of instrumentation, Laboratoire de Mesures Physiques of University Montpellier 2, and in CRLC Val d'Aurelle, Montpellier. MALDI mass spectra were recorded on an Ultraflex III TOF/TOF instrument (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) equipped with LIFT capability. A pulsed Nd:YAG laser at a wavelength of 355 nm was operated at a 100 Hz (MS data) or 200 Hz (MS/MS data) frequency. According to the experiment, the laser focus was adjusted amongst the three values: 29%, 53% and 98% referred as medium, small and minimum focus, respectively. The source was operated in the positive mode with a delayed extraction time of 30 ns. Data were acquired with the Flex Control software and processed with the Flex Analysis software. Mass lists were generated according to the following parameters: centroid as peak detection algorithm, S/N threshold 5, peak width 0.5, and peak

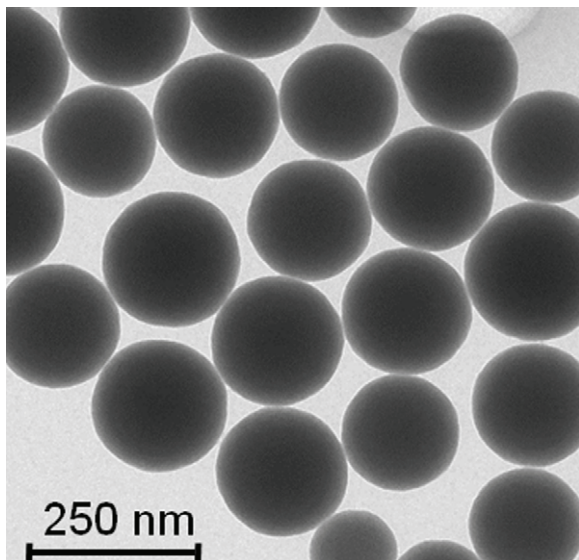


Fig. 1. TEM image of a SiO₂ NPs aqueous suspension.

height 80%. External calibration was performed with commercial peptide mixture (Calibration peptide standard 2, Bruker Daltonics, Wissembourg, France). MALDI imaging was performed using the 4800 Plus MALDI TOF/TOF™ analyzer (ABSCIEX) located in the Montpellier Cancer Research Institute (CRLC Val d'Aurelle). MS and MS/MS methods, as well as image acquisition protocols are detailed in supplementary material.

2.6. Deposition protocol in LDI analyses

To perform LDI analyses on SiO₂ NPs, a standard MALDI plate (ground steel/polished steel/massive) was used. Prior to sample analysis, the pre-spotted target was first prepared. For that, 1 mL of the aqueous solvent was added to the SiO₂ NPs (quantities of 0.5, 1 or 5 mg of inert material). This heterogeneous mixture was vortexed and 0.5 μL of such suspension was then aliquoted by a pipetting device and spotted onto the MALDI target defining a deposit position. After solvent evaporation, a drop of the peptide aqueous sample (0.5 μL) was placed onto the SiO₂ NPs deposit and allowed to dry at room temperature.

3. Results and discussions

3.1. Silica nanoparticles

Having in hand silica gel (commercially available amorphous powder for chromatographic applications with particle size of 40–63 μm) and nanostructured surfaces, we aimed at preparing monodisperse silica nanoparticles to compare a few silica-based substrates that were presenting different material structurations (amorphous powders/monodisperse nanoparticles/structured surfaces) for LDI-MS peptide analysis. We have synthesized nanoparticles according to well-controlled simple sol–gel chemistry. An average hydrodynamic diameter of 199 nm (±1 nm) was measured by dynamic light scattering (DLS) (DLS experiment results are available in Fig. S1 of the supplementary material). The size and the homogeneity of the SiO₂ NPs distribution profile were confirmed by TEM showing monodispersed nanoparticles with a diameter of 200 nm (Fig. 1).

Practically, the deposit stage represented a difficulty encountered in the experimental LDI-MS workflow when silica gel as inert substrate was used [14]. Indeed, the silica gel that was suspended

in aqueous conditions must be kept as a coarse slurry by continuous vortexing prior to rapid aliquoting, deposition onto the MALDI plate and subsequent sample spotting on the top of it. Moving from amorphous powder to nanoparticles allowed simplification of this experimental spotting task since the prepared SiO₂ NPs gave a homogeneous suspension in aqueous conditions under ultrasonic activation. This refined suspension was stable within the experiment time frame. No SiO₂ NPs material deposition in the bottom of the microtube upon gravity was observed for at least 20 min as shown in Fig. S2. The surface of the dry deposit of SiO₂ NPs was found to be more regular than the silica gel dot (no aggregation of inert substrate within the spot) as shown in Fig. 2. Besides, the sample deposit stage was very easy to perform on such dry powder dots. Arrays of silica nanoparticles were pre-spotted on the MALDI target plate for further uses. Interestingly, we found in our hands that pre-spotted SiO₂ NPs were less sensitive to surface contamination upon long shelf-life storage than NALDI™ target. Moreover, this disposable commercial support is not re-usable or washable whereas the SiO₂ NPs deposits could be very easily washed with water/methanol after use making the MALDI plate re-usable for any purpose. Any MALDI user could thus perform MALDI and LDI experiments with the same equipment.

3.2. Sample design

The aim of such ongoing study focuses on small peptide analysis on SiO₂ NPs since LDI-MS is considered as an appropriate analytical tool for small compounds characterization [20]. Besides, around 60% of tryptic sequences obtained from protein digestion in proteomic workflows exhibit masses below 1700 Da [42]. Thus, we selected 48 sequences in our home-made synthetic peptide collection mimicking protein digests as shown in Table 1. The samples spanned a mass range between 500 and 1600 Da and covered a wide structural diversity. A color code was associated to each amino acid category (acidic, basic, polar and non-polar side-chains) to check the occurrence of each residue class was similar to that one found in natural peptides [43]. The hydrophobic/hydrophilic character of each peptide was also evaluated according to its behavior in reversed-phase liquid chromatography [44]. The goal of such peptide selection was to avoid detection bias, which may occur when studying some commercial peptides well-known to give an intense signal in mass spectrometry (peptides used for mass analyzer calibration).

3.3. Method optimization for LDI-MS of peptides on SiO₂ NPs

All peptides were first analyzed to determine the best experimental conditions to conduct sensitive and reliable LDI-MS experiments. Various parameters were investigated: solvent composition of deposited peptide solutions (water content), presence of an organic additive including surfactants (influence on the ion production), quantity of SiO₂ NPs in the deposited slurry/suspension (peptide/inert substrate ratio), and mode of laser irradiation (frequency, focus and fluence). Each series of analyses was carried out with 250 laser shots by acquisition. For reproducibility evaluation, these LDI-MS experiments were performed in triplicate.

3.3.1. Sample conditioning

Keeping in mind that peptides are usually handled as aqueous solutions, the presence of an organic solvent (acetonitrile) was tolerated up to a maximum amount of 30% (v/v). Higher proportions disturbed the deposition protocol since the peptide solution (0.5 μL) was leaching outside the SiO₂ NPs spot.

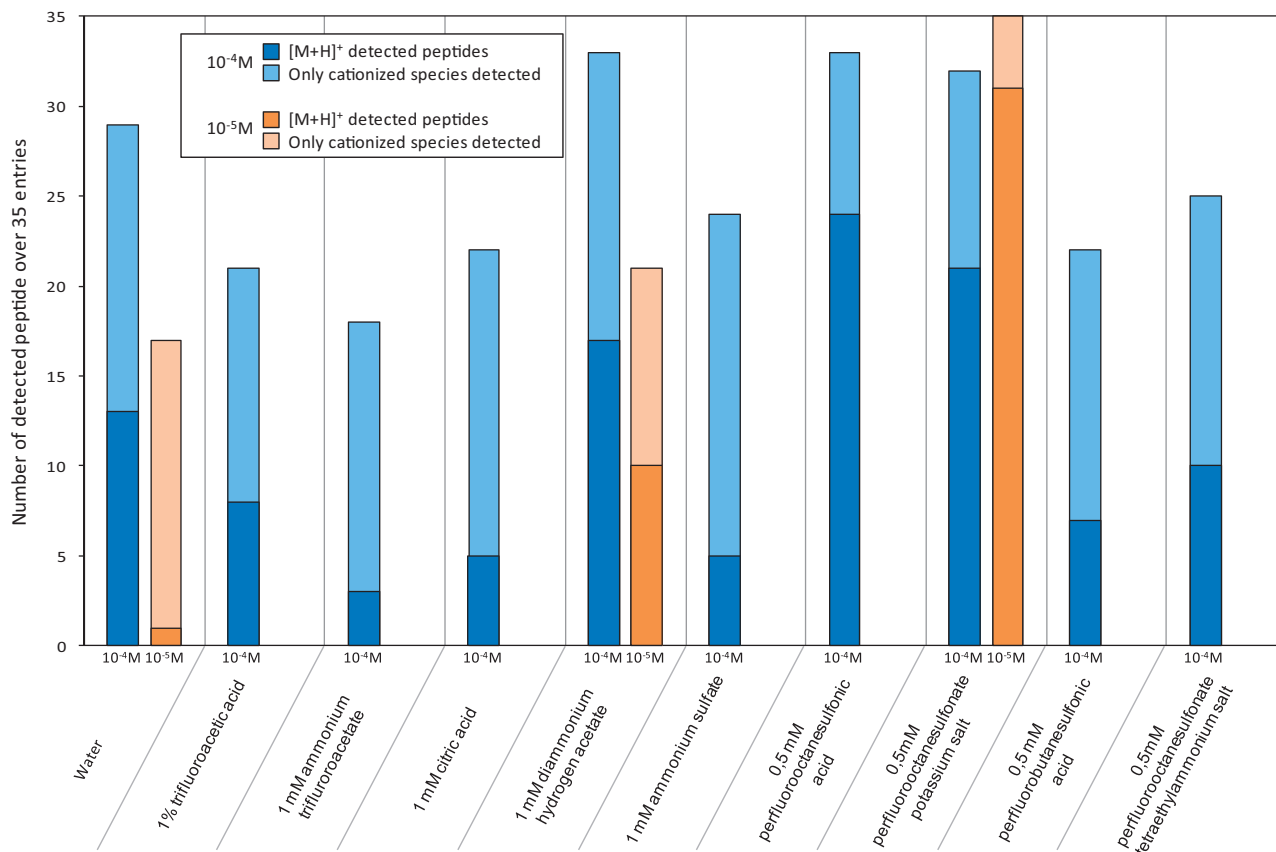
The presence of an organic additive, such as salts of organic acids and fluorosurfactants, are sometimes mentioned in experimental parts describing LDI-MS analyses. In order to rationalize their

Table 1Peptide collection analyzed by LDI-MS on SiO₂ NPs.

Entry	Sequences	M (g/mol)	Entry	Sequences	M (g/mol)
1	P I C A K	530,29	25	Y D T S I V Q R	980,49
2	S E G F K	566,27	26	K M V N L H I Q	981,54
3	K G F C L	566,29	27	A F I S V G P L A R	1029,60
4	V T E F K	622,33	28	C A S H T F L V R	1032,52
5	F A Q I R	633,36	29	K A D F P Q L M V	1047,54
6	A G V D G P K	642,33	30	L M Y V H W V K	1074,57
7	V T E F R	650,34	31	N G F L M C S A L K	1082,53
8	A G V D G P R	670,34	32	L M Y V H W V R	1102,58
9	K A F L H G	671,38	33	K E D F P Q L M V	1105,55
10	K A F H L G	671,38	34	K Y I W L S R A V	1134,66
11	D I G L V R	671,40	35	P G A H I W E A G A K	1135,58
12	K A F L R G	690,42	36	V E Y L A S I T L K	1135,65
13	K A F R L G	690,42	37	G N G Q I V F H A A R	1168,61
14	S W A M V K	720,36	38	G H L P T V S E N A R	1179,60
15	T P S S V L K	730,42	39	W G V Y A P L F D K	1194,61
16	S W A M V R	748,37	40	A D P N Y H I G E T K	1243,58
17	A V G K K K K	757,52	41	M L Q Y G M F V E R	1272,60
18	M W A E N K	777,35	42	L E S M G V D F N A N K	1323,61
19	Y I C P A D K	808,38	43	K E A H M T I V F C S A	1335,63
20	W L I A G D R	829,44	44	A E Q V P L G S Y D T G K	1363,66
21	Y I C P A D R	836,39	45	K S W D T L C M A G R F	1413,65
22	K Y P F E A L	866,45	46	Q L D F G E V L A N T G R	1418,72
23	L G H A P E V R	877,48	47	I W D P S N L I A Q P T K	1481,79
24	Y D T S I V Q K	952,49	48	K W F G M L A D Q A T Y N	1543,71

Amino-acid classes

Aliphatic	Basic	Acid	Not charged	Aromatic
-----------	-------	------	-------------	----------

Table 2Peptide detection efficiency for 35 peptides analyzed by LDI-MS on SiO₂ NPs (1 mg mL⁻¹) according to different solvent conditions.

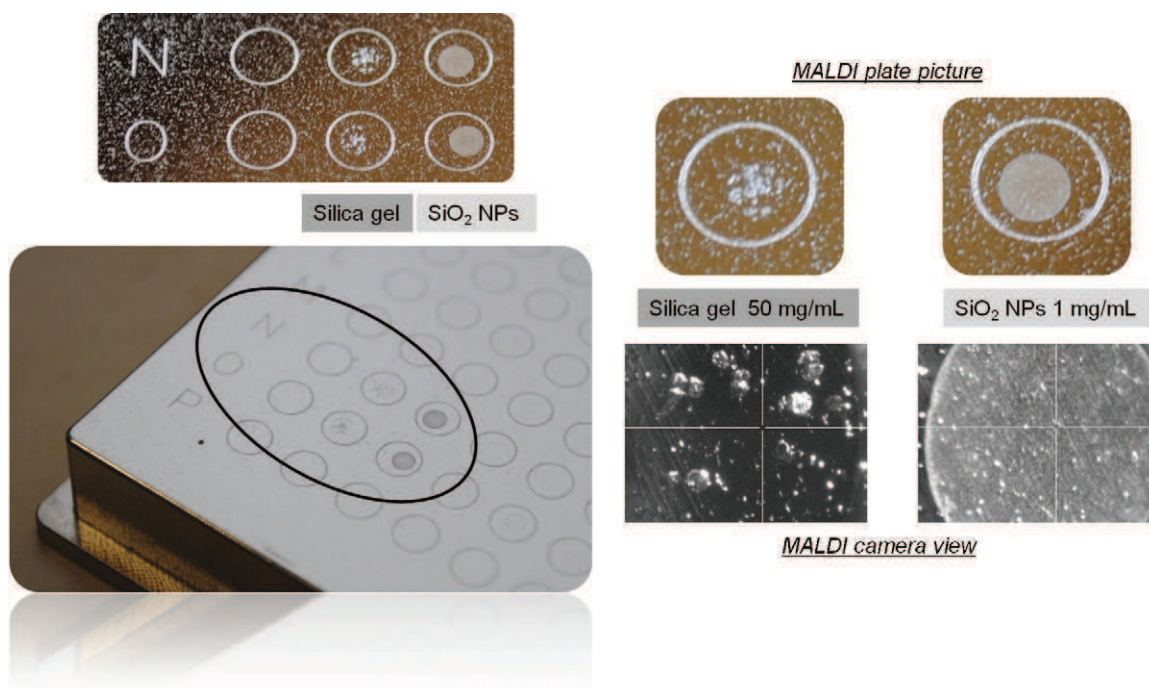


Fig. 2. SiO₂ NPs deposit at a concentration of 1 mg mL⁻¹ in comparison with the silica gel deposit at 50 mg mL⁻¹.

effect on ion production, aqueous solutions of some commonly reported chemicals, *i.e.* diammonium hydrogen citrate (1 mM), trifluoroacetic acid (1%, v/v), and potassium perfluorooctane sulfonate (0.5 mM) were selected. Additionally, diammonium sulfate (1 mM), ammonium trifluoroacetate (1 mM), perfluorooctane sulfonic acid (0.5 mM) and tetraethylammonium salt of perfluorooctane sulfonate (0.5 mM) were also included in the study. Despite the fact that these organic compounds give ions which could interfere with the detection of sample ions of similar masses (for instance, diammonium hydrogen citrate and potassium perfluorooctane sulfonate gave cationized ions at m/z 215/231 and 576, respectively), their potent effect as ionization enhancer were evaluated. 35 selected peptides were dissolved in all tested solvent mixture at a final concentration of 10⁻⁴ M. The ionization yields obtained under such conditions were compared with the responses recorded from neat water solutions. Diammonium hydrogen citrate (1 mM), perfluorooctane sulfonic acid (0.5 mM) and potassium perfluorooctane sulfonate (0.5 mM) provided better results than water whereas the other additives decreased the number of detected peptides and were thus not further considered (Table 2). Perfluorooctane sulfonic acid was also discarded because of practical reasons (very viscous liquid difficult to handle). Diammonium hydrogen citrate (1 mM), potassium perfluorooctane sulfonate (0.5 mM) and neat water were then tested for lower peptide concentration of 10⁻⁵ M. Notably, only potassium perfluorooctane sulfonate allowed keeping the same detection performance, all studied peptides being still observed with high intensities. As a matter of fact, this additive favored the production of protonated ions (MH⁺), whereas the two other conditions mainly gave cationization (MNa⁺/MK⁺) as showed in Table 2. The relative abundances of the potassiated species were rarely increased when the PFOS potassium salt was added. The expected cationization with potassium was observed but the corresponding MK⁺ ion relative abundance was greatly dependent on the peptide sequence. In some cases, this cationized ion was not detected at all; for other peptides, it was the most intense signal within the molecular ion cluster (MH⁺/MNa⁺/MK⁺) as shown in Fig. S3 (Mixture B analyzed from SiO₂ NPs deposit). Overall, the PFOS potassium salt provided more intense signals

at 10⁻⁵ M and the detected peptides often appear as protonated species. Water containing potassium perfluorooctane sulfonate at 0.5 mM (PFOS) was thus preferred to solubilize peptides for LDI-MS analyses.

3.3.2. Quantity of SiO₂ NPs

The quantity of the inert material to be added to the peptide solution was initially chosen according to our previous studies with silica gel. Whereas this amorphous powder required rather large amounts of material to produce informative LDI mass spectra (50 mg mL⁻¹), the required quantity of SiO₂ NPs to perform the same analysis was greatly diminished by at least a factor 10. Concentrations of SiO₂ NPs in water at three different levels (5 mg mL⁻¹, 1 mg mL⁻¹, and 0.5 mg mL⁻¹) provided very homogeneous deposits that all produced peptide ions with similar abundances. The spot homogeneity after air-drying was of crucial significance to ensure reliable peptide detection. Any spatial discrepancy affected the sample distribution across the deposit with higher concentrations on specific areas (deposit outskirts, 'hot spot') and disturbed the signal detection. We found that moving from amorphous powder to nanoparticles improved the method reliability by a better control of inert material surface repartition. In order to gain insight into the sample dispersal in the SiO₂ NPs, imaging experiments were envisaged as detailed below.

3.3.3. Mode of laser irradiation

Control of the laser irradiation is of foremost importance in LDI mass spectrometry. Indeed, increasing the quantity of photons on a given surface may induce peptide fragmentation during the desorption/ionization process [45–47]. Adjusting the laser fluence, frequency and focus is prerequisite for molecular ion detection. Despite a rather high laser fluence with SiO₂ NPs that was comparable with the value used with amorphous silica gel (around 50% at 100 Hz), the focus was found to greatly modify the detection response. Three very different beam focus values were tested: 29%, 53% and 98% referred as medium, small and minimum focus, respectively. Fig. S3 in the supplementary material showed mass spectra recorded under various mode of laser irradiation. The more

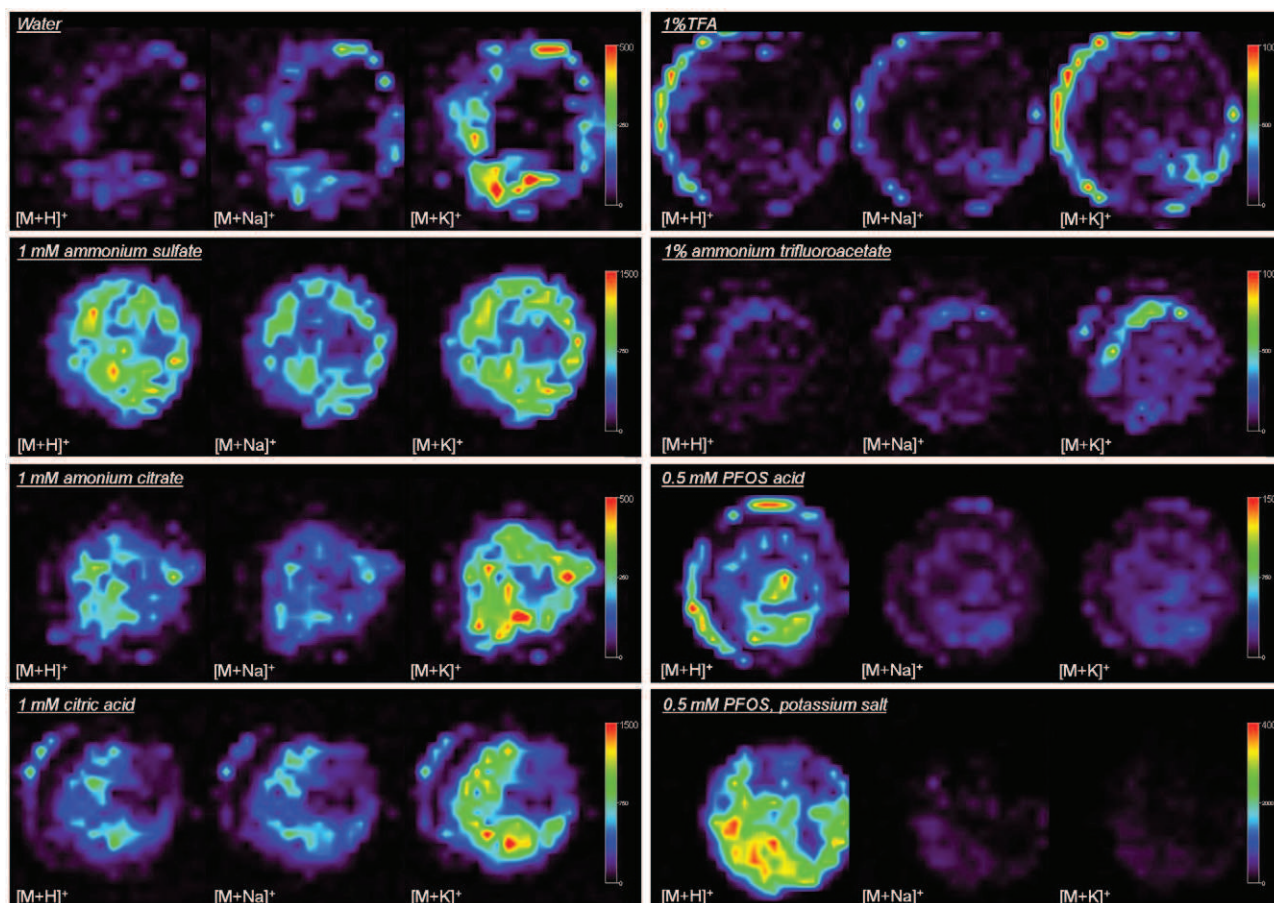


Fig. 3. Images of WLIAGDR peptide ions ($MH^+/MNa^+/MK^+$) (entry 20 in Table 1) recorded at 10^{-3} M from SiO_2 NPs with different solvent compositions.

the laser was focused (98%), the higher the laser fluence was required (>50%) to achieve abundant peptide ion production from a restricted irradiated area. Intense molecular signals were also obtained with a less focused laser beam (29% or 53%) together with lower laser fluence (<50%). In that case, a large part of the deposit was involved for MS data acquisition. Such great sample consumption was hampering subsequent MS/MS analysis. Besides, a routine frequency of 100 Hz was kept throughout all MS analyses. Nevertheless, a frequency of 200 Hz was required to perform MS/MS experiments and achieve correct dissociation of molecular ions.

3.4. Imaging experiments

The actual deposit homogeneity was demonstrated by imaging studies. A first set of mapping experiments was performed with different SiO_2 NPs quantities (aqueous suspensions at 5 mg mL^{-1} , 1 mg mL^{-1} and 0.5 mg mL^{-1}). The recorded images of one peptide dissolved at 10^{-3} M [entry 20 in Table 1] displayed in Fig. S4 in the supplementary material were compared with the spatial peptide distribution obtained from direct deposit onto the MALDI steel plate (no inert substrate). Repartition of the protonated peptide ion (MH^+) was found very homogeneous, the bulk of the sample being localized inside the deposit (no accumulation at the outskirts) for all tested peptide/ SiO_2 NPs ratios. However, the total MH^+ ion abundance was more significant in the case of 1 mg mL^{-1} and 0.5 mg mL^{-1} of SiO_2 NPs than for a higher inert substrate content (5 mg mL^{-1}). The latter presented an image comparable with the one obtained from the same peptide solution directly deposited onto the MALDI steel plate. A second set of data were then recorded

at a fixed peptide/ SiO_2 NPS ratio but the sample conditioning was varied: neat water, 1 mM diammonium citrate, 1 mM citric acid, 1 mM of diammonium sulphate, 1% (v/v) trifluoroacetic acid, 1 mM ammonium trifluoroacetic acetate, 0.5 mM perfluorooctane sulfonic acid, and 0.5 mM potassium perfluorooctane sulfonate (Fig. 3). With the exception of neat water and 1% trifluoroacetic acid solution that provided peptide localization at the outskirts of the spot, all other tested solvent conditions showed a central repartition of the recorded $MH^+/MNa^+/MK^+$ ions. Two other peptides exhibiting different molecular weights (entries 1 and 39 in Table 1) were imaged and as expected, a homogeneous localization was observed for all additive-containing solvent (Fig. S5 of the supplementary material). The presence of such additive was efficient to spread the peptide all over the spot. These results guaranteed that random laser irradiation could be programmed for automated analyses of sample supplemented with ammonium citrate or PFOS without affecting the reliability of ion detection.

3.5. Method validation for LDI-MS of peptides on SiO_2 NPs

3.5.1. Repeatability

To assess the inter-spot and intra-spot signal intensity variations, 3 deposits were analyzed once and 5 analyses on the same spot were performed. 10 peptides were analyzed on SiO_2 NPs (1 mg mL^{-1}) at a 10^{-5} M concentration in 0.5 mM aqueous PFOS. All of these 150 LDI-MS experiments were recorded under random laser irradiation with a medium beam focus (53%). Under these conditions, the laser fluence fluctuated between 30 and 35% according to the peptides. The recorded data are gathered in Table 3. The detection of the peptide ions was reliable with

Table 3Method repeatability for LDI-MS of 10 peptides at 10^{-5} M (solubilized in water containing 0.5 mM PFOS) deposited onto SiO₂ NPs (1 mg mL⁻¹).

Peptide entry	Laser fluence	Cumulated S/N	Average of intra-spot variations	Average of inter-spot variations	Average resolution	Average mass error (ppm)
5	30%	125	11%	16%	13,435	15
15	30%	413	11%	44%	14,549	14
20	30%	991	13%	40%	15,827	4
22	30%	760	16%	28%	16,384	36
26	30%	182	18%	23%	18,109	50
27	30%	466	9%	7%	15,969	26
30	30%	162	14%	43%	18,324	14
35	35%	1095	16%	24%	19,077	14
39	30%	1129	27%	3%	18,824	11
46	30%	94	18%	20%	20,843	6
Average	31%	542	15%	25%	17,134	19

Inter-spot variations: 3 deposits.

Intra-spot variations: 5 analyses/deposit.

signal intensities presenting respectively 15% and 25% average intra-spot and inter-spot variations, the abundances of protonated and cationized species (MH⁺/MNa⁺/MK⁺) being cumulated for each sample. The monoisotopic ion of the MH⁺ species was clearly observed with an average resolution around 17,000 and mass accuracy of 20 ppm. The method repeatability was also demonstrated for all 48 peptides conditioned in ammonium citrate solution

(10^{-3} M) (Table S1 of the supplementary material) allowing assessing the robustness of the described LDI-MS technique whatever the sample conditioning.

3.5.2. Sensitivity

The next issue was to determine the limit of detection of this LDI-MS method on SiO₂ NPs. 35 peptide solutions were prepared in

Table 4Detection sensibility for 35 peptides (solubilized in water containing 0.5 mM PFOS) analyzed by LDI-MS on SiO₂ NPs (1 mg mL⁻¹).

Entry	M (g mol ⁻¹)	LOD	S/N cumulated	Resolution average
28	1032.52	10^{-5} M	28.6	18,962
2	566.27		107.4	9501
14	720.36		316.4	12,347
16	748.37		543.8	12,339
17	757.52		59.9	14,892
18	777.35		156.4	13,454
19	808.38		90.3	13,863
21	836.39		175.8	14,486
24	952.49		346.2	14,955
27	1029.60		335.1	16,808
30	1074.57	10^{-6} M	217.9	16,846
31	1082.53		205.0	17,612
32	1102.58		522.2	17,104
35	1135.58		837.4	16,456
36	1135.65		523.9	18,873
37	1168.61		187.6	18,076
38	1179.60		238.1	16,617
40	1243.58		350.5	17,173
41	1272.60		866.1	15,943
1	530.29		8.6	21,012
4	622.33		16.6	14,058
5	633.36		328.1	12,016
6	642.33		43.6	12,653
7	650.34		103.5	10,789
8	670.34		88.4	10,034
9	671.40		199.7	13,894
15	730.42		260.2	15,629
20	829.44	10^{-7} M	46.3	16,244
23	877.48		12.9	12,591
25	980.49		111.5	15,646
39	1194.61		9.3	17,141
42	1323.61		6.6	21,250
44	1363.66		31.9	21,237
46	1418.72		225.8	15,026
47	1481.79		66.5	21,759
Global performance and sensitivity			S/N average	Resolution average
10^{-6} M (500 fmol deposited)		33/35 pept. detected	526.0	14,742
10^{-7} M (50 fmol deposited)		16/35 pept. detected	97.5	15,686

S/N cumulated = sum of [M+H]⁺, [M+Na]⁺ and [M+K]⁺ ions.

Peaks with S/N < 5 are not taken in account.

Range of concentrations tested: 10^{-2} M– 10^{-3} M– 10^{-4} M– 10^{-5} M– 10^{-6} M– 10^{-7} M– 10^{-8} M.

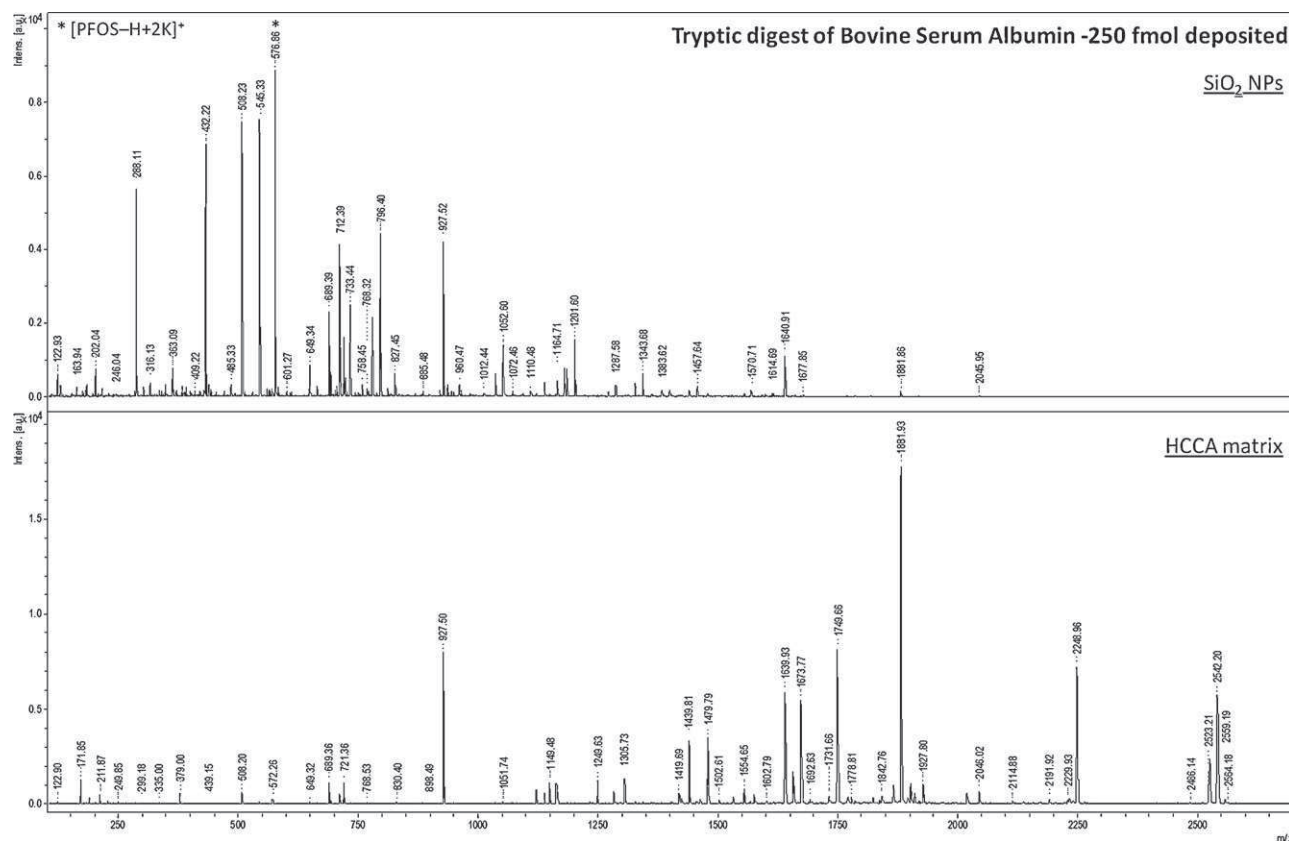


Fig. 4. MS spectrum of tryptic digest of Bovine Serum Albumin at 250 fmol (solubilized in water containing 0.5 mM PFOS) deposited onto SiO₂ NPs (1 mg mL⁻¹).

0.5 mM PFOS to obtain 5 sets of samples with final concentrations of 10⁻⁴ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M and 10⁻⁸ M. Results are gathered in Table 4. Keeping the same SiO₂ NPs amount (1 mg mL⁻¹), the LDI-MS experiments were performed with such decreasing deposited peptide quantities (50 pmol at 10⁻⁴ M down to 5 fmol at 10⁻⁸ M). The desorption/ionization behavior encountered with all PFOS solutions did not change with sample dilution down to 10⁻⁶ M (500 fmol deposited). A high level of detection efficiency (33/35 peptides) was maintained while lowering the peptide concentrations to that level. The signals were very well defined with an average resolution around 15,000 and S/N ratios around 500. To find the limit of detection, further dilution showed that only half of the peptides were still responding with the same resolution and S/N ratios down to 100 at 10⁻⁷ M (16/35 peptides as seen in Table 4). Despite rather abundant molecular ions with S/N ratios well above the detection limit (S/N around 100), decreasing the concentration down to 10⁻⁸ M for these 16 peptides completely suppressed any signal detection. Thus, we found that the designed LDI-MS on SiO₂ NPs was very interesting for the analysis of faintly concentrated peptide samples, the detected signals exhibiting high abundances (S/N of 100) and resolution (15,000) at the LOD in the femtomolar range (10⁻⁷ M, 50 fmol deposited) as encountered in proteomic studies.

3.5.3. Analysis of peptide mixtures as model protein digests

Although LDI-MS on SiO₂ NPs was found very interesting for the analysis of pure peptides, its application to proteomic studies with the acquisition of peptide mass fingerprints raised the question of peptide mixture analysis. Any discrimination during the peptide desorption/ionization process results in signals that are either over- or under-expressed, greatly affecting the detection efficiency for the low-responding sequences and the overall

protein sequence coverage. Artificial mixtures, each composed by 5 peptides dissolved equimolarly at 10⁻⁵ M in 0.5 mM PFOS, were designed to cover a mass range between 500 and 1500 Da. Seven mixtures (listed in Table S2 of the supplementary material) were subjected to LDI-MS from SiO₂ NPs at 1 mg mL⁻¹. Table S2 summarizes the detection efficiency for each peptide by reporting the relative abundance of any recorded molecular ions divided by the total ion abundances in a mixture. Despite robust reliable ion detection, spectral discrimination was observed for each mixture. Some peptides were always reluctant to ionization giving signals with very low intensity (gray entries in Table S2) whereas other sequences produced abundant ions. These results were compared with previous experiments carried out from identical mixtures deposited onto nanostructured silicon surfaces [28]. The aim was to check if nanoparticles provided different spectral discrimination than in previously studied silicon-based material or standard organic MALDI matrix. The only difference observed between the two inert substrates concerned the relative abundance of the shortest peptide sequences of each mixture which was greater in the case of SiO₂ NPs than in the case of the nanostructured surface. However, the mass spectra acquired from an organic matrix such as α -cyano-4-hydroxycinnamic acid showed completely different desorption/ionization behavior. These results summarized in Table S2 indicated that the intrinsic acid-base properties of the studied peptides were mainly responsible for ion suppression, the physico-chemical properties of the two inert substrates being less implicated.

A tryptic digest of Bovine Serum Albumin (BSA) was successfully analyzed by LDI-MS on SiO₂ NPs at 4 concentrations in 10⁻⁷ M range corresponding to 1000, 500, 250 and 125 fmol of deposited material. Many peptides were detected on a wide mass range (from *m/z* 100 to 2000) with very high abundances for low molecular

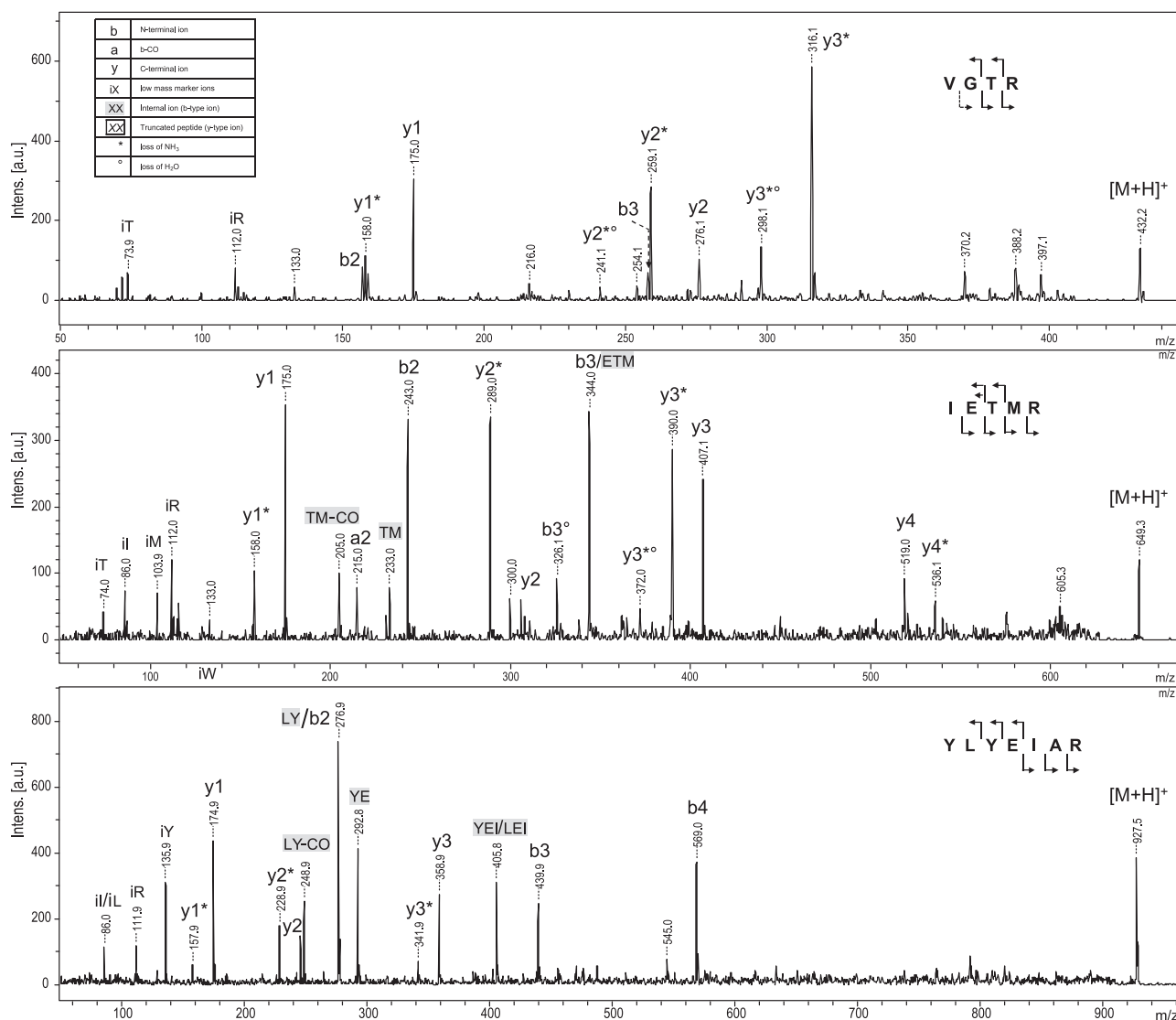


Fig. 5. MS/MS spectrum of 3 protonated peptide ions (MH^+) detected in the low mass range of the BSA tryptic digest data (recorded at 1 pmol from 0.5 mM PFOS solution deposited onto SiO_2 NPs (1 mg mL^{-1})).

weight sequences that were not usually clearly seen on mass spectra recorded from organic matrix deposit as illustrated in Fig. 4.

3.5.4. MS/MS analyses for peptide sequencing

Finally, we pursued this study by performing tandem mass spectrometry experiments from peptides/ SiO_2 NPs spots. Detecting but also characterizing the amino acid sequences is of prerequisite importance in peptidomics and proteomics. MALDI-TOF/TOF equipments allow peptide sequencing [28,47,48] and the recorded MS/MS data can be assigned based on fragmentation rules that have been established upon low energy dissociation conditions of protonated ions [49]. The pre-spotted SiO_2 NPs target with the seven peptide mixtures from PFOS solutions and the BSA tryptic digest at 2×10^{-6} M was subjected in the row to MS and MS/MS analyses.

Regarding the BSA digest, all low mass peptides that were only detected by LDI-MS on SiO_2 NPs as shown in Fig. 4 were successfully sequenced upon dissociation conditions. An illustration of 3 recorded MS/MS is provided in Fig. 5. Among all detected 35 peptides of the artificial mixtures, four of them did not produce a protonated ion. They were only identified as cationized species

and were thus not suitable for conventional peptide sequencing. Overall, 31 selected protonated molecular ions were subjected to MS/MS. One example is provided in Fig. S6 of the supplementary material. It was found that the precursor ion abundance was too low for 9 of them to be dissociated. Moreover, among the recorded 22 MS/MS data, 2 of them were lacking too many backbone fragment ions to allow reliable sequence deciphering. The dissociation mass spectra of the other 20 peptides were similar to the ones recorded at the same concentration from conventional MALDI-MS/MS experiments (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) and from nanostructured silicon plate [28]. The only limitation of peptide sequencing from SiO_2 NPs was thus the low abundance of some protonated ions in the primary mass spectrum hampering the opportunity to record informative MS/MS.

4. Conclusion

We have demonstrated in this study that silica nanoparticles, easily prepared by well-controlled simple sol-gel chemistry, can be used as new pre-spotted target plates for LDI-MS analysis. The SiO_2 NPs substrates allowed soft desorption/ionization of a large

variety of peptides with masses ranging from 500 to 1700 Da. Furthermore, we have shown that both MS and MS/MS experiments can be conducted on the same SiO₂ NPs deposit allowing rapid and easy data acquisition for structural characterization. The described LDI-MS method was as rapid and efficient as conventional MALDI experiment. Above all, it proved to be low-cost and very straightforward to implement on standard MALDI equipment, no purchase of specific piece of equipment (adaptor) to accommodate the inert substrates being required.

Acknowledgments

We thank Dr Laetitia Mouls, Dr Nawar Shenar and Dr Pascal Verdié for providing some peptides and Dr Christian Larroque and Amina Bouslimani for allowing the imaging experiments.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.06.037>.

References

- [1] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Matsuo, Protein and polymer analyses up to *m/z* 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2 (8) (1988) 151–153.
- [2] J. Sunner, E. Dratz, Y.-C. Chen, Graphite surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides and proteins from liquid solutions, *Anal. Chem.* 67 (23) (1995) 4335–4342.
- [3] M.J. Dale, R. Knochenmuss, R. Zenobi, Graphite/liquid mixed matrices for laser desorption/ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.* 68 (19) (1996) 3321–3329.
- [4] D.S. Peterson, Matrix-free methods for laser desorption/ionization mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 26 (1) (2007) 19–34.
- [5] K. Law, J. Larkin, Recent advances in SALDI-MS techniques and their chemical and bioanalytical applications, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (8) (2011) 2597–2622.
- [6] M. Rainer, M. Qureshi, G. Bonn, Matrix-free and material-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry for the analysis of low molecular weight compounds, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (8) (2011) 2281–2288.
- [7] J. Wei, J.M. Buriak, G. Siuzdak, Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon, *Nature* 399 (6733) (1999) 243–246.
- [8] Z. Shen, J.J. Thomas, C. Averbuj, K.M. Broo, M. Engelhard, J.E. Crowell, M.G. Finn, G. Siuzdak, Porous silicon as a versatile platform for laser desorption/ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.* 73 (3) (2000) 612–619.
- [9] Y.-C. Chen, J.-Y. Wu, Analysis of small organics on planar silica surfaces using surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (20) (2001) 1899–1903.
- [10] Q. Zhang, H. Zou, Z. Guo, Q. Zhang, X. Chen, J. Ni, Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using porous silicon and silica gel as matrix, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (3) (2001) 217–223.
- [11] A. Górecka-Drzazga, S. Bargiel, R. Walczak, J.A. Dziuban, A. Kraj, T. Dylag, J. Silberring, Desorption/ionization mass spectrometry on porous silicon dioxide, *Sens. Actuators, B* 103 (1–2) (2004) 206–212.
- [12] S.A. Trauger, E.P. Go, Z. Shen, J.V. Apon, B.J. Compton, E.S.P. Bouvier, M.G. Finn, G. Siuzdak, High sensitivity and analyte capture with desorption/ionization mass spectrometry on silylated porous silicon, *Anal. Chem.* 76 (15) (2004) 4484–4489.
- [13] C.-S. Lee, K.-K. Kang, J.-H. Kim, Y.-G. Kim, H.-W. Shim, T.-S. Hwang, H.-K. Rhee, B.-G. Kim, Analysis of small molecules by desorption/ionization on mesoporous silicate (DIOM)-mass spectrometry (MS), *Microporous Mesoporous Mater.* 98 (1–3) (2007) 200–207.
- [14] N. Shenar, J. Martinez, C. Enjalbal, Laser desorption/ionization mass spectrometry on porous silica and alumina for peptide mass fingerprinting, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19 (5) (2008) 632–644.
- [15] S. Alimpiev, A. Grechnikov, J. Sunner, V. Karavanskii, Y. Simanovsky, S. Zhabin, S. Nikiforov, On the role of defects and surface chemistry for surface-assisted laser desorption ionization from silicon, *J. Chem. Phys.* 128 (1) (2008) 014711–014719.
- [16] S. Dagan, Y. Hua, D.J. Boday, A. Somogyi, R.J. Wysocki, V.H. Wysocki, Internal energy deposition with silicon nanoparticle-assisted laser desorption/ionization (SPALDI) mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom.* 283 (1–3) (2009) 200–205.
- [17] G. Luo, Y. Chen, G. Siuzdak, A. Vertes, Surface modification and laser pulse length effects on internal energy transfer in DIOS, *J. Phys. Chem. B* 109 (51) (2005) 24450–24456.
- [18] T.R. Northen, H.-K. Woo, M.T. Northen, A. Nordström, W. Uritboonthail, K.L. Turner, G. Siuzdak, High surface area of porous silicon drives desorption of intact molecules, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (11) (2007) 1945–1949.
- [19] Y. Xiao, S.T. Retterer, D.K. Thomas, J.-Y. Tao, L. He, Impacts of surface morphology on ion desorption and ionization in desorption ionization on porous silicon (DIOS) mass spectrometry, *J. Phys. Chem. C* 113 (8) (2009) 3076–3083.
- [20] X. Wen, S. Dagan, V.H. Wysocki, Small-molecule analysis with silicon-nanoparticle-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.* 79 (2) (2007) 434–444.
- [21] A.Y. Lim, F. Gu, Z. Ma, J. Ma, F. Rowell, Doped amorphous silica nanoparticles as enhancing agents for surface-assisted time-of-flight mass spectrometry, *Analyst* 136 (13) (2011) 2775–2785.
- [22] J.D. Cuiuffi, D.J. Hayes, S.J. Fonash, K.N. Brown, A.D. Jones, Desorption-ionization mass spectrometry using deposited nanostructured silicon films, *Anal. Chem.* 73 (6) (2001) 1292–1295.
- [23] A.M. Dattelbaum, R.K. Hicks, J. Shelley, A.T. Koppisch, S. Iyer, Surface assisted laser desorption-ionization mass spectrometry on patterned nanoporous silica thin films, *Microporous Mesoporous Mater.* 114 (1–3) (2008) 193–200.
- [24] A.B. Jemere, L.W. Bezuidenhout, M.J. Brett, D.J. Harrison, Matrix-free laser desorption/ionization mass spectrometry using silicon glancing angle deposition (GLAD) films, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (15) (2010) 2305–2311.
- [25] N.H. Finkel, B.G. Prevo, O.D. Velev, L. He, Ordered silicon nanocavity arrays in surface-assisted desorption/ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.* 77 (4) (2005) 1088–1095.
- [26] W.Y. Chen, J.T. Huang, Y.C. Cheng, C.C. Chien, C.W. Tsao, Fabrication of nanostructured silicon by metal-assisted etching and its effects on matrix-free laser desorption/ionization mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 687 (2) (2011) 97–104.
- [27] Y.-C. Cheng, K.-H. Chen, J.-S. Wang, W.-L. Hsu, C.-C. Chien, W.-Y. Chen, C.-W. Tsao, Rapid analysis of abused drugs using nanostructured silicon surface assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Analyst* 137 (3) (2012) 654–661.
- [28] M. Dupré, Y. Coffinier, R. Boukherroub, S. Cantel, J. Martinez, C. Enjalbal, Laser desorption ionization mass spectrometry of protein tryptic digests on nanostructured silicon plates, *J. Proteomics* 75 (7) (2012) 1973–1990.
- [29] E.P. Go, J.V. Apon, G. Luo, A. Saghatelian, R.H. Daniels, V. Sahi, R. Dubrow, B.F. Cravatt, A. Vertes, G. Siuzdak, Desorption/ionization on silicon nanowires, *Anal. Chem.* 77 (6) (2005) 1641–1646.
- [30] M.-J. Kang, J.-C. Pyun, J.-C. Lee, Y.-J. Choi, J.-H. Park, J.-G. Park, J.-G. Lee, H.-J. Choi, Nanowire-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry for quantitative analysis of small molecules, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (21) (2005) 3166–3170.
- [31] C.-W. Tsao, P. Kumar, J. Liu, D.L. DeVoe, Dynamic electrowetting on nanofilament silicon for matrix-free laser desorption/ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.* 80 (8) (2008) 2973–2981.
- [32] G. Piret, H. Drobecq, Y. Coffinier, O. Melnyk, R. Boukherroub, Matrix-free laser desorption/ionization mass spectrometry on silicon nanowire arrays prepared by chemical etching of crystalline silicon, *Langmuir* 26 (2) (2010) 1354–1361.
- [33] F. Lapiere, G. Piret, H. Drobecq, O. Melnyk, Y. Coffinier, V. Thomy, R. Boukherroub, High sensitive matrix-free mass spectrometry analysis of peptides using silicon nanowires-based digital microfluidic device, *Lab Chip* 11 (9) (2011) 1620–1628.
- [34] N. Shenar, S. Cantel, J. Martinez, C. Enjalbal, Comparison of inert supports in laser desorption/ionization mass spectrometry of peptides: pencil lead, porous silica gel, DIOS-chip and NALDI target, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (15) (2009) 2371–2379.
- [35] K.P. Law, Laser desorption/ionization mass spectrometry on nanostructured semiconductor substrates: DIOS (TM) and QuickMass (TM), *Int. J. Mass Spectrom.* 290 (2–3) (2010) 72–84.
- [36] E. Guénin, M. Lecouvey, J. Hardouin, Could a nano-assisted laser desorption/ionization target improve the study of small organic molecules by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry? *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (9) (2009) 1395–1400.
- [37] Y.-C. Chen, M.-F. Tsai, Using surfactants to enhance the analyte signals in activated carbon, surface-assisted laser desorption/ionization (SALDI) mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 35 (11) (2000) 1278–1284.
- [38] A. Nordstrom, J.V. Apon, W. Uritboonthai, E.P. Go, G. Siuzdak, Surfactant-enhanced desorption/ionization on silicon mass spectrometry, *Anal. Chem.* 78 (1) (2006) 272–278.
- [39] W. Tang, H. Xu, R. Kopelman, M.A. Philbert, Photodynamic characterization and in vitro application of methylene blue-containing nanoparticle platforms, *Photochem. Photobiol.* 81 (2) (2005) 242–249.
- [40] J.M. Stewart, J.D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, second ed., Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, 1984.
- [41] M. Dupré, S. Cantel, P. Verdié, J. Martinez, C. Enjalbal, Sequencing Lys-N proteolytic peptides by ESI and MALDI tandem mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22 (2) (2011) 265–279.
- [42] N. Nagaraj, J.R. Wisniewski, T. Geiger, J. Cox, M. Kircher, J. Kelso, S. Paabo, M. Mann, Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line, *Mol. Syst. Biol.* 7 (2011).
- [43] Swiss Institute of Bioinformatics: Swiss-Prot archive. <http://www.expasy.ch/sprot/>.
- [44] O.V. Krokhin, S. Ying, J.P. Cortens, D. Ghosh, V. Spicer, W. Ens, K.G. Standing, R.C. Beavis, J.A. Wilkins, Use of peptide retention time prediction for protein identification by off-line reversed-phase HPLC–MALDI MS/MS, *Anal. Chem.* 78 (17) (2006) 6265–6269.

- [45] D. Suckau, A. Resemann, M. Schuerenberg, P. Hufnagel, J. Franzen, A. Holle, A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (7) (2003) 952–965.
- [46] M. Macht, A. Asperger, S. -O. Deininger, Comparison of laser-induced dissociation and high-energy collision-induced dissociation using matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight (MALDI-TOF/TOF) for peptide and protein identification, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (18) (2004) 2093–2105.
- [47] N. Shenar, N. Sommerer, J. Martinez, C. Enjalbal, Comparison of LID versus CID activation modes in tandem mass spectrometry of peptides, *J. Mass Spectrom.* 44 (5) (2009) 621–632.
- [48] M. Dupré, S. Cantel, J. Martinez, C. Enjalbal, Occurrence of C-terminal residue exclusion in peptide fragmentation by ESI and MALDI tandem mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 23 (2) (2012) 330–346.
- [49] B. Paizs, S. Suhai, Fragmentation pathways of protonated peptides, *Mass Spectrom. Rev.* 24 (4) (2005) 508–548.

II.2.2. Illustrations complémentaires

Peptide synthesis.

La synthèse des peptides présentée dans le "supporting information" original n'a pas été incluse dans cette partie du manuscrit. Elle est consultable dans l'[Annexe 3 – synthèse peptidique sur support semi-automatisée](#).

Mass spectrometry methods.

MS data were acquired under the following MS conditions. An acceleration voltage of 25.0 kV (IS1) was applied for a final acceleration of 21.95 kV (IS2). The reflectron mode was used for the ToF analyzer (voltages of 26.3 kV and 13.8 kV). Random laser irradiation was performed according to the partial sample mode with 10 shots/point. One acquisition was recorded from 50 shots corresponding to 5 irradiated positions. Mass spectra of peptides were acquired from 250 (pure peptides) or 500 (peptide mixtures) laser shots, the laser fluence being adjusted for each studied sample (laser fluence 1). Ions were detected over a mass range from m/z 300 to 2000 and 100 to 1600 for pure peptides and peptide mixtures, respectively.

MS/MS data were acquired under the following conditions. An acceleration voltage of 8.0 kV (IS1) was applied for a final acceleration of 7.25 kV (IS2). The reflectron mode was used for the TOF analyzer (voltages of 29.5 and 13.9 kV). Mass spectra were acquired from about 1000 laser shots, the laser fluence being adjusted for each studied peptide above the threshold for generation of molecular ions (Laser fluence 2 > Laser fluence 1). MS/MS experiments were performed under laser induced dissociation (LID) conditions with the LIFT cell voltage parameters set at 19.0 kV (LIFT 1) and 3.2 kV (LIFT 2) for a final acceleration of 29.5 kV (reflector voltage) and a pressure in the LIFT cell around 4×10^{-7} mbar. The precursor ion selector was set manually to the first monoisotopic peak of the molecular ion pattern for all analyses. For LID experiments, no collision gas was added (gas off spectra).

Acquisition of images was carried out using the 4800 Imaging Tool software under the following MS conditions: source 1 at 20kV and grid 1 at 16kV. Positive ion reflectron mass spectra were acquired in the mass range of m/z 100–1400. Each MALDI mass spectrum for each Voxel was the result of 50 consecutive laser shots at each position. Spectra were acquired over a $100 \times 100 \mu\text{m}$ raster at a laser intensity set around 75% (6000 as selected within the Explorer software). The laser beam on target was determined to be circular with a diameter of $50 \mu\text{m}$. The images were then processed using TissueView™ software (Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies) to produce a two-dimensional (2D) ion intensity map. Ion images with semi-quantitative information were always accompanied by a color scale, which was exported from the TissueView™ software.

Table S1. Intra-spot and inter-spot variations for each studied peptide solubilized at 10^{-3} M in water containing 1mM ammonium citrate (of Table 1).

Entry	M (g/mol)	Average of laser fluence (%)	Average of cumulated S/N detection*	Inter-spot variations (%)	[M+H] ⁺ proportions (%)	[M+Na] ⁺ proportions (%)	[M+K] ⁺ proportions (%)	Average of Intra-spot variations (%)
1	530,29	55%	594	31%	3%	31%	65%	6%
2	566,27	55%	266	28%	2%	34%	64%	13%
3	566,29	53%	354	21%	6%	50%	44%	16%
4	622,33	55%	338	5%	2%	36%	61%	6%
5	633,36	55%	141	28%	23%	21%	56%	20%
6	642,33	55%	333	35%	0%	34%	66%	13%
7	650,34	55%	155	35%	29%	30%	41%	17%
8	670,34	65%	101	15%	45%	21%	33%	12%
9	671,38	53%	326	47%	2%	47%	51%	33%
10	671,38	54%	236	38%	2%	46%	52%	11%
11	671,40	55%	194	3%	34%	18%	48%	9%
12	690,42	60%	260	26%	32%	31%	37%	20%
13	690,42	58%	229	32%	21%	47%	32%	27%
14	720,36	55%	202	34%	0%	38%	62%	13%
15	730,42	55%	534	29%	0%	39%	61%	11%
16	748,37	65%	180	3%	33%	22%	45%	10%
17	757,52	65%	375	15%	1%	32%	67%	6%
18	777,35	60%	126	30%	0%	28%	72%	17%
19	808,38	65%	314	19%	1%	32%	67%	9%
20	829,44	67%	123	26%	34%	23%	43%	23%
21	836,39	65%	39	–	55%	13%	32%	14%
22	866,45	58%	537	47%	1%	48%	51%	14%
23	877,48	60%	213	35%	23%	20%	57%	27%
24	952,49	60%	157	28%	0%	31%	69%	18%
25	980,49	60%	87	30%	24%	18%	57%	16%
26	981,54	60%	156	3%	1%	45%	54%	21%
27	1029,60	65%	62	8%	28%	23%	49%	11%
28	1032,52	65%	53	27%	25%	22%	54%	15%
29	1047,54	60%	89	12%	1%	53%	46%	22%
30	1074,57	62%	659	10%	3%	35%	62%	5%
31	1082,53	65%	372	23%	0%	27%	73%	12%
32	1102,58	65%	256	32%	34%	21%	45%	9%
33	1105,55	58%	87	18%	0%	43%	56%	21%
34	1134,66	61%	156	30%	48%	24%	28%	19%
35	1135,58	65%	396	25%	0%	31%	69%	8%
36	1135,65	65%	565	23%	0%	31%	69%	9%
37	1168,61	65%	94	14%	23%	26%	51%	33%
38	1179,60	70%	137	51%	61%	11%	28%	36%
39	1194,61	65%	304	20%	0%	34%	66%	8%
40	1243,58	71%	162	31%	6%	33%	61%	17%
41	1272,60	71%	253	65%	31%	22%	46%	16%
42	1323,61	70%	232	40%	0%	32%	68%	12%
43	1335,63	67%	62	–	0%	48%	52%	29%
44	1363,66	70%	321	6%	0%	29%	71%	11%
45	1413,65	65%	53	26%	98%	0%	2%	21%
46	1418,72	71%	129	42%	24%	29%	47%	16%
47	1481,79	64%	141	39%	0%	29%	71%	19%
48	1543,71	70%	89	13%	15%	40%	44%	18%
Average		62%	234	26%	16%	31%	53%	16%

* Average of cumulated detection of protonated and cationized species per deposits

Legend Inter-spot variations : 3 deposits / peptides
 Intra-spot variations : 3 experiments / deposits
 – Only 1 deposit available

Table S2. Comparison of spectral discrimination for the 7 peptide mixtures analyzed from SiO₂ NPs, nanostructured silicon-based surface and HCCA.

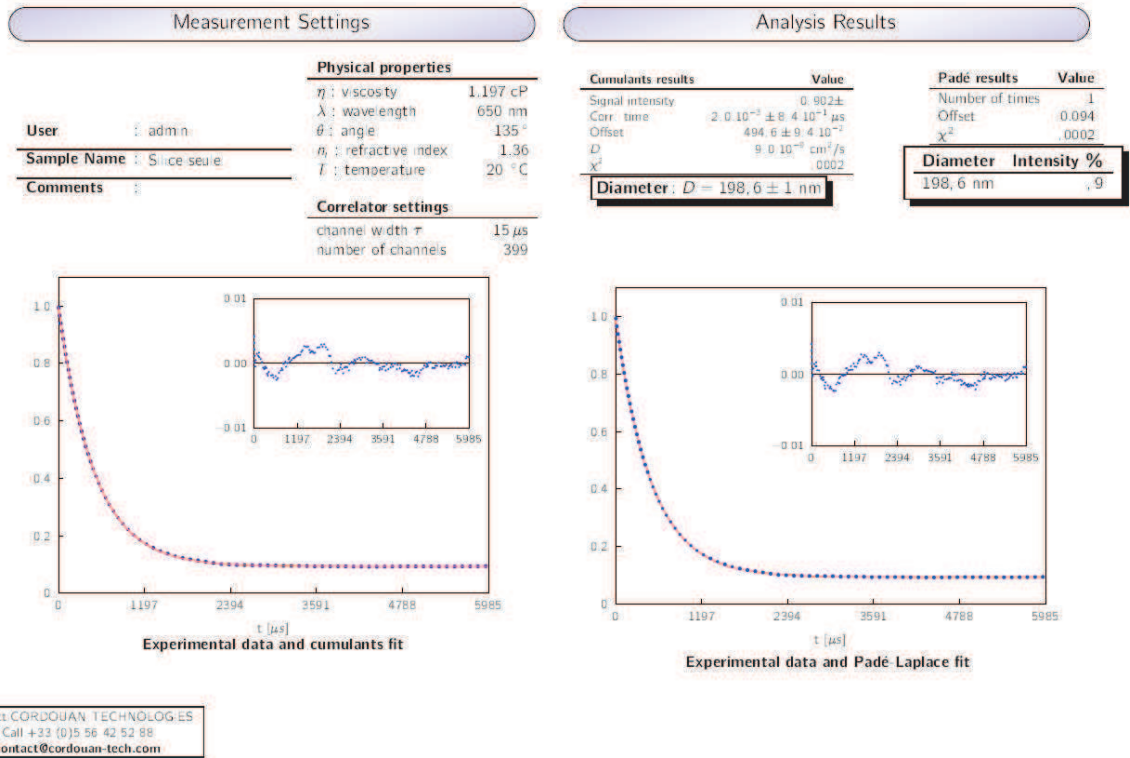
Mixture	Entry	M (g/mol)	Relative S/N abundance		
			LDI/Si NPs *	LDI/NanoSi **	MALDI/HCCA **
A	1	530,29	7,1%	1,5%	0,0%
	9	671,40	37,3%	47,4%	31,5%
	20	829,44	26,8%	30,5%	42,6%
	30	1074,57	7,9%	7,2%	7,7%
	39	1194,61	21,0%	13,4%	18,2%
B	2	566,27	1,0%	3,0%	0,7%
	14	720,36	14,5%	5,7%	1,8%
	21	836,39	14,1%	61,9%	48,2%
	31	1082,53	68,0%	19,4%	10,8%
	40	1243,58	2,3%	10,0%	38,5%
C	4	622,33	2,1%	2,5%	0,0%
	15	730,42	22,1%	0,3%	0,0%
	23	877,48	57,0%	20,8%	43,4%
	32	1102,58	7,5%	64,2%	21,4%
	41	1272,60	11,3%	12,1%	35,2%
D	5	633,36	56,3%	39,7%	27,6%
	16	748,37	8,2%	28,6%	25,8%
	24	952,49	1,0%	1,3%	1,0%
	35	1135,58	33,2%	17,2%	40,9%
	42	1323,61	1,3%	13,3%	4,7%
E	6	642,33	4,9%	1,5%	0,9%
	17	757,52	17,5%	0,8%	2,4%
	25	980,49	13,7%	50,7%	51,0%
	36	1135,65	59,3%	36,4%	13,5%
	44	1363,66	4,6%	10,6%	32,2%
F	7	650,34	27,3%	5,1%	4,0%
	18	777,35	3,4%	0,3%	0,1%
	27	1029,60	38,9%	52,9%	34,5%
	37	1168,61	15,7%	17,2%	34,0%
	46	1418,72	14,7%	24,6%	27,4%
G	8	670,34	48,0%	20,5%	3,9%
	19	808,38	4,1%	0,0%	0,2%
	28	1032,52	1,1%	5,6%	42,3%
	38	1179,60	13,2%	42,2%	34,5%
	47	1481,79	33,7%	31,7%	19,0%
Globa			21,0%	10,5%	5,3%
			15,3%	11,9%	8,8%
			21,8%	32,0%	37,6%
			29,3%	29,1%	23,3%
			12,7%	16,5%	25,0%

* Sample solvent condition : water containing 0.5 mM PFOS potassium salt

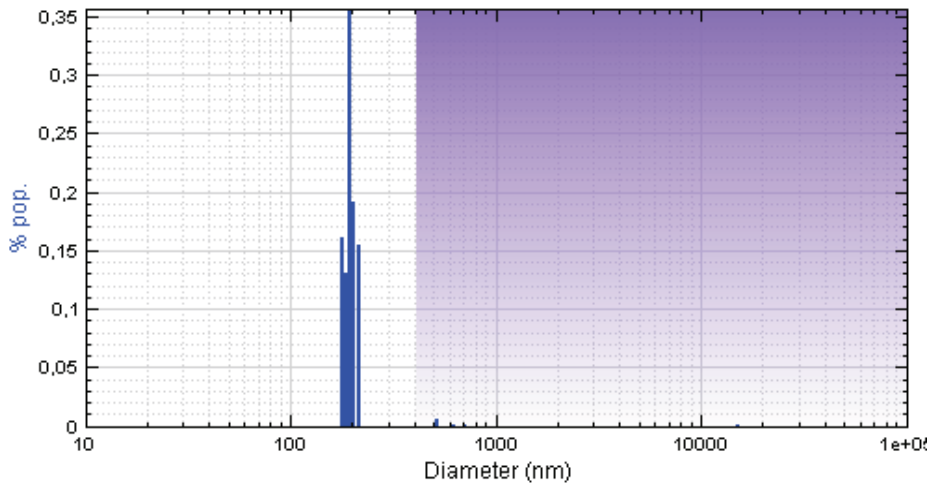
** Sample solvent conditions detailed in Reference 52

Not detected peptides
Peptides with low abundances (0 to 0.5%)

Figure S1. Size and distribution profile of SiO₂ NPs in Dynamic Light Scattering experiment.



Analysis Report from Reax version 2.4.39.0. Performed with ATX using FETricks. AMS and CMBright packages © Copyright 2005-2010



Size distribution profile of SiO₂ NPs in DLS experiment

Figure S2. SiO₂ NPs and silica gel suspensions at various shelf time storage.

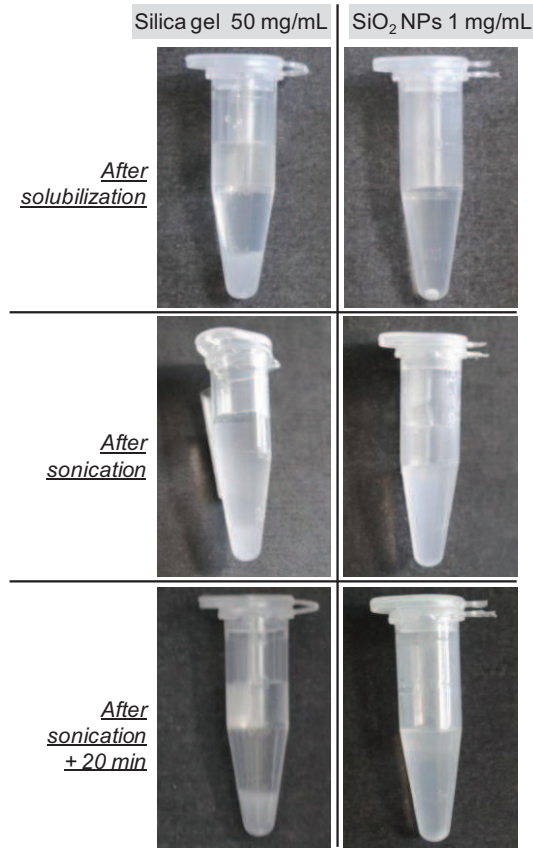


Figure S3. Mixture B analyzed from SiO₂ NPs deposit under 4 laser irradiation conditions.

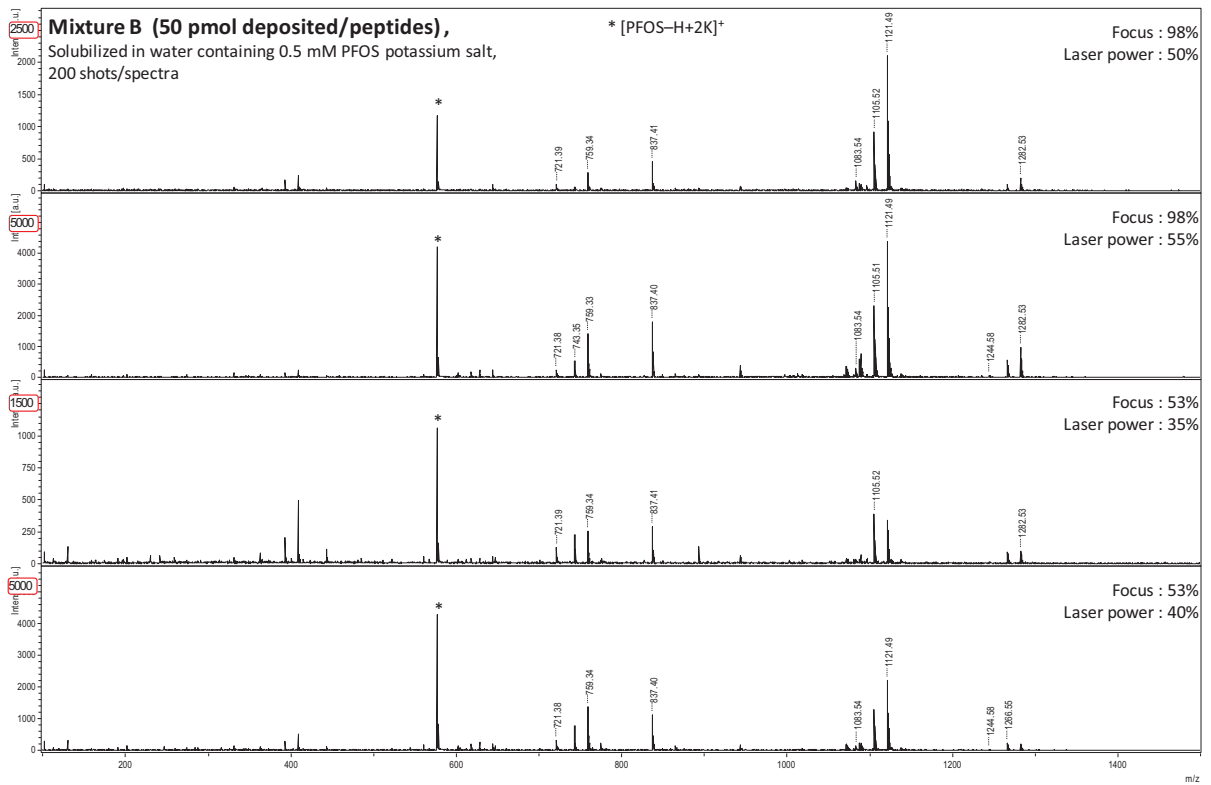


Figure S4. Images of the protonated WLIAGDR peptide ion (MH^+) (entry 20 in Table 1) a) from the MALDI steel plate and from SiO_2 NPs at a concentration of b) 5 mg/mL, c) 1 mg/mL, d) 0.5 mg/mL (recorded at $10^{-3}M$ from 1 mM ammonium citrate).

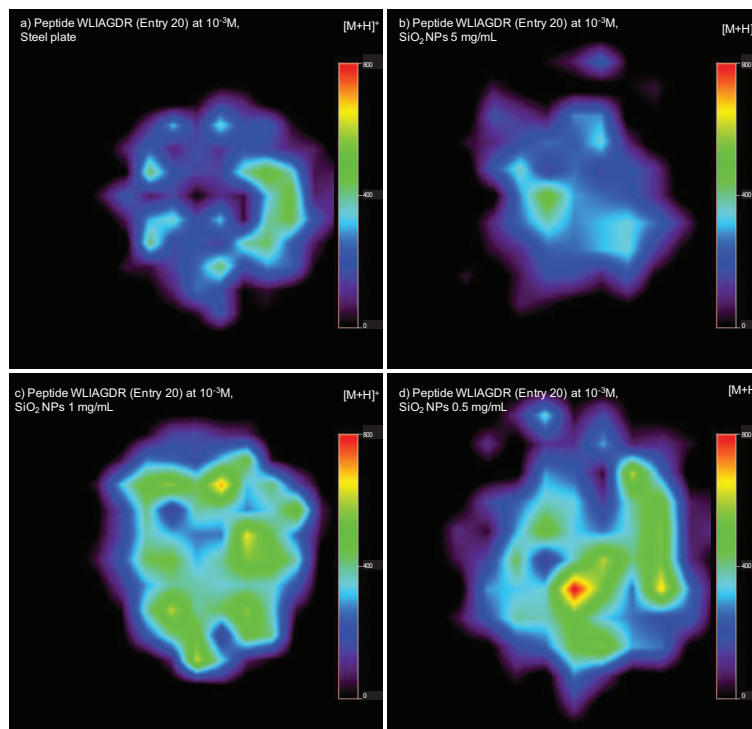
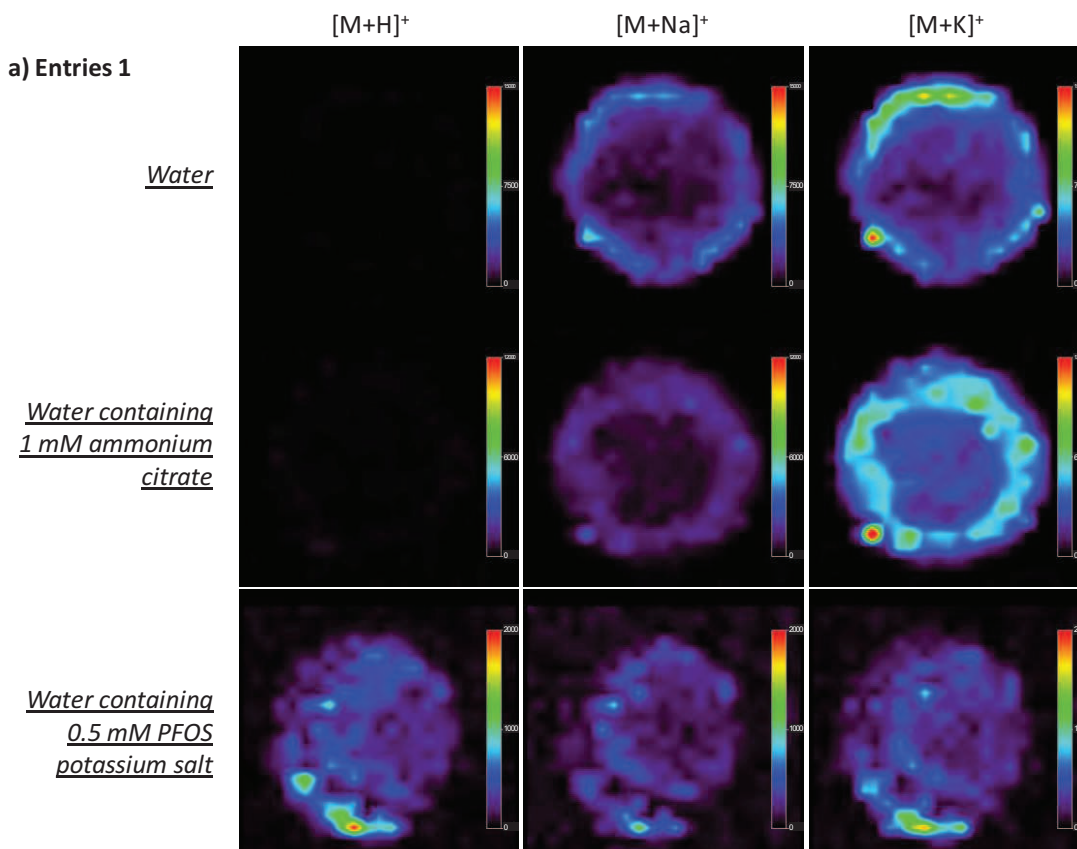


Figure S5. Images of two peptide ions ($MH^+/MNa^+/MK^+$) recorded at $10^{-3}M$ from SiO_2 NPs with 3 different solvent compositions : a) entry 1 in Table 1, b) entry 39 in Table 1.



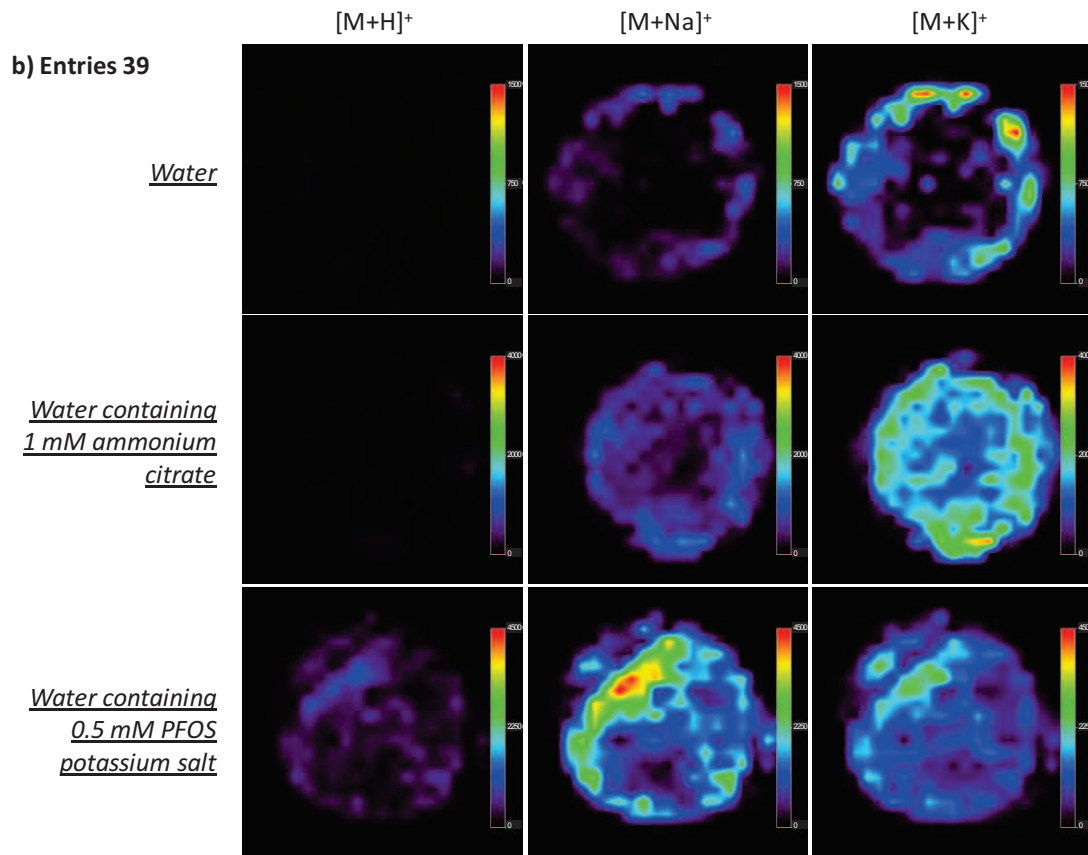
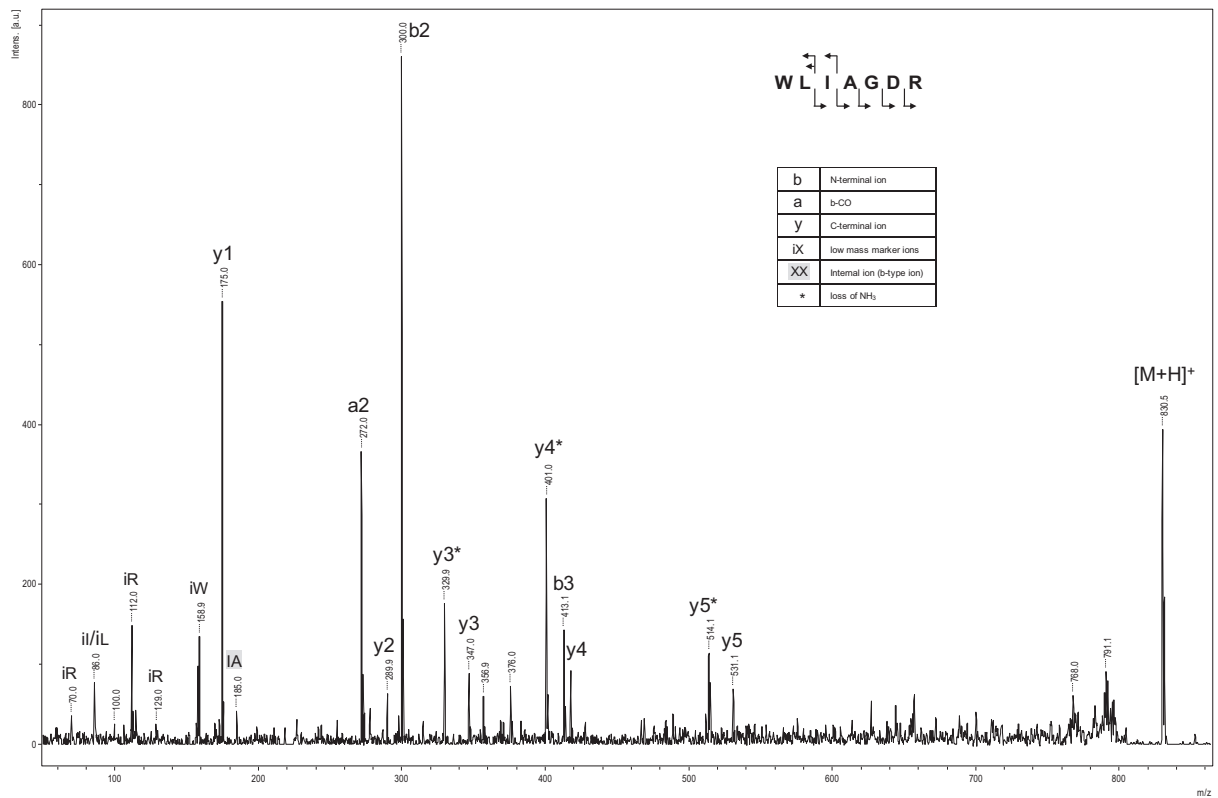


Figure S6. MS/MS spectrum of the protonated WLIAGDR peptide ion (MH^+) (entry 20 in Table 1) recorded at $10^{-5}M$ from 0.5 mM PFOS solution deposited onto SiO_2 NPs (1 mg/mL).



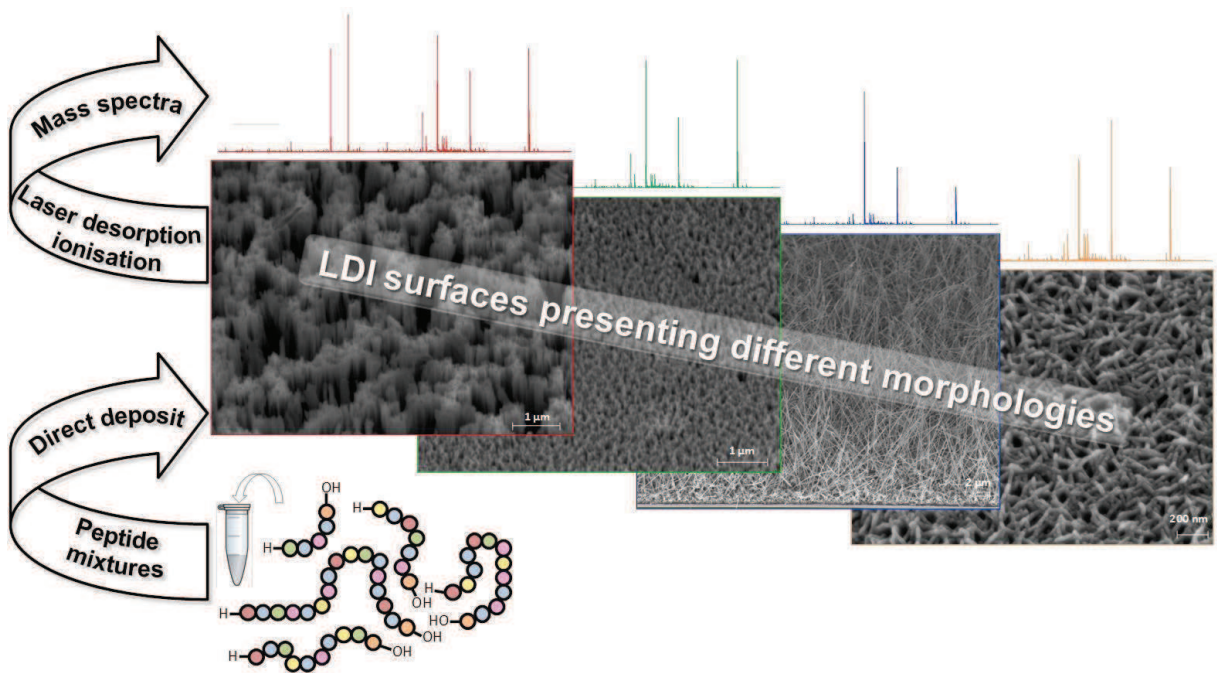
CHAPITRE III. ANALYSE PAR DESORPTION/IONISATION LASER SUR SUPPORTS INERTES DE TYPE SURFACE

Le potentiel des différents substrats LDI présentés sous la forme de surface a été évalué et comparé pour l'analyse de peptides. Pour ce faire, différents substrats synthétiques, nommés surfaces NanoSi et surface VLS en lien avec leur procédé d'obtention ont été étudiés. Ils ont été présentés dans la **PARTIE B (Matériels et Méthodes)**. La comparaison avec la cible commerciale NALDI™ a également été réalisée. Ces recherches sont présentées dans l'*Article 4: Investigation of silicon-based nanostructure morphology and chemical termination on LDI-MS performance*, publié dans le journal *Analytical Chemistry*.

La seconde publication présentée dans cette partie consiste en l'application de la surface présentant les meilleures dispositions à être utilisée comme substrat LDI. Cette surface correspond à la surface NanoSi B décrite dans l'article précédent et également présentée dans la **PARTIE B (Matériels et Méthodes)**. Ses performances ont été démontrées à travers la détection et la caractérisation de peptides synthétiques et de peptides issus de digestats tryptiques. Les résultats ont été discutés dans l'*Article 5: Laser desorption ionization mass spectrometry of protein tryptic digests on nanostructured silicon plates*, publié dans *Journal of Proteomics*.

III.1. Comparaison des performances LDI obtenues pour différentes surfaces

III.1.1. Article 4: Investigation of silicon-based nanostructure morphology and chemical termination on LDI-MS performance



Investigation of Silicon-Based Nanostructure Morphology and Chemical Termination on Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry Performance

Mathieu Dupré,[†] Christine Enjalbal,[†] Sonia Cantel,[†] Jean Martinez,[†] Nacéra Megouda,^{‡,§} Toufik Hadjersi,[§] Rabah Boukherroub,[‡] and Yannick Coffinier^{*,‡}

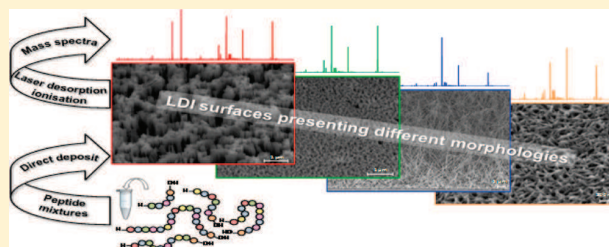
[†]Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247, Universités Montpellier 1 et 2, CNRS, Bâtiment Chimie (17), Université Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

[‡]Institut de Recherche Interdisciplinaire, USR CNRS 3078, Parc de la Haute Borne, 50 avenue de Halley, BP 70478, 59658 Villeneuve d'Ascq, France

[§]Unité de Développement de la Technologie du Silicium, 2 Bd. Frantz Fanon, B.P. 140 Alger-7 merveilles, Alger, Algérie

Supporting Information

ABSTRACT: We have evaluated the laser desorption ionization mass spectrometry (LDI-MS) performance of six nanostructured silicon surfaces of different morphologies and chemical functionalizations. The substrates have been synthesized either by metal-assisted etching method or by vapor–liquid–solid (VLS) growth technique. In addition to the commercial nanostructured silicon-based surface (NALDI) target plates, serving as reference, the homemade surfaces have been evaluated in mass spectrometry experiments conducted with peptide solutions mimicking tryptic digests. LDI surfaces synthesized by metal-assisted etching method were the most efficient in terms of signal intensities and number of detected peptides. The surface providing the best LDI-MS performance was composed of two nanostructured layers. Interestingly, we also observed a significant influence of the type of organic coating (hydrocarbon vs fluorocarbon) on peptide ionization discrimination.



Invention of matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) for high molecular weight compound analyses by Karas and Hillenkamp¹ was concomitant with the development of a similar mass spectrometry method by Tanaka et al.,² which relies on metal nanoparticles mixed with glycerol instead of organic UV-absorbing molecules, to promote ion formation. This technique has been considered as the forerunner of laser desorption ionization (LDI) methods that are now based on the single use of inert substrates. The application of micro- and nanostructured materials as inorganic matrix was proposed to overcome problems encountered with classical MALDI analysis. Particularly, cocrystallization of the sample with an appropriate organic matrix is not required, and subsequently, intense matrix peaks responsible for strong background in the low-mass range of the spectra hampering sensitive detection of small molecules are suppressed.^{3–5} One of the most significant developments in this area has certainly been desorption/ionization on porous silicon (DIOS), presented by Wei et al.⁶ At least for certain classes of analytes, DIOS and related techniques, the so-called surface-assisted laser desorption/ionization (SALDI) amounted or even exceeded the sensitivity of conventional MALDI-MS and constituted a promising strategy for analyzing compounds in the low-mass range.⁷ Since such organic matrix-free LDI methods afford

several advantages, such as easy sample preparation, low background level, high salt tolerance, and fast data collection, many laboratories have investigated this strategy as an innovative analytical tool in chemistry and biology. Although a buoyant literature is available on the development of a vast array of LDI-promoting substrates presenting very different physicochemical properties, only a very few ready-to-use LDI target plates are present on the market. Among them, DIOS-chips, which are based on chemically modified porous silicon (MassPREP-DIOS target from Waters), and more recently nonporous germanium thin films (QuickMass from Shimadzu) and nanostructured silicon-based surfaces (NALDI from Bruker Daltonics) have been made available to the scientific community.

To find alternative methods to commercial LDI-MS chips, we have designed and prepared various nanostructured interfaces keeping particular attention to surface morphologies and chemical functionalizations. Indeed, it was reported that pore size and depth, nanostructure sizes, surface porosity, and roughness could affect LDI efficiencies.^{6,8–14} Although

Received: July 25, 2012

Accepted: November 18, 2012

Published: November 19, 2012

elucidation of ion production is possibly the most controversial and elusive area of LDI mass spectrometry, the mechanism can be subdivided into absorption, retention, radiation coupling and transfer, desorption, and ionization reactions. To perform LDI-MS analyses, the interfaces should primarily be able to absorb photons from the pulsed laser. Then, thanks to a thermal mechanism relaxation via nonradiative recombination (phonons) of electrons and holes, desorption/ionization of analytes can occur. The nature of the interaction between a material and a pulsed laser is largely dependent on the energy band gap of the material and the energy of the incident photons. When the photon energy is greater than the band gap, then single-photon absorption dominates and an electron in the valence band is promoted to the conduction band leaving a hole. Optical properties (UV absorption, antireflective properties) as well as thermal conductivity are very important features to take into account for the design and synthesis of efficient LDI surfaces displaying high surface area/volume ratios. Establishing a valid correlation between surface morphology with the LDI-MS interface performance still remains a challenge. Despite several studies reported on that topic, the LDI-MS experiments are usually achieved for a limited number of pure model molecules (peptides, amino acids, thermometer molecules, ...), some of them being known to be easy to detect.^{11,13–21} To the best of our knowledge, no study tried to compare surfaces presenting various physical and chemical properties to complex peptide samples, the ones found in proteomic analyses.

Pursuing our goal to achieve very efficient LDI analyses from low-cost interfaces, we compared five homemade nanostructured surfaces to the commercial silicon-based surface (NALDI target), serving as a reference, for the sensitive and robust detection of a vast array of tryptic peptides designed to be sufficiently representative of sequence diversity encountered in proteomic studies. On the basis of previous studies carried out in the laboratory,^{22,23} we developed silicon-based surfaces for several reasons. First of all, in contrast to other materials, silicon and silica were found particularly suitable for peptide detection whatever the inert material conditioning, i.e., amorphous powders,¹⁰ particles,²⁴ and nanostructured surfaces.²² For the latter, various completely controlled morphologies were available according to well-mastered synthetic procedures, either by metal-assisted etching method or by vapor–liquid–solid (VLS) growth. Besides, such interfaces have also been implemented with digital microfluidic systems integrated in lab-on-chip configuration for the specific distribution and localization of analytes, making it very valuable for the analysis of biological samples.²⁵ At last, a commercial silicon-based surface (NALDI target) was available to compare our synthetic interfaces to existing ready-to-use LDI-MS protocols. Results gathered from sensitivity and repeatability experiments carried out on peptide mixtures allowed us to provide insights into the value of each studied interface. Particular attention was devoted not only to the limit of detection [signal-to-noise ratio (S/N), resolution] but also to the detection robustness with the number of identified peptides as a probe of ionization discrimination that may be deleterious in the case of peptide mass fingerprinting in proteomics.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals and Reagents. All solvents were of analytical grade. Methanol was purchased from Fisher, and acetonitrile was from Carlo Erba. The deionized water used in all the experiments was obtained using a Milli-Q system (Millipore,

Milford, U.S.A.). A peptide calibration standard kit was purchased from Bruker Daltonics. Regarding the preparation of the silicon nanostructures, all cleaning reagents such as acetone, isopropyl alcohol, ammonium fluoride (NH₄F, 40%, pH 8), sulfuric acid (H₂SO₄, 96%), and hydrogen peroxide (H₂O₂, 30%) were clean room grade (VLSI) and purchased from Carlo Erba. All other chemicals were reagent grade or higher and were used as received unless otherwise specified. Nitric acid (HNO₃, 65%) and hydrochloric acid (HCl, 37%) were purchased from Merck. Silver nitrate (AgNO₃, 0.1 N), hexane, and dichloromethane (CH₂Cl₂) were obtained from Sigma-Aldrich. Perfluorodecyltrichlorosilane (PFTS) and octadecyltrichlorosilane (OTS) were purchased from ABCR.

Synthesis of Nanostructured Silicon Surfaces. Preparation of Nanostructured Silicon Substrates (NanoSi): Surfaces A and B. The nanostructured silicon surfaces were synthesized by chemical etching of p-type ⟨100⟩ crystalline silicon wafer (with a resistivity of 0.009–0.010 Ω·cm, Siltronix, Archamps, France) either in HF/AgNO₃ or in NH₄F/HNO₃/AgNO₃ aqueous solutions. The silicon surface was first degreased in acetone and isopropyl alcohol, rinsed with Milli-Q water, and then cleaned in a piranha solution (3:1 concentrated H₂SO₄/30% H₂O₂) for 20 min at 80 °C, followed by copious rinsing with Milli-Q water. The NanoSi surface noted as surface A was obtained by chemical etching of the clean substrate in HF/AgNO₃ (5.8 M/0.02 M) solution at 55 °C for 10 min, whereas the synthesis of the NanoSi surface noted as surface B was performed in NH₄F/HNO₃/AgNO₃ (6.00 M/5.73 M/0.02 M) solution at room temperature for 10 min. The resulting surfaces were rinsed copiously with deionized water and immersed in HCl/HNO₃/H₂O (1/1/1) aqueous solution overnight at room temperature, to remove the silver nanoparticles and dendrites deposited on the surface during the chemical etching, and revealed the silicon nanostructures.

Silicon Nanowires (SiNWs) Synthesis via Vapor–Liquid–Solid (VLS) Mechanism: Surface C. Surface C was prepared using the VLS growth mechanism as described previously.^{26–29} The fundamental process is based on chemical decomposition of silane gas (SiH₄) catalyzed by gold nanoparticles at high temperatures (440–540 °C). Single-side polished silicon (100) oriented p-type wafers (Siltronix, Archamps, France) (boron-doped, 0.001–0.0009 Ω·cm resistivity) were used as substrates. As described above, the silicon surface was first degreased in acetone and isopropyl alcohol, rinsed with Milli-Q water, and then cleaned in a piranha solution (3:1 concentrated H₂SO₄/30% H₂O₂) for 20 min at 80 °C followed by copious rinsing with Milli-Q water. A 4 nm gold thin layer was thermally evaporated on the Si clean surface. Then, the metalized substrate was placed in a quartz tube, which was heated in a tube furnace at 500 °C. Gold nanoparticles with a high size distribution were obtained as a result of metal dewetting on the surface. Exposition of the gold-coated surface to silane gas at certain pressure, gas flow, time, and temperature led to SiNWs growth.

Safety Considerations. The mixture H₂SO₄/H₂O₂ (piranha) solution is a strong oxidant. It reacts violently with organic materials. It can cause severe skin burns. It must be handled with extreme care in a well-ventilated fume hood while wearing appropriate chemical safety protection. HF is a hazardous acid, which can result in serious tissue damage if burns were not appropriately treated. Etching of silicon should be performed in

a well-ventilated fume hood with appropriate safety considerations: face shield and double-layered nitrile gloves.

Chemical Functionalization. The NanoSi and SiNWs surfaces were treated by UV/ozone (UV_O Cleaner, Jelight Company, Inc., 4 mW/cm² at 220 nm) for 20 min to remove any organic contaminant from the surface and to generate surface hydroxyl groups. The NanoSi/SiNWs surfaces were then immersed into a 10⁻³ M solution of OTS in hexane for 16 h at room temperature, in a dried nitrogen-purged glovebox. The resulting surfaces were rinsed with CH₂Cl₂, isopropyl alcohol, and dried under a gentle stream of nitrogen. Concerning the PFTS coating, the NanoSi surfaces were reacted with a 10⁻³ M PFTS solution in hexane for 5 h at room temperature in dry nitrogen-purged glovebox. The resulting surfaces were rinsed with CH₂Cl₂, isopropyl alcohol, and dried under a gentle stream of nitrogen.

Surface Characterization. Scanning Electron Microscopy (SEM). SEM images were obtained using an electron microscope ULTRA 55 (Zeiss, France) equipped with a thermal field emission emitter and three different detectors (EsB detector with filter grid, high-efficiency In-lens SE detector and Everhart–Thornley secondary electron detector).

Contact Angle Measurements. Static contact angles were measured using deionized water and a mixture of water and acetonitrile (80/20: v/v) in which peptides were dissolved. We used a remote computer-controlled goniometer system (DSA 100, Kruss GmbH, Germany) for measuring the contact angles. The accuracy was ±2°. All measurements were made at room temperature in ambient atmosphere.

Reflectance Measurements. The reflectance measurements were performed using a UV–vis spectrophotometer (Perkin-Elmer Lambda UV/vis 950 spectrophotometer) equipped with an integrating sphere. The scans were measured for wavelengths ranging from 200 to 800 nm at an incident light angle of 45° and at different locations on each scanned surface.

Atomic Force Microscopy (AFM). The samples were imaged using a Dimension 3100 model AFM (Veeco) equipped with a Nanoscope IV controller (Digital Instruments) under ambient conditions. Single-beam silicon cantilevers (AFM-TM Arrow, Nanoworld) with spring constants of ~42 N/m and resonant frequencies of ~250 kHz were used. All AFM images were acquired in tapping mode.

Peptide Preparation. Peptides were synthesized on the IBMM peptide synthesis platform using the conventional methodology of solid-phase peptide synthesis using Fmoc chemistry and purified by preparative liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) (Autopurification system, Waters Milford, CA). Peptides were all prepared as C-terminal carboxylic acids, and their sequences were designed to mimic proteolytic digests performed with trypsin.²² Peptides were dissolved in a solution of acetonitrile/deionized water solution (30/70: v/v) at a 10⁻³ M concentration. Equimolar peptide mixtures were prepared from these stock solutions by dilution in an acetonitrile/deionized water solution containing 1 mM ammonium citrate in order to have final peptide concentrations of 10⁻⁵, 10⁻⁶, and 10⁻⁷ M. The amount of acetonitrile used for sample dilution was adjusted according to the surface hydrophobic character [from 10% to 40% (v/v)].

LDI-MS Analyses. Mass spectrometry analyses were performed on instruments of the IBMM instrumentation platform, Laboratoire de Mesures Physiques of University Montpellier 2. MALDI mass spectra were recorded on an Ultraflex III TOF/TOF instrument (Bruker Daltonics,

Wisssembourg, France) equipped with LIFT capability. A pulsed Nd:YAG laser at a wavelength of 355 nm (98% focus) was operated at a frequency of 100 Hz (MS data) or 200 Hz (MS/MS experiments) with a delayed extraction time of 30 ns. The source was operated in the positive mode. Data were acquired with the Flex Control software and processed with the Flex Analysis software. A volume of 0.5 μL of the peptide solution was deposited according to the dried droplet procedure onto the LDI interface that has been fixed at the corners with a conductive tape into a cavity of a modified MALDI target plate. After evaporation of the solvent, such MALDI target plate was introduced into the mass spectrometer ion source. External calibration was performed with commercial peptide mixture (calibration peptide standard 1 or 2, Bruker Daltonics, Wisssembourg, France).

RESULTS AND DISCUSSION

LDI Interfaces. The different nanostructured silicon surfaces investigated in this study were prepared by either crystalline silicon chemical etching or by chemical vapor deposition (CVD) according to VLS growth process, both allowing wafer-scale synthesis. The NALDI commercial interface issued from VLS growth has served as reference for assessing the LDI-MS performances of our interfaces.

Chemical etching displays several advantages, as it takes place at relatively low temperature and does not require any specific equipment. Varying time, temperature, and reagent concentrations was investigated to produce silicon surfaces with different nanostructures length, diameter, and overall porosity. In contrast, the VLS growth requires a CVD furnace to work at higher temperature. It allows perfect control of silicon nanowires morphology, and the growth can be performed on various substrates, including silicon, glass, ceramics, and metals. The diameter of the nanowires, determined by the diameter of the catalyst particle, their width, length, as well as orientation, which depend on the duration, pressure, and temperature of the VLS process,^{30,31} were evaluated to obtain uniform-sized nanowires. Figures S1 and S2 in the Supporting Information exhibit SEM images of some of the prepared surfaces.

Both preparation techniques gave rise to reproducible surfaces in terms of general structural properties, rather cheap (price estimated to be 4.5–10 euros/cm²) and easy to fabricate, especially for the surfaces synthesized by electroless etching. They are also convenient to package in small ready-to-use chips on demand (for instance 1 × 1 cm², 2 × 2 cm² for experiments only requiring few deposits). We have observed that such packaging into small chips limits the shelf storage and thus the exposition to air avoiding surface contamination. Finally, we expect that the scaling-up of the synthesis of nanostructured silicon surfaces is possible even if we have not currently undertaken specific experiments to demonstrate such feasibility.

Among the different prepared surfaces which were probed as LDI substrates by analyzing a standard peptide calibration mixture (unpublished data) (see Figure S3 in the Supporting Information), surfaces A and B (chemical etching) and surface C (VLS process) were selected. Taking into account that the silicon used for the fabrication of all surfaces was highly conductive [Si (100), boron-doped, 0.001–0.0009 Ω·cm resistivity], these thin chips (0.38 mm height) were attached by electrically conductive adhesive tape onto the conventional MALDI plate. The risk of arcing and subsequent source damage was thus limited. This approach was suitable with any kind of MALDI mass spectrometer instrument provided that

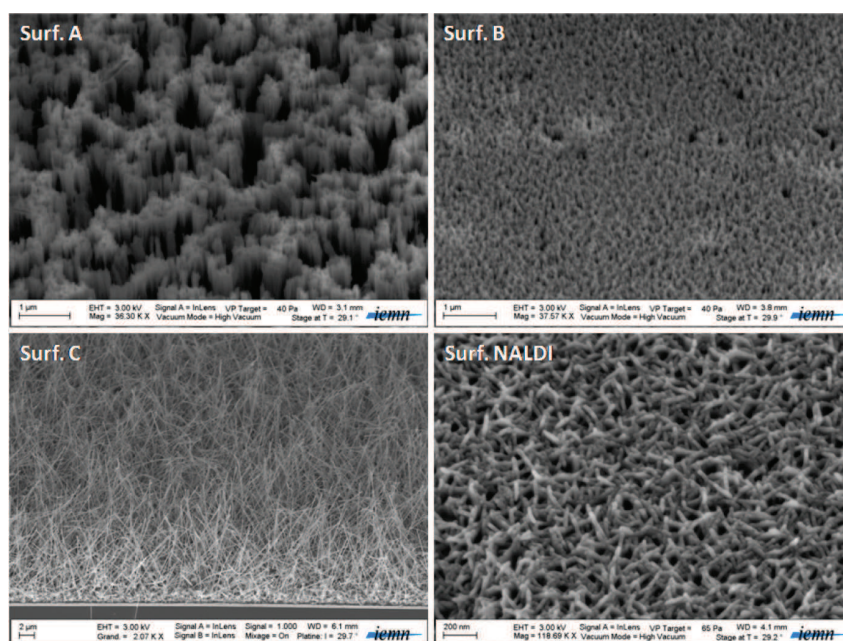


Figure 1. SEM images of surfaces A, B, C, and NALDI.

proper calibration was undertaken. To achieve more accurate mass measurement, the strategy involving chips inserted in cavities of a modified MALDI target plate was preferred. Such protocol is applied with the NALDI target which had to be purchased together with the appropriate target adaptor designed specifically for Bruker mass spectrometers.

Surface Morphology. The surface morphologies of the prepared interfaces together with the commercial NALDI surface are displayed in Figure 1. As seen on these SEM images, surface A consisted of an opened-nanostructured silicon layer with nanostructure length of about $1.5\ \mu\text{m}$. The nanostructure diameter ranges between 20 and 100 nm, and pore sizes vary from 300 to 1400 nm. Surface B comprised two nanostructured layers, the lower one with a height of roughly 650 nm with a spongelike structure (mesoporous), covered by a top layer presenting a nanostructured film of 220 nm height, structures widths ranging from 20 to 60 nm and pore sizes varying from 20 to 100 nm, as already described.²² Regarding the nanowire substrates prepared using the VLS growth mechanism, high pressures ensured growth of straight nanowires with a narrow orientation distribution, which varied from about 30° to 90° . Such surface C morphology comprised a mixture of short entangled and straight nanowires of about $12\ \mu\text{m}$ in length. Some of them presented a “hook” shape on their top end. The diameters of these nanowires were in the range of 50–100 nm. The reference NALDI substrate, fabricated by the VLS mechanism, was composed of densely packed silicon nanostructures, with diameters of about 20 nm and length ranging from 100 to 500 nm.

Surface Properties. The antireflective properties of all nanostructured surfaces have been evaluated. The reflectance spectra of bare silicon as well as surfaces A, B, C, and NALDI are displayed in Figure 2. The bare silicon showed reflectivity values between 65% and 45% in the 200–800 nm wavelength range. Interestingly, all nanostructured surfaces exhibited better antireflective properties compared to bare silicon. Indeed, all nanostructured surfaces displayed reflectivity below 3% from

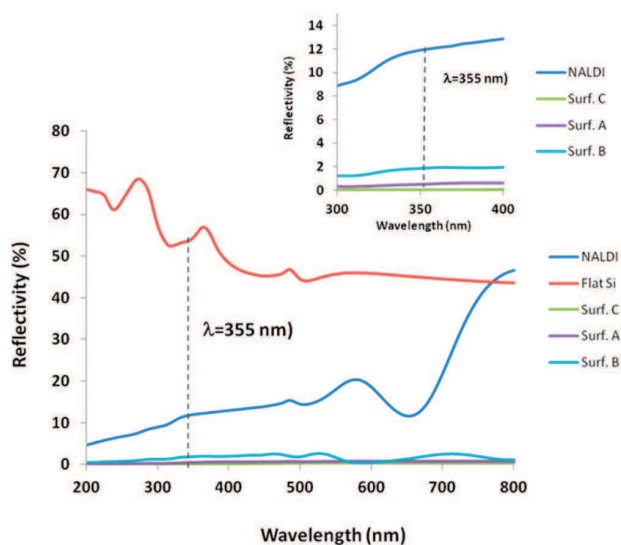


Figure 2. Reflectivity spectra of surfaces A, B, C, NALDI, and bare silicon (flat Si). The inset displays the reflectivity spectra in the 300–400 nm range.

200 to 800 nm, except for the NALDI surface, which showed reflectivity values from 5% to 46.5% between 200 and 800 nm. At 355 nm, corresponding to the wavelength of the laser used for LDI-MS analyses, the reflectance values of the nanostructured surfaces were 0.5%, 1.9%, 0.06%, 11.9%, and 55% for surfaces A, B, C, NALDI, and flat silicon wafer, respectively (Figure 2). Difference of antireflective properties for all nanostructured surfaces were most likely due to the nanostructured layer thickness. The higher the thickness was, the higher the antireflective property was, leading to higher photon absorption.³²

The prepared surfaces A, B, and C were superhydrophilic with a static contact angle close to 0° exclusively due to the presence of a native oxide shell layer. A liquid droplet deposited

Table 1. Mass Spectrometry Results Obtained for the Analyses of the Seven Peptide Mixtures^a

LDI surfaces / Sample concentrations	Surface A - OTS			Surface B - OTS			Surface C - OTS			Surface A - PFTS			Surface B - PFTS			NALDI™			
	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	
	5 pmol	500 fmol	50 fmol	5 pmol	500 fmol	50 fmol	5 pmol	500 fmol	50 fmol	5 pmol	500 fmol	50 fmol	5 pmol	500 fmol	50 fmol	5 pmol	500 fmol	50 fmol	
Mixtures / peptides																			
Relative responses of peptide mixtures (each containing 5 equimolar peptides)	M 1	57.3%	66.5%	48.1%	61.8%	100.0%	100.0%	35.7%	19.6%	32.0%	24.1%	44.4%	43.2%	36.2%	8.2%	11.6%	51.0%	7.0%	4.4%
	M 2	10.1%	6.5%	6.1%	16.3%	31.3%	17.3%	5.3%	3.0%	0.0%	1.4%	3.3%	0.0%	47.6%	17.0%	0.0%	13.2%	0.9%	0.0%
	M 3	51.9%	52.0%	0.6%	30.5%	16.7%	83.5%	100.0%	100.0%	100.0%	16.4%	20.9%	5.6%	28.8%	20.6%	2.5%	100.0%	18.9%	7.3%
	M 4	37.6%	36.9%	28.6%	77.9%	56.2%	33.4%	10.3%	12.8%	14.4%	14.2%	19.7%	11.8%	67.3%	11.2%	7.0%	45.5%	8.8%	12.4%
	M 5	52.6%	44.2%	57.3%	100.0%	83.8%	31.2%	27.8%	16.0%	20.0%	100.0%	38.2%	61.5%	88.8%	23.1%	6.6%	20.1%	7.3%	3.4%
	M 6	100.0%	100.0%	100.0%	98.3%	71.9%	81.5%	61.6%	36.2%	35.8%	67.1%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	54.4%	100.0%	100.0%
	M 7	7.0%	7.6%	32.8%	10.5%	51.1%	40.9%	4.6%	9.0%	7.0%	13.1%	17.6%	40.9%	52.5%	12.5%	24.3%	24.1%	2.6%	18.5%
Peptide relative responses according to their m/z values	m/z range																		
	530-670	16.3%	43.4%	31.5%	30.3%	37.9%	45.7%	33.0%	12.8%	15.0%	14.7%	32.7%	23.9%	17.8%	6.9%	6.0%	18.7%	7.9%	3.9%
	671-808	23.1%	20.9%	7.1%	21.7%	23.0%	34.9%	17.1%	27.1%	20.3%	24.2%	18.3%	9.2%	8.1%	2.4%	46.1%	5.1%	5.0%	2.8%
	829-1032	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	85.5%	61.8%	98.3%	100.0%	95.5%	100.0%	88.3%	97.9%	57.1%	63.2%	51.6%
	1074-1179	56.5%	37.9%	42.2%	34.4%	38.9%	47.1%	90.6%	100.0%	100.0%	100.0%	42.5%	100.0%	83.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	1194-1481	56.9%	28.0%	28.7%	23.2%	11.6%	14.5%	35.2%	36.6%	28.1%	69.5%	26.1%	22.0%	77.7%	49.4%	24.4%	15.2%	49.8%	58.3%
Global results	Cumulated S/N values of peptide ions	16075	12091	8418	16587	13041	3238	8838	4901	1543	7802	15077	3067	5159	12624	7481	5612	13252	8200
	Number of detected	31	27	23	35	34	20	32	25	17	26	24	19	24	22	14	25	23	19

^aDetailed data are presented in Table S1 (Supporting Information).

on the surface tends to wet completely the chip, which limited LDI-MS analysis performances. To control the wetting properties of the surface and to limit droplet spreading, all interfaces were chemically functionalized with OTS. The resulting surfaces displayed superhydrophobic behavior with a contact angle over 150° even for a water/acetonitrile droplet [0.5 μL, 80/20 (v/v)]. Droplets of analytes deposited on these chips are then in a Cassie–Baxter state, i.e., droplets sit on the air pockets trapped inside the nanostructured layer and do not penetrate deep inside.³³ As a consequence, the droplets tend to roll off the surface making sample deposition difficult. To overcome this limitation, the OTS-terminated surfaces were subsequently subjected to UV/ozone treatment to reach a final contact angle of about 120–130° for water and 90–100° for water/acetonitrile droplet [0.5 μL, 80/20 (v/v)], depending of surface morphology. In that case, droplets of analytes were now in a Wenzel state (wetted state) (i.e., impaled into the nanostructured layer) presenting lower static contact angle on a restricted area.³⁴ This property had an important practical implication because some nonpolar peptides or other molecules (i.e., phospholipids, ...) did not dissolve in neat water. Sample solution constituted of a high proportion of polar organic solvent can therefore be applied directly onto the surface, leading to droplet confinement and subsequent enrichment of analyte molecules onto a small area contributing to better LDI performance. It has to be noted that the NALDI surface, which was already covered by a hydrophobic layer, displayed a static contact angle of 116° for a water/acetonitrile droplet [0.5 μL, 80/20 (v/v)] and, therefore, was used as received without any further treatment.

LDI Performances of OTS-Functionalized Surfaces.

From these three OTS-terminated surfaces, we have performed LDI-MS analyses of seven peptide mixtures, numbered mix 1–7. Each of them gathered five different peptides present in equimolar concentrations with molecular weights ranging from 530.3 to 1481.8 (see Table S1 in the Supporting Information). The C-terminal amino acid residue of the 35 peptides was either arginine or lysine, to mimic tryptic peptides. All amino acids were chosen in the designed sequences to ensure a global residue composition for the synthetic model peptide collection similar to the amino acid occurrence in natural proteins.²² The peptide mixtures were dissolved in aqueous acetonitrile containing ammonium citrate. Indeed, in previous studies we showed that 1 mM ammonium citrate provided the best

analytical results and so was systematically added to peptide solutions.^{22,35,36} For each peptide, S/N of all produced ions corresponding to protonated and cationized species ($[M + H]^+$, $[M + Na]^+$, $[M + K]^+$) were cumulated to establish the overall signal intensity. From there, we determined the relative abundance for all peptides and then compared the LDI-MS performances for all tested surfaces.

Comparisons of the LDI-MS performances for all tested surfaces were achieved in terms of laser fluence, total cumulated S/N ratio, and sample coverage, i.e., number of nondetected peptides due to ionization discrimination. All mass spectrometry results are summarized in Table 1. First of all, similar laser fluences were used for all surfaces with rather low values (20–30% of the photon beam), suggesting that all interfaces were well-suited for efficient laser desorption/ionization processes. As depicted in Table 1, we observed that the ion abundances decreased with the deposited peptide quantities from 10⁻⁵ to 10⁻⁷ M for the three prepared OTS-terminated surfaces. However, by comparing the total S/N cumulated for all peptide ions for each interface, we found the nanostructured silicon chips (surfaces A and B) to give better results than nanowires (surface C). The former displayed higher cumulated S/N ratios, around 16 000 at 10⁻⁵ M, compared to the latter presenting an average response of 9000 at the same concentration. The same behavior was encountered when the amount of deposited peptides was reduced. Although a small decrease in signal detection efficiency of about 20% from 10⁻⁵ to 10⁻⁶ M for surfaces A and B, the response of surface C was more significantly affected upon such dilution, overall signal intensities being reduced by a factor 2. Besides, surface A still exhibited abundant ions on the MS spectra recorded at 10⁻⁷ M with cumulated S/N ratios of 8000. Regarding peptide coverage, the three OTS-terminated surfaces did not produce the same discrimination for ion detection (see Table S2 in the Supporting Information). Although surfaces A and C gave similar numbers of detected peptides (31 and 32 over 35 sequences at 10⁻⁵ M, dropping to 27 and 25 at 10⁻⁶ M, respectively), surface B exhibited a very homogeneous detection with all peptides evidenced at 10⁻⁵ M, and only one peptide was not detected at 10⁻⁶ M concentration. It should be noticed that, at low concentrations (such as 10⁻⁷ M), some peptides were reluctant to be desorbed and ionized in LDI conditions when present as part of mixtures even though they provided very good data when analyzed in pure form.²²

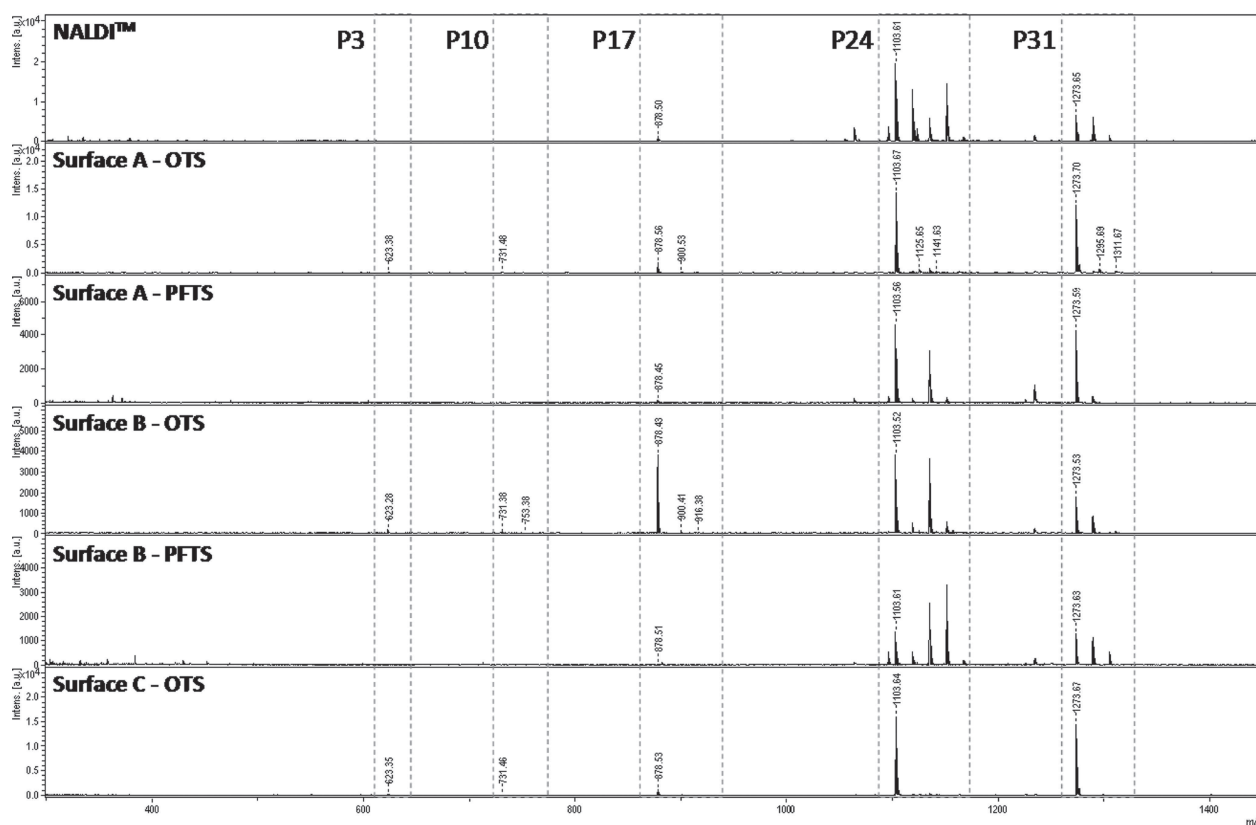


Figure 3. MS spectra of peptide mixture M3 at 10^{-5} M (5 pmol) deposited onto all tested LDI surfaces.

The overall performance in terms of peptide detection at 10^{-7} M thus fell down to 23, 20, and 17 over 35 for surfaces A, B, and C, respectively. Another critical issue was to appreciate the respective detection of the same samples in LDI-MS and MALDI-MS analyses. We have previously shown that protein digests behaved similarly as synthetic peptide mixtures tested either in LDI-MS or MALDI-MS.²² To illustrate this point, mass spectra of cytochrome *c* tryptic digest deposited at 500 fmol on surfaces A, B, C and from α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) are presented in the Supporting Information (Figure S4). As expected, the low-mass peptides were better detected on OTS-terminated surfaces, whereas longer chains were better suited to conventional MALDI-HCCA experiments.

From these results, we could clearly conclude that the best surfaces in terms of LDI-MS performances were surfaces A and B for all tested peptide mixtures. Surface C prepared by the VLS process was not as efficient as those. A clear influence of the surface architecture can thus be underlined when comparing surface morphologies obtained either by chemical etching leading to silicon nanostructure-like morphologies (surfaces A and B) or by growth, presenting nanowire-like morphologies (surface C).

LDI Performances of PFTS-Functionalized Surfaces. It is well-known that hydrophobic coating on LDI interfaces (1) allows sample deposition to be made easier, allowing the formation of uniform spots of analytes and an increase of sensitivity detection and (2) improves surface performance stability over time.^{6,37} Different types of hydrophobic molecules exist, mostly composed either by alkyl, fluoroalkyl, or fluorobenzyl groups. Fluorinated surfaces present lower surface

tensions than alkyl-modified ones^{38,39} and, thus, display a better oleophobic behavior. Such surfaces are able to repel liquids with lower surface tensions and consequently are very useful when analytes are poorly water-soluble and when organic solvents are needed.^{30,40} Indeed, since they repel low surface tension liquids, it is still possible to deposit a droplet and get uniform spots of analytes on a restricted area even when a higher amount of organic solvent is used. For all these reasons, fluorinated coatings are often used for developing LDI interfaces described in the literature or commercially available such as NALDI.^{7,16,21,37,41–44} We decided to assess the influence of such hydrophobic coatings on nanostructured surfaces. We modified the best chips as determined previously (surfaces A and B) by PFTS. As already described above for OTS-terminated surfaces, the droplets of liquid, containing the analytes, tend to roll off the surface, making sample deposition difficult. In that case, the PFTS-terminated surfaces were also subjected to UV/ozone treatment to reach a final contact angle of 120 – 130° for water and 95 – 110° for water/acetonitrile droplet [$0.5 \mu\text{L}$, $80/20$ (v/v)], depending of surface morphology and thus allowing us to achieve high droplet confinement. Indeed, upon air-drying, the deposited sample solution is concentrated on a restricted area. Such ultra-localization led to “hot spots” where very abundant peptide signals were recorded. However, irradiation of the close surroundings only produced very tiny ion intensities. Although sample confinement was compulsory to ensure efficient LDI processes, finding these “hot spots” was quite tricky and required us to raster the deposit with the laser beam. In contrast, OTS-based surfaces led to more homogeneously

distributed peptides since random irradiation always generated ions with similar intensities.

Then, we compared LDI-MS performances for the same peptide mixtures used above for OTS-terminated interfaces [Table 1 and Table S2 (Supporting Information)]. An illustration is provided in Figure 3. When examining at different concentrations, the cumulated S/N ratios of surfaces A and B chemically modified with PFTS, we found a nonlinear detection response. The most sensitive experiments were obtained at 10^{-6} M. Increasing the concentration to 10^{-5} M was deleterious for LDI efficiency. At the optimal concentration of 10^{-6} M, OTS- and PFTS-terminated surfaces provided similar signal intensities as seen in Table 1. As an example, surface A gave cumulated S/N ratios of 12 000 and 15 000 for OTS and PFTS terminations, respectively, whereas an equal response of 13 000 was observed for both OTS- and PFTS-terminated surfaces B. Nevertheless, stronger discrimination during the ionization/desorption stage was observed with such perfluorinated modified surfaces, which limited the performances of such interfaces. Only 24/35 and 22/35 peptides were detected at 10^{-6} M for PFTS-terminated surface A and surface B, respectively, whereas 27/35 and 34/35 were obtained for the OTS-terminated ones. Moreover, at 10^{-7} M concentration, the PFTS surface performances were not equaling those of OTS-terminated interfaces at the same concentration level.

Here, we clearly demonstrated that the type of hydrophobic coating strongly influenced the qualitative detection of peptides, notably affecting peptide discrimination.

Comparison of Homemade Interfaces with Commercial NALDI Surface. The NALDI chip consists of VLS-fabricated silicon nanowires coated with pentafluorophenylpropyldimethylchlorosilane to ensure a hydrophobic layer.^{16,18,21} As expected, samples were confined into small areas. Ions were produced with laser fluences in accordance to the ones used for the prepared interfaces (20–30%). Surprisingly, we have observed very similar LDI behaviors for the NALDI interface and for homemade PFTS surfaces. Indeed, the intensity profiles recorded at all three studied sample concentrations under our experimental conditions showed a maximal detection at 10^{-6} M (Table 1) despite that lower detection (attomolar level) was described on NALDI targets for verapamil.²¹ Similarly, the same peptide discrimination was evidenced. Overall, the detection performances of the NALDI chip were not satisfactory compared to the nanostructured OTS-terminated interfaces, in particular compared to surface B. Even when ions were produced with high abundances, discrimination in peptide detection hampered complete sample characterization. For instance at 10^{-6} M concentration, despite the same cumulated S/N ratios (13 000), only 23/35 peptides were displayed with the NALDI chip to be compared with 34/35 with the OTS-terminated surface B. The nanostructured OTS-terminated surface B was evidenced as the best LDI-MS interface providing a good compromise between sensitivity, linear dynamic range, and homogeneous peptide detection.

Nanostructured Silicon Surface Features in Relation with LDI Performance. As expected from literature data, the length of nanostructured layers plays several roles. First, the length should be high enough to correctly absorb photons from pulsed laser irradiation. Indeed, the laser penetration depth in the silicon nanowires at the wavelength of 355 nm is lower than 100 nm, considering the nanostructure optical absorption and reflection in this energy range.⁴⁵ Second, analytes have to be correctly and uniformly distributed inside the nanostructured

layer to be efficiently desorbed and ionized. Indeed, it was shown that the electrowetting process can be performed to force analytes to penetrate inside porous silicon and silicon nanofilament surfaces.⁴⁶ Applying higher voltages caused different degrees of penetration of analytes inside the nanostructured layer, thus increasing the S/N ratio of the MS detection. However, when the thickness of the layer was too high, analytes could also be trapped deeply inside the nanostructured layer. Then, although the energy was appropriately transferred to analytes, the desorption stage (plume formation and expansion) could be less efficient and thus led to a decrease of the detection sensitivity.⁴⁷ Moreover, the surface morphology (porosity and roughness) is known to contribute to a change in thermal conductivity of silicon. Indeed, introducing additional dangling bonds at defect sites ultimately led to disruption of continuous single-crystalline structure and slowed down phonon propagation and thermal electron movement. Surface thermal conductivity decreased rapidly with an increasing porosity.^{11,48–50}

In the case of surfaces A and B, they can be considered as possessing 2–3 layers. Surface A was composed by one nanostructured layer ($\sim 1.5 \mu\text{m}$) on the top of the bulk c-silicon, whereas surface B comprised one nanostructured layer (~ 220 nm), one mesoporous layer (~ 650 nm), and the bulk c-silicon (Figure S5 in the Supporting Information). AFM measurements (Figure S6 in the Supporting Information) showed that surface B presents a much lower roughness (rms, 6.9 nm) than surface A (rms, 158 nm). Besides, the SEM image of surface B exhibited pores which will also participate to decrease thermal conductivity and thus enhance heat confinement (Figure S7 in the Supporting Information). That could explain why lower laser fluence could be used for the LDI process when using surfaces A and B compared to other tested chips to produce the same amount of desorbed peptides. Furthermore, we could postulate that, in the case of surface B, solution containing the analytes wetted only the nanostructured first layer (~ 220 nm). Analytes were uniformly distributed in that top layer, leading to higher sensitivity of detection and lower peptide discrimination. For surface A ($\sim 1.5 \mu\text{m}$), the liquid could penetrate more deeply inside the nanostructured layer and then, analytes were randomly distributed, providing lower LDI-MS performances. Moreover, we could not neglect that surface morphology could also have an influence on the formation and dissipation of the plume.⁴⁶

CONCLUSION

Different homemade silicon-based surfaces were probed as peptide ion promoting agents to achieve efficient LDI-MS detection. We focused our attention both on method sensitivity (signal intensities) and on detection discrepancy (sample coverage). Strikingly, we have reported a significant influence of the type of hydrophobic coating (hydrocarbon vs fluorocarbon) on peptide ionization discrimination. Future studies will be devoted to LDI-MS of other relevant type of molecules such as carbohydrates, lipids, small proteins, and DNA.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: yannick.coffinier@iri.univ-lille1.fr. Phone: +33 3 20 19 79 87. Fax: +33 3 20 19 78 84.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge financial support from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Nord-Pas de Calais region.

■ REFERENCES

- (1) Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299–2301.
- (2) Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T.; Matsuo, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151–153.
- (3) Okuno, S.; Arakawa, R.; Okamoto, K.; Matsui, Y.; Seki, S.; Kozawa, T.; Tagawa, S.; Wada, Y. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 5364–5369.
- (4) Peterson, D. S. *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, *26*, 19–34.
- (5) Walker, B. N.; Razunguzwa, T.; Powell, M.; Knochenmuss, R.; Vertes, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 1669–1672.
- (6) Wei, J.; Buriak, J. M.; Siuzdak, G. *Nature* **1999**, *399*, 243–246.
- (7) Trauger, S. A.; Go, E. P.; Shen, Z.; Apon, J. V.; Compton, B. J.; Bouvier, E. S. P.; Finn, M. G.; Siuzdak, G. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4484–4489.
- (8) Shen, Z.; Thomas, J. J.; Averbuj, C.; Broo, K. M.; Engelhard, M.; Crowell, J. E.; Finn, M. G.; Siuzdak, G. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 612–619.
- (9) Lewis, W. G.; Shen, Z.; Finn, M. G.; Siuzdak, G. *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, *226*, 107–116.
- (10) Shenar, N.; Martinez, J.; Enjalbal, C. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 632–644.
- (11) Xiao, Y.; Retterer, S. T.; Thomas, D. K.; Tao, J.-Y.; He, L. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 3076–3083.
- (12) Piret, G.; Drobecq, H.; Coffinier, Y.; Melnyk, O.; Boukherroub, R. *Langmuir* **2010**, *26*, 1354–1361.
- (13) Chen, W. Y.; Huang, J. T.; Cheng, Y. C.; Chien, C. C.; Tsao, C. W. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *687*, 97–104.
- (14) Piret, G.; Kim, D.; Drobecq, H.; Coffinier, Y.; Melnyk, O.; Schmuki, P.; Boukherroub, R. *Analyst* **2012**, *137*, 3058–3063.
- (15) Kruse, R. A.; Li, X.; Bohn, P. W.; Sweedler, J. V. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3639–3645.
- (16) Go, E. P.; Apon, J. V.; Luo, G.; Saghatelian, A.; Daniels, R. H.; Sahi, V.; Dubrow, R.; Cravatt, B. F.; Vertes, A.; Siuzdak, G. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1641–1646.
- (17) Chen, Y.; Vertes, A. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 5835–5844.
- (18) Luo, G.; Chen, Y.; Daniels, H.; Dubrow, R.; Vertes, A. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 13381–13386.
- (19) Sainiemi, L.; Keskinen, H.; Aromaa, M.; Luosujärvi, L.; Grigoras, K.; Kotiaho, T.; Mäkelä, J. M.; Franssila, S. *Nanotechnology* **2007**, *18*, S05303–S05310.
- (20) Chen, Y.; Chen, H.; Aleksandrov, A.; Orlando, T. M. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 6953–6960.
- (21) Daniels, R. H.; Dikler, S.; Li, E.; Stacey, C. *J. Assoc. Lab. Autom.* **2008**, *13*, 314–321.
- (22) Dupré, M.; Coffinier, Y.; Boukherroub, R.; Cantel, S.; Martinez, J.; Enjalbal, C. *J. Proteomics* **2012**, *75*, 1973–1990.
- (23) Shenar, N.; Cantel, S.; Martinez, J.; Enjalbal, C. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 2371–2379.
- (24) Dupré, M.; Cantel, S.; Durand, J.-O.; Martinez, J.; Enjalbal, C. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *741*, 47–57.
- (25) Lapierre, F.; Piret, G.; Drobecq, H.; Melnyk, O.; Coffinier, Y.; Thomy, V.; Boukherroub, R. *Lab Chip* **2011**, *11*, 1620–1628.
- (26) Verplanck, N.; Galopin, E.; Camart, J.-C.; Thomy, V.; Coffinier, Y.; Boukherroub, R. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 813–817.
- (27) Brunet, P.; Lapierre, F.; Thomy, V.; Coffinier, Y.; Boukherroub, R. *Langmuir* **2008**, *24*, 11203–11208.
- (28) Piret, G.; Coffinier, Y.; Roux, C.; Melnyk, O.; Boukherroub, R. *Langmuir* **2008**, *24*, 1670–1672.
- (29) Lapierre, F.; Thomy, V.; Coffinier, Y.; Blossey, R.; Boukherroub, R. *Langmuir* **2009**, *25*, 6551–6558.
- (30) Nhung Nguyen, T. P.; Brunet, P.; Coffinier, Y.; Boukherroub, R. *Langmuir* **2010**, *26*, 18369–18373.
- (31) Kawashima, T.; Mizutani, T.; Nakagawa, T.; Torii, H.; Saitoh, T.; Komori, K.; Fujii, M. *Nano Lett.* **2007**, *8*, 362–368.
- (32) Nayak, R.; Knapp, D. R. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4950–4956.
- (33) Cassie, A. B. D.; Baxter, S. *Trans. Faraday Soc.* **1944**, *40*, 546–551.
- (34) Wenzel, R. N. *Ind. Eng. Chem.* **1936**, *28*, 988–994.
- (35) Piret, G.; Desmet, R.; Diecis, E.; Drobecq, H.; Segers, J.; Rouanet, C.; Debrie, A.-S.; Boukherroub, R.; Lochet, C.; Melnyk, O. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 6467–6478.
- (36) Coffinier, Y.; Szunerits, S.; Drobecq, H.; Melnyk, O.; Boukherroub, R. *Nanoscale* **2012**, *4*, 231–238.
- (37) Law, K.; Larkin, J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 2597–2622.
- (38) Tsujii, K.; Yamamoto, T.; Onda, T.; Shibuichi, S. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1011–1012.
- (39) Shibuichi, S.; Yamamoto, T.; Onda, T.; Tsujii, K. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *208*, 287–294.
- (40) Dufour, R.; Harnois, M.; Coffinier, Y.; Thomy, V.; Boukherroub, R.; Senez, V. *Langmuir* **2010**, *26*, 17242–17247.
- (41) Meng, J.-C.; Averbuj, C.; Lewis, W. G.; Siuzdak, G.; Finn, M. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 1255–1260.
- (42) Meng, J.-c.; Siuzdak, G.; Finn, M. G. *Chem. Commun.* **2004**, 2108–2109.
- (43) Lee, J.-C.; Wu, C.-Y.; Apon, J. V.; Siuzdak, G.; Wong, C.-H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 2753–2757.
- (44) Law, K. P. *Int. J. Mass Spectrom.* **2010**, *290*, 47–59.
- (45) Street, R. A.; Qi, P.; Lujan, R.; Wong, W. S. *Appl. Phys. Lett.* **2008**, *93*, 163109–3.
- (46) Tsao, C.-W.; Kumar, P.; Liu, J.; DeVoe, D. L. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2973–2981.
- (47) Kang, M.-J.; Pyun, J.-C.; Lee, J.-C.; Choi, Y.-J.; Park, J.-H.; Park, J.-G.; Lee, J.-G.; Choi, H.-J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 3166–3170.
- (48) Benedetto, G.; Boarino, L.; Spagnolo, R. *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.* **1997**, *64*, 155–159.
- (49) Attaf, N.; Aida, M. S.; Hadjeris, L. *Solid State Commun.* **2001**, *120*, 525–530.
- (50) Shen, Q.; Toyoda, T. *Rev. Sci. Instrum.* **2003**, *74*, 601–603.

III.1.2. Illustrations complémentaires

Peptide synthesis.

La synthèse des peptides présentée dans le "supporting information" original n'a pas été incluse dans cette partie du manuscrit. Elle est consultable dans l'Annexe 3 – synthèse peptidique sur support semi-automatisée.

Table S1. Peptide mixtures used in this study.

Mix	Pept, S E Q U E N C E	Mw mono. (g/mol)
M1	P(1) P I C A K	530,2886
	P(8) D I G L V R	671,3966
	P(15) W L I A G D R	829,4446
	P(22) L M Y V H W V K	1074,5684
	P(29) W G V Y A P L F D K	1194,6073
M2	P(2) S E G F K	566,2700
	P(9) S W A M V K	720,3628
	P(16) Y I C P A D R	836,3850
	P(23) N G F L M C S A L K	1082,5282
	P(30) A D P N Y H I G E T K	1243,5832
M3	P(3) V T E F K	622,3326
	P(10) T P S S V L K	730,4224
	P(17) L G H A P E V R	877,4769
	P(24) L M Y V H W V R	1102,5774
	P(31) M L Q Y G M F V E R	1272,5994
M4	P(4) F A Q I R	633,3598
	P(11) S W A M V R	748,3698
	P(18) Y D T S I V Q K	952,4865
	P(25) P G A H I W E A G A K	1135,5774
	P(32) L E S M G V D F N A N K	1323,6128
M5	P(5) A G V D G P K	642,3336
	P(12) A V G K K K K	757,5173
	P(19) Y D T S I V Q R	980,4926
	P(26) V E Y L A S I T L K	1135,6488
	P(33) A E Q V P L G S Y D T G K	1363,6619
M6	P(6) V T E F R	650,3387
	P(13) M W A E N K	777,3479
	P(20) A F I S V G P L A R	1029,5970
	P(27) G N G Q I V F H A A R	1168,6101
	P(34) Q L D F G E V L A N T G R	1418,7153
M7	P(7) A G V D G P R	670,3398
	P(14) Y I C P A D K	808,3789
	P(21) C A S H T F L V R	1032,5174
	P(28) G H L P T V S E N A R	1179,5996
	P(35) I W D P S N L I A Q P T K	1481,7877

Table S2. Mass spectrometry results obtained for the analyses of the 7 peptide mixtures at 3 different concentrations on all tested surfaces.

LDI surfaces / Mixtures / peptides	Surface A - OTS			Surface B - OTS			Surface C - OTS			Surface A - PFTS			Surface B - PFTS			NALDI™					
	10 ⁻⁶ M 500 fmol	10 ⁻⁷ M 50 fmol	10 ⁻⁸ M 5 fmol	10 ⁻⁶ M 500 fmol	10 ⁻⁷ M 50 fmol	10 ⁻⁸ M 5 fmol	10 ⁻⁶ M 500 fmol	10 ⁻⁷ M 50 fmol	10 ⁻⁸ M 5 fmol	10 ⁻⁶ M 500 fmol	10 ⁻⁷ M 50 fmol	10 ⁻⁸ M 5 fmol	10 ⁻⁶ M 500 fmol	10 ⁻⁷ M 50 fmol	10 ⁻⁸ M 5 fmol	10 ⁻⁶ M 500 fmol	10 ⁻⁷ M 50 fmol	10 ⁻⁸ M 5 fmol			
M1	P(1)	3.6%	0.6%	1.2%	1.9%	5.1%	1.3%	0.9%	79.0%	70.1%	100.0%	94.0%	100.0%	1.2%	100.0%	28.3%	20.9%	45.2%	4.1%	18.1%	13.7%
	P(8)	98.1%	100.0%	32.8%	62.2%	91.1%	100.0%	15.5%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	66.5%	100.0%	12.7%	6.3%	9.8%	4.1%	100.0%
	P(22)	6.4%	70.6%	100.0%	100.0%	100.0%	9.4%	12.7%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	88.1%	100.0%	34.8%	48.1%	78.1%	100.0%	100.0%
M2	P(29)	13.9%	1.4%	3.6%	35.9%	2.1%	2.1%	29.4%	2.9%	100.0%	100.0%	24.2%	1.8%	100.0%	10.4%	100.0%	100.0%	100.0%	9.7%	10.9%	82.5%
	P(2)	5.7%	2.9%	17.7%	2.6%	2.7%	17.7%	4.1%	24.1%	100.0%	100.0%	49.1%	100.0%	100.0%	7.3%	100.0%	100.0%	100.0%	9.7%	5.6%	21.7%
	P(16)	100.0%	75.5%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	49.4%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
M3	P(23)	29.0%	5.8%	100.0%	7.5%	7.7%	28.3%	100.0%	28.3%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	64.7%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	P(60)	6.9%	20.5%	100.0%	5.8%	14.3%	51.2%	3.2%	18.9%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	P(3)	1.1%	1.3%	3.8%	4.5%	3.8%	2.1%	1.0%	0.3%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
M4	P(10)	1.9%	1.4%	100.0%	6.8%	13.0%	12.0%	1.2%	7.8%	23.5%	100.0%	23.8%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	P(17)	15.5%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	81.7%	58.3%	100.0%	63.8%	2.2%	100.0%	64.9%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	P(24)	100.0%	48.3%	100.0%	83.6%	2.9%	2.9%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
M5	P(31)	94.8%	28.4%	100.0%	42.4%	2.9%	2.9%	95.6%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	P(4)	75.2%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	84.5%	100.0%	100.0%	88.8%	100.0%	100.0%	70.6%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	P(11)	37.7%	6.5%	100.0%	60.9%	22.9%	13.4%	63.4%	28.4%	15.8%	100.0%	43.6%	15.8%	100.0%	15.1%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
M6	P(18)	3.8%	2.1%	3.8%	1.8%	12.0%	13.4%	6.0%	6.0%	45.2%	100.0%	6.9%	2.4%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	P(25)	38.2%	16.8%	2.5%	14.9%	23.4%	8.3%	22.4%	100.0%	78.8%	100.0%	74.4%	5.3%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	P(32)	100.0%	11.8%	1.2%	33.2%	11.8%	8.3%	24.5%	50.8%	40.6%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
M7	P(6)	0.8%	1.3%	3.3%	3.2%	3.5%	3.3%	2.8%	4.3%	8.6%	100.0%	0.3%	0.4%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	P(12)	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	P(19)	14.0%	4.8%	3.6%	9.5%	0.8%	100.0%	45.0%	20.9%	23.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
M8	P(28)	100.0%	50.7%	100.0%	36.2%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	P(27)	57.8%	100.0%	77.3%	24.2%	37.8%	22.1%	3.1%	17.5%	5.8%	100.0%	89.1%	75.0%	39.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	P(34)	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
M9	P(7)	22.6%	100.0%	9.2%	100.0%	42.3%	30.9%	95.8%	2.8%	11.7%	100.0%	6.7%	8.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	P(14)	35.9%	100.0%	1.0%	47.9%	5.5%	100.0%	100.0%	15.8%	100.0%	100.0%	37.7%	13.6%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	P(28)	100.0%	95.8%	100.0%	86.3%	100.0%	100.0%	88.6%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
M10	P(35)	58.1%	1.2%	1.2%	5.7%	100.0%	100.0%	24.7%	24.7%	2.7%	100.0%	40.2%	2.7%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	P(7)	16.3%	43.4%	31.5%	30.3%	37.9%	45.7%	33.0%	12.8%	15.0%	100.0%	14.7%	32.7%	23.9%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	P(14)	23.1%	20.9%	7.1%	21.7%	23.0%	34.9%	17.1%	27.1%	20.3%	100.0%	24.2%	18.3%	9.2%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
M11	P(8)	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	P(25)	56.5%	37.9%	42.2%	34.4%	38.9%	47.1%	90.6%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	P(35)	56.9%	28.0%	28.7%	23.2%	11.6%	14.5%	35.2%	36.6%	28.1%	100.0%	68.5%	26.1%	22.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
M12	M1	57.3%	68.5%	48.1%	61.8%	100.0%	100.0%	35.7%	19.6%	32.0%	100.0%	24.1%	44.4%	43.2%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	M2	10.1%	6.5%	6.1%	16.3%	17.3%	17.3%	5.3%	3.0%	100.0%	100.0%	1.4%	3.3%	3.3%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	M3	51.9%	52.0%	0.6%	30.5%	16.7%	83.5%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	16.4%	20.9%	5.6%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
M13	M4	37.6%	36.9%	28.6%	33.4%	56.2%	33.4%	10.3%	12.8%	14.4%	100.0%	14.2%	19.7%	11.8%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	M5	52.6%	44.2%	57.3%	100.0%	83.8%	31.2%	27.8%	16.0%	20.0%	100.0%	100.0%	38.2%	61.5%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	M6	100.0%	100.0%	100.0%	98.3%	71.9%	81.5%	61.6%	36.2%	36.8%	100.0%	67.1%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
M14	M7	7.0%	7.6%	32.8%	10.5%	51.1%	40.9%	4.6%	9.0%	7.0%	100.0%	13.1%	17.6%	40.9%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	M1	31	27	23	35	34	20	32	25	17	26	24	19	24	14	25	22	22	14	25	23
	M2	89%	77%	66%	100%	97%	57%	91%	71%	49%	74%	68%	54%	68%	63%	71%	63%	63%	40%	71%	66%
Global results	Number of detected peptides	16075	12091	8418	16587	13041	3238	8838	4901	1543	7802	15077	3067	5159	12624	7481	5612	13252	8200	5612	13252
	Peptide sequence coverage	47	35	41	15	12	36	31	20	35	30	37	19	55	56	36	32	27	32	32	27
	Average error on MH ⁺ (ppm)																				

not detected (S/N<5)

Figure S1. SEM cross-view images of some of the different surface morphologies obtained by chemical etching for various etching parameters. A) Silicon nanostructures obtained in AgNO_3/HF (0.02M-5.25M), 55°C , 30min., B) same conditions during 120 min., C) Silicon needles obtained in $\text{AgNO}_3/\text{NaBF}_4$ solution (0.02M-2M), 80°C , 120 min, from Si (100) 5-10 Ohm.cm, D) Silicon triangles obtained in $\text{AgNO}_3/\text{NaBF}_4$ solution (0.04M-3M), 80°C , 120 min, from Si (100) 0.009-0.01 Ohm.cm. Inserts represent top-view SEM images.

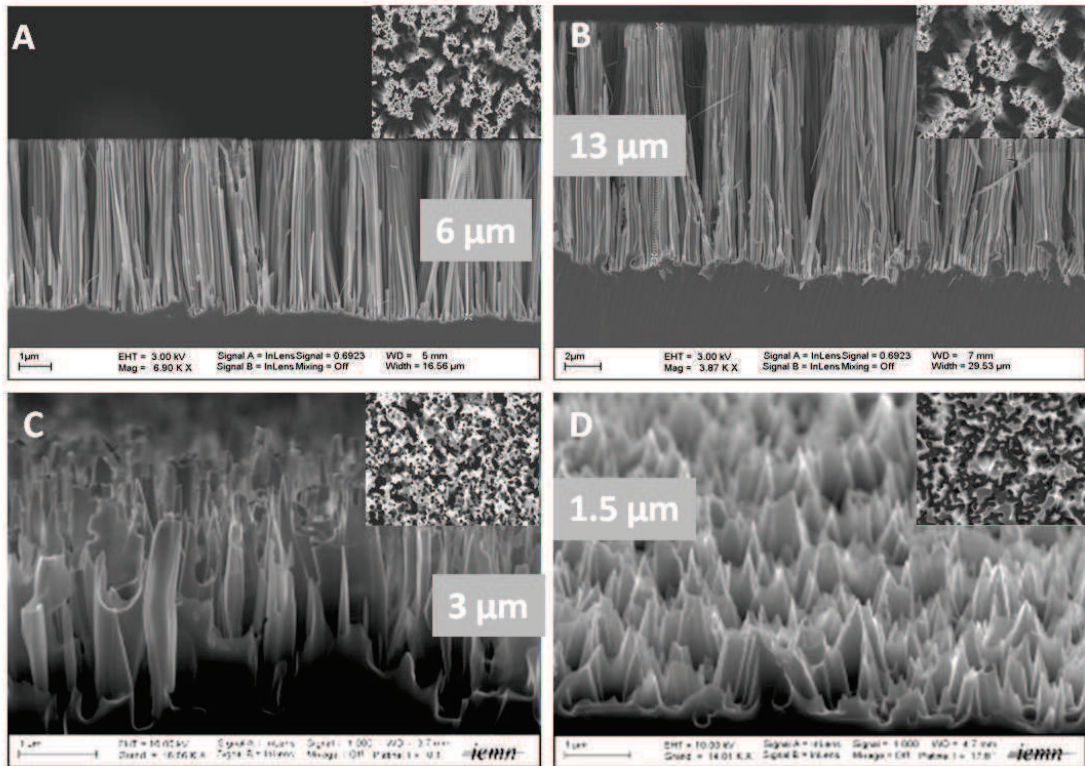


Figure S2. SEM images of some of the different surface morphologies obtained by varying the growth parameters and silicon crystal orientation. A) Vertically aligned and dense SiNW on Si (111), B) with lower density, C) small-nanowires (~10 nm in diameter), high density and entangled SiNW of 10 μm in length, E) 45 μm long SiNW and F) Nano-trees (double structuration). Inserts in C and F represent zoomed images.

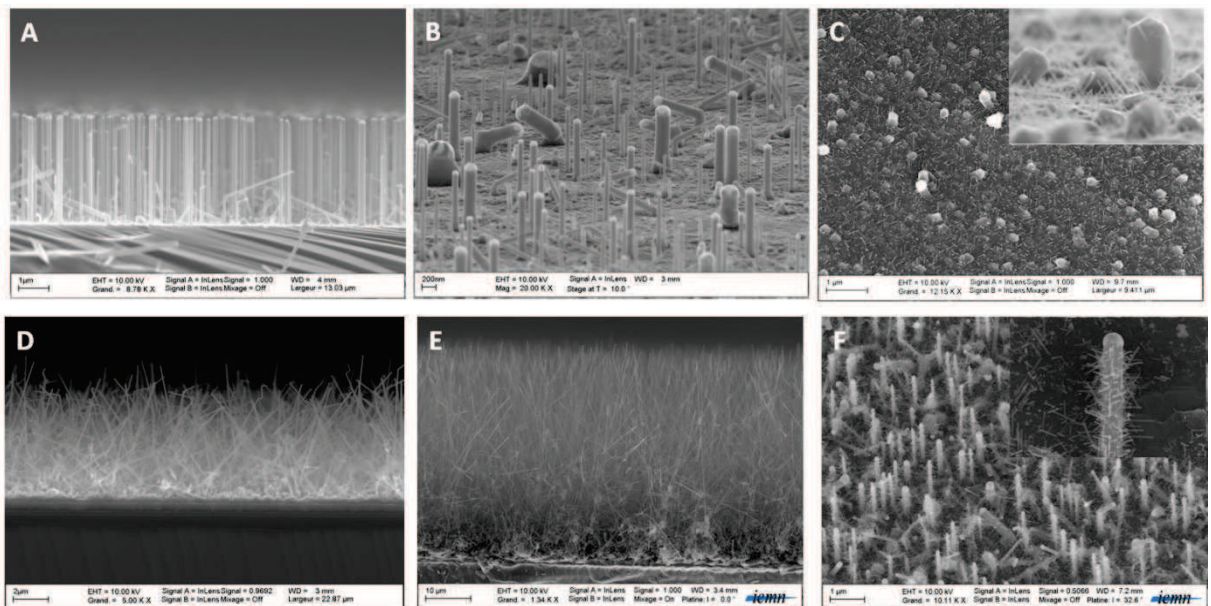


Figure S3. MS spectra for a peptide calibration mixture composed by four peptides: Des-Arg9-Bradikynin, Angiotensin, Fibrinopeptide and Neurotensin at 50 fmol/ μ L obtained on A) SiNW nano-trees (SEM image Figure S2F), B) nanotriangles (SEM image Figure S1D) and C) longer SiNWs (SEM image Figure S2E).

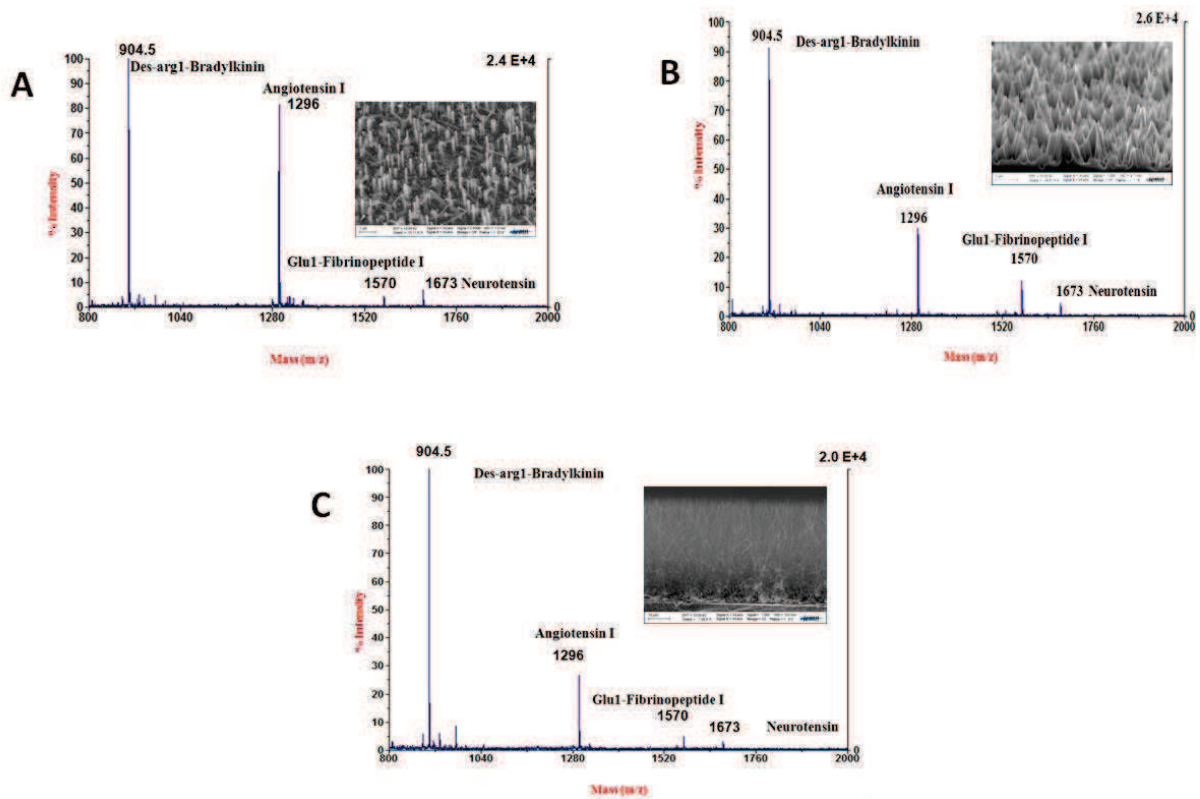


Figure S4. LDI/NanoSi OTS-terminated and MALDI/HCCA MS spectra of Cytochrome C tryptic at 500 fmol.

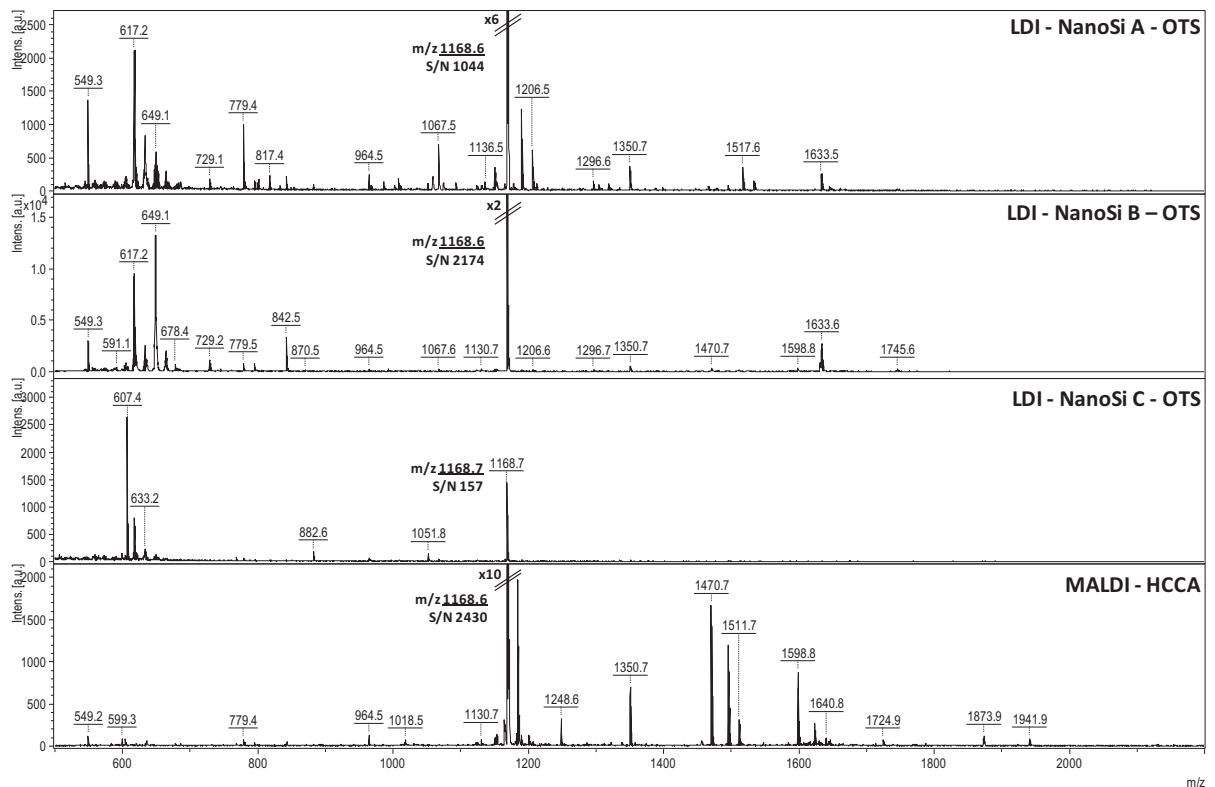


Figure S5. SEM images of Surfaces A and B presenting different layers.

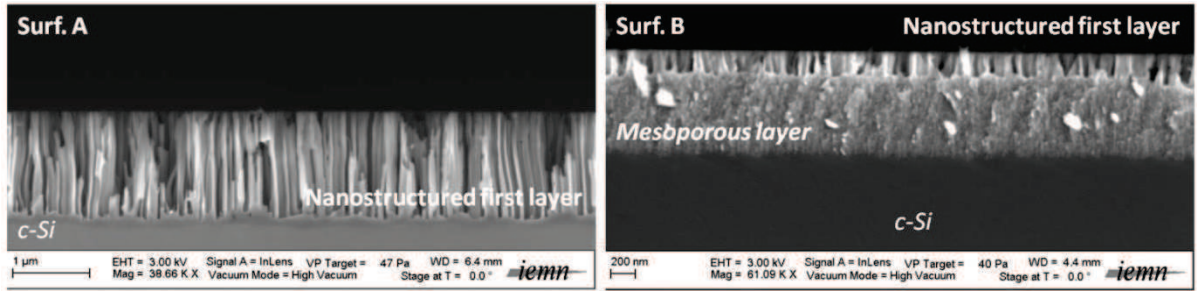


Figure S6. AFM images of Surfaces A and B.

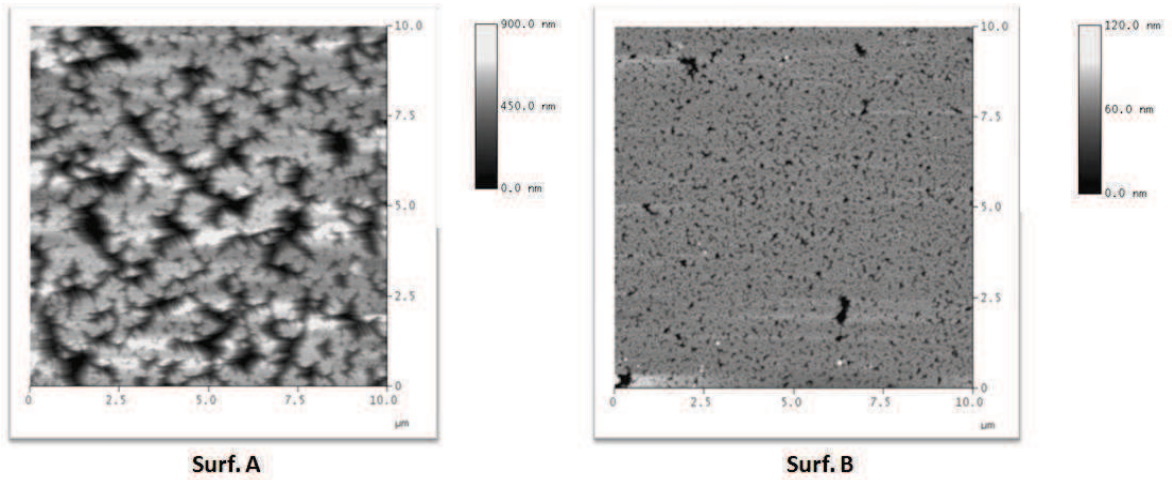
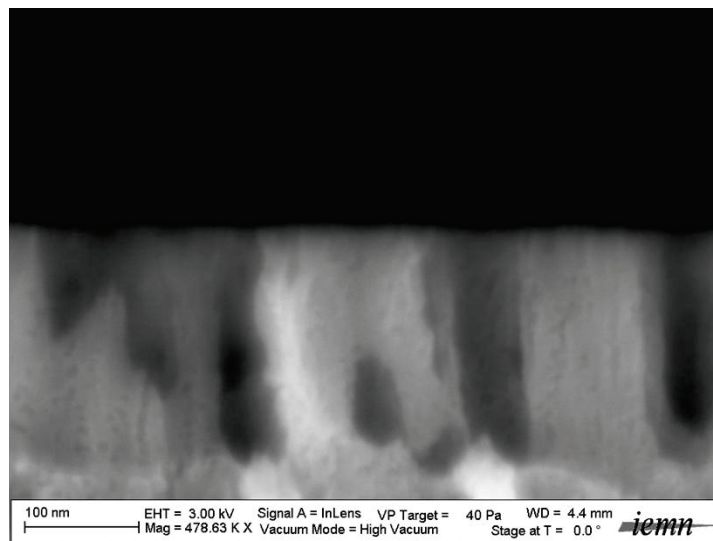
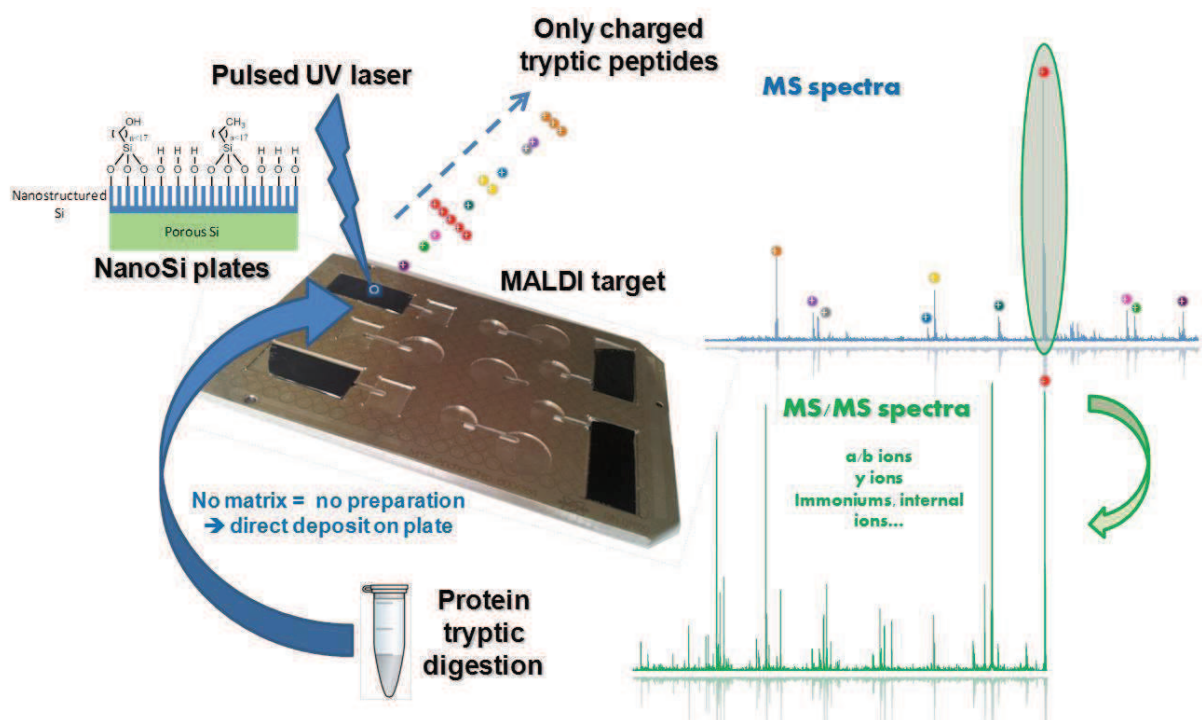


Figure S7. SEM image of the first nanostructured layer of Surface B evidencing pores in the nanostructures.



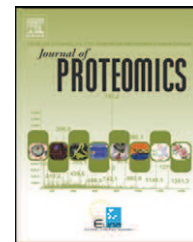
III.2. Analyses de peptides et de digests tryptiques sur un support de type surface

III.2.1. Article 5: Laser desorption ionization mass spectrometry of protein tryptic digests on nanostructured silicon plates



Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jjprot

Laser desorption ionization mass spectrometry of protein tryptic digests on nanostructured silicon plates

Mathieu Dupré^a, Yannick Coffinier^b, Rabah Boukherroub^b, Sonia Cantel^a,
Jean Martinez^a, Christine Enjalbal^{a,*}

^aInstitut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247, Universités Montpellier 1 et 2, CNRS, Bâtiment Chimie (17), Université Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

^bInstitut de Recherche Interdisciplinaire (IRI), UMR CNRS 3078, Parc de la Haute Borne, 50 avenue de Halley - BP 70478, 59658 Villeneuve d'Ascq, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 November 2011

Accepted 27 December 2011

Available online 12 January 2012

Keywords:

LDI-MS

SALDI-MS

Nanostructured silicon

Tryptic peptides

PMF

Peptide sequencing

ABSTRACT

We report on the simple application of a new nanostructured silicon (NanoSi) substrate as laser desorption/ionization (LDI)-promoting surface for high-throughput identification of protein tryptic digests by a rapid MS profiling and subsequent MS/MS analysis. The NanoSi substrate is easily prepared by chemical etching of crystalline silicon in $\text{NH}_4\text{F}/\text{HNO}_3/\text{AgNO}_3$ aqueous solution. To assess the LDI performances in terms of sensitivity, repeatability and robustness, the detection of small synthetic peptides (380–1700 Da) was investigated. Moreover, peptide sequencing was tackled. Various tryptic synthetic peptide mixtures were first characterized in MS and MS/MS experiments carried out on a single deposit. Having illustrated the capability to achieve peptide detection and sequencing on these ionizing surfaces in the same run, protein tryptic digests from Cytochrome C, β -Casein, BSA and Fibrinogen were then analyzed in the femtomolar range (from 50 fmol for Cytochrome C down to 2 fmol for Fibrinogen). Comparison of the NanoSi MS and MS/MS data with those obtained with sample conditioned in organic matrix demonstrated a great behavior for low mass responses. We demonstrated the capability of LDI on NanoSi to be a complementary method to MALDI peptide mass fingerprinting ensuring determination of peptide molecular weights and sequences for more efficient protein database searches.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS) constitutes one of the major analytical tools for efficient peptide and protein analyses. Many instrumental and methodological advances have been accomplished within the last two decades. In particular, many researches have been pursued to improve compound detection by developing new matrix systems. Among such approaches, mixture of an organic MALDI matrix with an inorganic material has been reported in

1995 and was referred as Surface-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry (SALDI-MS) [1]. The major breakthrough was introduced by Siuzdak and collaborators in 1999 who achieved the detection of peptides and small molecules by Desorption/Ionization On porous Silicon (DIOS-MS) [2]. Since this original study, the unique use of an inert material as matrix attracted MALDI users for its advantages compared to classical strategies. Such Laser Desorption/Ionization (LDI) mass spectrometry (MS) using no organic compound has been thereafter widely investigated [3]. According to IUPAC nomenclature, these 'matrix-free' LDI-MS methods using only inert materials should be nowadays referred as SALDI-MS (<http://www.iupac.org>). Application of this technique gained in popularity notably for its easy sample preparation

* Corresponding author. Tel.: +33 467 14 38 19; fax: +33 467 14 48 66.
E-mail address: enjalbal@univ-montp2.fr (C. Enjalbal).

(no co-crystallization required) and its potential capacity to avoid matrix interferences in the low-mass range of the mass spectra. Accordingly, various solid materials and different substrate structures have been tested as potential LDI-promoting agents. In continuation of Siuzdak's study, the first substrates mainly studied were silicon/silica [4] and alumina [5], with porous structures that confer specific surface properties notably a large active surface area and a strong absorbance in the UV range. Carbon-based materials, such as graphite [6,7] or pencil lead [8], were also tested particularly due to their availability. Following this trend, structured materials were next introduced, such as polymers [9] or sol-gel based-materials [10]. More recently, due to their unique properties, nanostructured materials that are experiencing an ever increasing interest in the scientific community were proposed. These last years, the use of nanotechnologies has been extensively introduced in nearly all scientific areas. It was logical that nanostructured materials were tested as potential substrates in LDI methods [11]. In this context, nanostructured surfaces mostly carbon-based nanotubes [12] and silicon-based nanowires [13], were described as LDI substrates in the literature. Besides, the improved harnessing of nanomaterial production processes allowed well-controlled inorganic matrix preparation from metals, metal oxides and alloys, under different frameworks. For instance gold [14], iron [15], silver [16], platinum [17], cobalt [18], titanium [19] and other elements [20–24], alone or in combination, were investigated as inorganic matrices by several research groups worldwide. Moreover, disposable ready-to use LDI nanostructured surfaces can be purchased like Nano-Assisted Laser Desorption/Ionization (NALDI™) target plates, constituted by silylated silicon nanowires, which were recently developed for 'matrix-free' LDI analysis of small molecules [25].

In the search for an alternative method to conventional MALDI-MS peptide mass fingerprinting, various 'matrix-free' LDI analyses have been undertaken in the laboratory for peptide detection starting with commercially available inert materials, which were compared to the original method of Siuzdak on porous etched silicon (DIOS-chips). Porous chromatography materials (silica gel, reversed-phase silica gel and alumina, pore size of 60 and 90 Å), carbon powder (scratched pencil lead), silicon-based chips (NALDI™ target) [26,27] and more recently diamond nanowires have been investigated [28]. Among all inert studied substrates, silicon-based nanostructured materials provided the most sensitive peptide detection and were thus selected for further investigations. Materials conditioned as surfaces like the NALDI™ target were preferred to powders for two major reasons. First, regarding the robustness and simplicity of the MS experiment, the sample deposition protocol is straightforward, only requiring dropping a microvolume of the peptide solution onto the silicon nanowire surface to be introduced in the MALDI mass spectrometer source after drying. Second, various silicon nanowire materials presenting different physical and chemical properties can be designed and prepared according to well-mastered synthetic procedures [11,29–32] in order to optimize the LDI-MS detection performance. Preliminary results with model peptides used for analyzer calibration showed very promising results with detection limits in the femtomolar range using silicon nanowire array

surfaces prepared by chemical dissolution of crystalline silicon [31]. Moreover, these surfaces have been combined to digital microfluidic system and were integrated in a lab-on-chip configuration for the specific distribution and localization of analytes. This combination has permitted classical basic operations such as displacement of sample droplet, precise sample distribution and subsequent rinsing step prior to MS detection [32]. The same surfaces have also been used for the detection of methylation level of peptides, proving that these silicon nanowire array-based surfaces have a great potential in proteomic analysis [33]. However, such peptide sampling is not sufficiently representative of the sequence diversity that is encountered in proteomics, which justifies broadening the scope of the research to the analyses of numerous proteolytic peptides and mixtures of proteolytic peptides including multiple tryptic digests.

Indeed, high-resolution mass spectrometry-based proteomics using shotgun strategies [34], has very recently improved at a rapid pace allowing the identification of very low abundant proteins from human cells (less than 500 copies per cell) [35]. Such in depth investigation of the human proteome relies on the identification of several thousands of tryptic peptides that were exhibiting rather high masses since, on average, around 70% of the tryptic peptides were above 1200 Da (40% above 1700 Da) [36]. Although matrix-free LDI mass spectrometry presents a great potential for biomolecule analysis and is currently investigated as an interesting analytical tool in environmental, chemical and biomedical applications [11], its relevance in proteomics will be appropriate to the analysis of low mass peptides (up to 1200 Da) representing around 30% of tryptic digests [36].

The aim of such ongoing study thus focuses on SALDI-MS analyses of low mass peptides carried out on new nanostructured silicon (NanoSi) surface prepared by chemical etching of crystalline silicon in $\text{NH}_4\text{F}/\text{HNO}_3/\text{AgNO}_3$ aqueous solution. A particular attention was devoted to the analytical performances of this designed SALDI-MS promoting material, not only in terms of sensitivity, but also in terms of reproducibility and repeatability, especially around the detection limit to propose a reliable robust method as an alternative to conventional MALDI-MS peptide mass fingerprinting. Our results were thus confronted to the results recorded from classical MALDI experiments. Furthermore, we exploited the ability of modern MALDI-MS instruments that are now most of the time equipped with TOF/TOF configuration for MS/MS experiments [37–40] aiming not only at detecting the targeted peptides, but also to subsequently sequence them in a single SALDI-MS analysis. Using this technology, we first studied 49 synthetic peptides mimicking proteolytic sequences issued from both trypsin and Lys-N digestions, then tryptic digests from various proteins presenting molecular weights ranging from 12 to 340 kDa (Cytochrome C, β -Casein, Bovine Serum Albumin, and Fibrinogen).

However, prior to such challenging SALDI analyses, many experimental parameters in the analytical workflow required optimization to attain a general robust MS method to be used in any laboratory. Thus, synthetic purified peptides allowing the preparation of single molecule solutions of well-controlled concentrations were perfect candidates to first determine the investigated matrix-free LDI-MS method sensitivity. Indeed,

the detection limit is strongly related to the peptide ionization efficiency including yield of molecular ion production, nature of the produced ions, extend of in-source fragmentation. Having in hands multiple peptides exhibiting various structural features allowed probing the LDI-MS response in a general manner. We evaluated the analyses reproducibility that depends on easiness of sample deposition, homogeneity of inert surface, and surface contamination that may lead to parasite ions in the low mass range. Testing various pure isolated compounds was more representative than testing specific peptide cocktails, such as peptide calibration standards, that are well-known for their facile ionization/detection. Having established the overall performances of LDI-MS carried out on the selected NanoSi substrates, mixtures of synthetic tryptic peptides as well as tryptic digests were then studied to appreciate the relevance of such mass spectrometry technique for efficient peptide mass fingerprinting (PMF) and sequencing. Finally, the optimized method is applied to real tryptic digests from 4 different proteins.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and reagents

All solvents were of analytical grade. Methanol was purchased from Fisher and acetonitrile from Carlo Erba. The deionized water used in all the experiments was obtained using a Milli-Q system (Millipore, Milford, USA). MALDI matrix (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, HCCA) was purchased from Fluka. A peptide calibration standard kit was purchased from Bruker Daltonics. Regarding the preparation of the silicon nanostructures, all cleaning reagents such as acetone, isopropyl alcohol (i-PrOH), ammonium fluoride (NH_4F , 40%, pH 8), sulphuric acid (H_2SO_4 , 96%) and hydrogen peroxide (H_2O_2 , 30%) were clean room grade (VLSI) and purchased from Carlo Erba. All other chemicals were reagent grade or higher and were used as received unless otherwise specified. Nitric acid (HNO_3 , 65%) and hydrochloric acid (HCl , 37%) were purchased from Merck. Silver nitrate (AgNO_3 , 0.1 N), hexane and dichloromethane (CH_2Cl_2) were obtained from Sigma-Aldrich. Octadecyltrichlorosilane (OTS) was purchased from ABCR.

2.2. Preparation of nanostructured silicon substrates (NanoSi)

The nanostructured silicon surfaces were synthesized by chemical etching of p-type <100> crystalline silicon wafer (with a resistivity of 0.009–0.010 $\Omega\cdot\text{cm}$, Siltronic, Archamps, France) in $\text{NH}_4\text{F}/\text{HNO}_3/\text{AgNO}_3$ aqueous solution. The silicon surface was first degreased in acetone and isopropanol, rinsed with Milli-Q water, and then cleaned in a piranha solution (3:1 concentrated $\text{H}_2\text{SO}_4/30\% \text{H}_2\text{O}_2$) for 20 min at 80 °C, followed by copious rinsing with Milli-Q water. The NanoSi surface was obtained by chemical etching of the clean substrate in $\text{NH}_4\text{F}/\text{HNO}_3/\text{AgNO}_3$ (6.00 M/5.73 M/0.02 M) solution at room temperature for 10 min. The resulting surface was rinsed copiously with deionized water and immersed in an aqueous solution of $\text{HCl}/\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}$ (1/1/1) overnight at room temperature to remove the silver

nanoparticles and dendrites deposited on the surface during the chemical etching.

2.3. Chemical functionalization

The NanoSi surface was first degreased in acetone and isopropanol, rinsed with Milli-Q water and UV/ozone-treated (UV O Cleaner, Jelight Company, Inc., 4 mW/cm² at 220 nm) for 5 min to remove any organic contaminant on the surface and to generate surface hydroxyl groups. The NanoSi surface was then reacted with a 10⁻³ M solution of octadecyltrichlorosilane (OTS) in hexane for 16 h at room temperature in a dry nitrogen purged glovebox. The resulting surface was rinsed with CH_2Cl_2 , isopropanol and dried under a gentle stream of nitrogen.

2.4. Control of the wetting properties of the OTS-modified NanoSi surface

The OTS-terminated NanoSi surface displays a superhydrophobic character with a contact angle higher than 150°. A water droplet on the surface has a tendency to roll off. To allow analyte deposition, the contact angle was decreased down to ~120° via exposure of the OTS layer to UV/ozone irradiation for 3 min. This treatment allows performing a very uniform spot deposition of analytes avoiding the coffee staining effect [31]. Prior to mass spectrometry analyses, 0.5 μL of the analyte solution was directly deposited on the NanoSi surface.

2.5. Surface characterization

2.5.1. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Scanning Electron Microscopy (SEM) images were obtained using an electron microscope ULTRA 55 (Zeiss, France) equipped with a thermal field emission emitter and three different detectors (EsB detector with filter grid, high-efficiency In-lens SE detector, Everhart–Thornley secondary electron detector).

2.5.2. Contact angle measurements

Water contact angles were measured using deionized water. We used a remote-computer controlled goniometer system (DIGIDROP by GBX, France) for measuring the contact angles. The accuracy is $\pm 2^\circ$. All measurements were made in ambient atmosphere at room temperature.

2.6. Synthetic model peptides

Peptides were synthesized on the IBMM peptide synthesis platform using the conventional methodology of solid-phase peptide synthesis using Fmoc chemistry [41] and purified by preparative LC/MS (Autopurification system, Waters Milford, CA). The peptides were all prepared as C-terminal carboxylic acids and their sequences were designed to mimic proteolytic digests performed with either trypsin or Lys-N [42]. More details are found in the supporting information section. Peptides were dissolved in a mixture of acetonitrile and deionized water (30/70 v/v or 50/50 v/v) to a concentration of 10⁻² M. These two stock solutions were then diluted in a mixture of acetonitrile

and deionized water (30/70 v/v) or in water containing 1 mM of ammonium citrate in order to have final peptide concentrations of 10^{-3} M, 10^{-4} M and 10^{-5} M. In parallel, an aqueous peptide stock solution at a concentration of 10^{-3} M was also made in water containing 1 mM of ammonium citrate and diluted thereafter with the same solvent to reach the same final 10^{-4} M and 10^{-5} M concentrations.

2.7. Protein tryptic digestion

Trypsin was dissolved in PBS buffer and aliquoted at a concentration of 0.1 mg/mL. Proteins (Cytochrome C, β -Casein, Bovine Serum Albumin and Fibrinogen) were dissolved at the concentration of 0.1 mg/mL in 0.1 M ammonium bicarbonate, pH 8, and digested with trypsin (E/S:1/10; w/w) for 18 h at 37 °C. The protein digest solutions were purified over a C18 reversed-phase minicolumn filled in a micropipette tip, Zip-TipC18 (Millipore, Bedford, MA, USA), according to the manufacturer's manual (acetonitrile/H₂O, 60/40, v/v). They were then diluted twice in water containing 1 mM of ammonium citrate.

2.8. Mass spectrometry

Mass spectrometry analyses were performed on instruments located in the Laboratoire de Mesures Physiques of University Montpellier 2, IBMM platform of instrumentation. MALDI mass spectra were recorded on an Ultraflex III TOF/TOF instrument (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) equipped with LIFT capability. A pulsed Nd:YAG laser at a wavelength of 355 nm (85% focus) was operated at a frequency of 100 Hz (MS data) or 200 Hz (MS/MS data) with a delayed extraction time of 30 ns. The source was operated in the positive mode. Data were acquired with the Flex Control software and processed with the Flex Analysis software. Mass lists were generated according to the following parameters: centroid as peak detection algorithm, S/N threshold of 5, peak width of 0.5, peak height of 80%. The MS and MS/MS data recorded from protein digests were processed by the SavitzkyGolay smoothing algorithm (in MS: Width of 0.1/1 cycle, in MS/MS: Width of 0.2/2 cycles) and by TopHat baseline subtraction. A solution of the selected matrix was mixed with the peptide sample in equal amount and 0.5 μ L of this solution was deposited onto the MALDI target according to the dried droplet procedure. After evaporation of the solvent, the MALDI target was introduced into the mass spectrometer ion source. External calibration was performed with commercial peptide mixture (Calibration peptide standard 2, Bruker Daltonics, Wissembourg, France).

MS data were acquired under the following MS conditions. An acceleration voltage of 25.0 kV (IS1) was applied for a final acceleration of 21.95 kV (IS2). The reflectron mode was used for the TOF analyzer (voltages of 26.3 kV and 13.8 kV). Random laser irradiation was performed according to the partial sample mode with 10 shots/point. One acquisition was recorded from 50 shots corresponding to 5 irradiated positions. Mass spectra of peptides and protein digests were acquired from 250 to 500 laser shots, respectively; the laser fluence being adjusted for each studied sample (laser fluence 1). Ions were detected over a mass range from m/z 300 to 2000.

MS/MS data were acquired under the following conditions. An acceleration voltage of 8.0 kV (IS1) was applied for a final acceleration of 7.25 kV (IS2). The reflectron mode was used for the TOF analyzer (voltages of 29.5 and 13.9 kV). Mass spectra were acquired from 900 to 1000 laser shots, the laser fluence being adjusted for each studied peptide above the threshold for generation of molecular ions (Laser fluence 2 > Laser fluence 1). MS/MS experiments were performed under laser induced dissociation (LID) conditions with the LIFT cell voltage parameters set at 19.0 kV (LIFT 1) and 3.2 kV (LIFT 2) for a final acceleration of 29.5 kV (reflector voltage) and a pressure in the LIFT cell around 4×10^{-7} mbar. The precursor ion selector was set manually to the first monoisotopic peak of the molecular ion pattern for all analyses. For LID experiments, no collision gas was added (gas off spectra). For LID/CID experiments (gas on spectra), the same tuning was used but argon was allowed to fill the collision cell (pressure around 2×10^{-7} mbar).

2.8.1. MALDI analyses

Peptides were analyzed by MALDI mass spectrometry using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as matrix [10 mg/mL in water/acetonitrile (v/v, 70/30)]. 1 μ L of matrix solution and 1 μ L of analyte solution were mixed and 0.5 μ L of the mixture was deposited onto the MALDI plate.

2.8.2. LDI analyses

To perform LDI analyses on NanoSi surfaces, a standard MALDI plate was modified to create cavities that can each accommodate a NanoSi chip as shown in the supplementary information section (Scheme S1). A very accurate laser micromachining of the MALDI plate surface is compulsory to precisely control the cavity dimensions. Two modified MALDI plates were used throughout this study, one kindly given by Dr W. Boireau from the FEMTO Institute (Besançon, France) and one purchased from Meca-Innov' (Rioz, France). Conductive adhesive tape was used to glue the corners of the NanoSi chips onto the adaptor. Prior to analysis, 0.5 μ L of analyte solution was directly deposited on the NanoSi chip. The NanoSi plate can be successively washed with methanol and n-hexane under planetary motion followed by air-drying (no detected ions after washing) and reused one time but the analysis performance is greatly affected (lower sensitivity). Since the cost of the NanoSi plate is fairly low (15 € for a chip of 3 in²), it is not worth reusing them.

3. Results and discussions

3.1. Sample design

In order to cover the structural diversity of peptide sequences obtained from protein digestion in proteomic workflows, 65 peptides were synthesized with masses ranging from 380 Da (4 residues) to 1700 Da (13 residues). The study was restricted to relatively short chains since SALDI-MS is known to best respond to low molecular weight compounds [11] that are usually not efficiently detected by conventional MALDI-MS. The peptide set was divided into two categories: 49 proteolytic

Table 1 – Synthetic peptide database.

Entry	Sequences	M (g/mol)	Entry	Sequences	M (g/mol)
<i>Tryptic peptides</i>			<i>Lys-N peptides</i>		
P(1)	PICAK	530.29	P(A)	KGFCL	566.29
P(2)	SEGFK	566.27	P(B)	KAFHLG	671.38
P(3)	VTEFK	622.33	P(C)	KAFHLG	671.38
P(4)	FAQIR	633.36	P(D)	KAFLRG	690.42
P(5)	AGVDGPK	642.33	P(E)	KAFRLG	690.42
P(6)	VTEFR	650.34	P(F)	KYPFEAL	866.45
P(7)	AGVDGPR	670.34	P(G)	KMVNLHIQ	981.54
P(8)	DIGLVR	671.40	P(H)	KADFPQLMV	1047.54
P(9)	SWAMVK	720.36	P(I)	KEDFPQLMV	1105.55
P(10)	TPSSVLK	730.42	P(J)	KYIWLRAV	1134.86
P(11)	SWAMVR	748.37	P(K)	KEAHMTIVFCSA	1335.63
P(12)	AVGKKKK	757.52	P(L)	KSWDTLCMAGRF	1413.65
P(13)	MWAENK	777.35	P(M)	KWFGMLADQATYN	1543.71
P(14)	YICPADK	808.38	P(N)	KATCGRVNSASMYDAI	1685.79
P(15)	WLIAGDR	829.44	<i>Miscellaneous peptides</i>		
P(16)	YICPADR	836.39	M1	GVAL	358.22
P(17)	LGHAEVR	877.48	M2	AFAL	420.24
P(18)	YDTSIVQK	952.49	M3	AFALV	519.31
P(19)	YDTSIVQR	980.49	M4 ^a	AFALVG	575.34
P(20)	AFISVGPLAR	1029.60	M5 ^a	VTEFK	621.35
P(21)	CASHTFLVR	1032.52	M6 ^a	GVLFAVA	674.41
P(22)	LMYVHWVK	1074.57	M7 ^a	LAVGIAR	697.46
P(23)	NGFLMCSALK	1082.53	M8 ^a	FPALVPI	754.47
P(24)	LMYVHWVR	1102.58	M9 ^a	FPAFADR	821.42
P(25)	PGAHWEAGAK	1135.58	M10 ^a	PFVDRVY	893.48
P(26)	VEYLASITLK	1135.65	M11 ^a	AVISVGKDAF	954.55
P(27)	GNGQIVFHAR	1168.61	M12	GEVAVLGHMK	1039.55
P(28)	GHLPTVSENAR	1179.60	M13	WGVYAPLFD	1066.51
P(29)	WGVYAPLFDK	1194.61	M14 ^a	WFAPPRVGYL	1203.66
P(30)	ADPNYHIGETK	1243.58	M15 ^a	FAFAMVGPLAEYK	1441.74
P(31)	MLQYGMFVER	1272.60	M16	GVAFGGVHMALGHFTA WVK	1984.36
P(32)	LES MGVD FNANK	1323.61			
P(33)	AEQVPLGSYDTGK	1363.66			
P(34)	QLDFGEVLANTGR	1418.72			
P(35)	IWDPSNLIAQPTK	1481.79			

^a C-terminal amidated peptides.

peptides and 16 miscellaneous sequences listed in Table 1. In the former subset, 35 peptides were C-terminated by an arginine or lysine mimicking tryptic peptides [Entries P(1) to P(35) in Table 1] and 14 peptides were N-terminated by a lysine residue to simulate Lys-N proteolysis [42] [Entries P(A) to P(N) in Table 1]. All amino acids were chosen in the designed sequences to ensure a global residue composition for the synthetic model peptides collection similar to the amino acid occurrence in natural proteins as shown in the Supplementary data (Scheme S2). Moreover, the hydrophobicity of the prepared peptides was evaluated by reversed-phase liquid chromatography [43] to check that both polar and relatively non-polar sequences were present in the prepared collection with short and long retention times, respectively, as shown in Scheme 1. For the miscellaneous peptides [Entries M(1) to M(16) in Table 1], some of them were prepared as C-terminal amide as part of an ongoing project on amidated proteins in the laboratory, their MS behavior being very similar to their carboxylic acid counterparts [44].

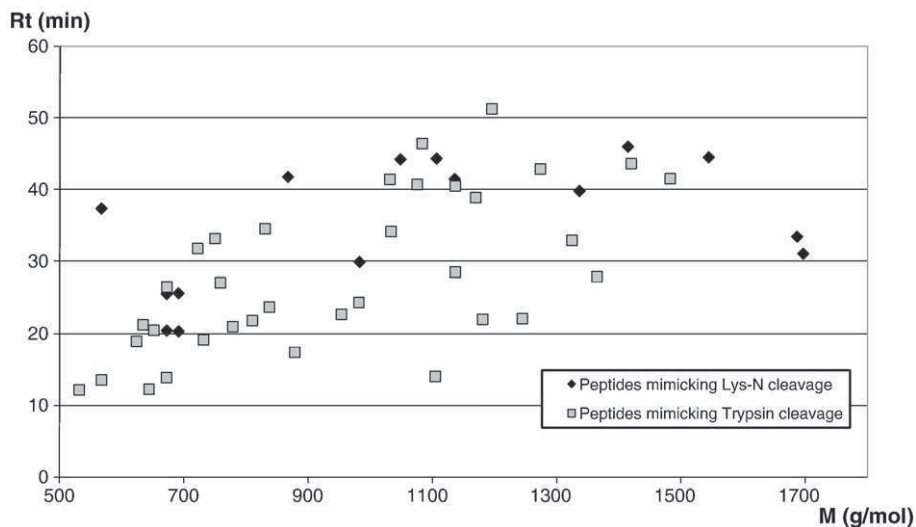
From this peptide dataset, 7 equimolar mixtures containing each 5 tryptic peptides of increasing molecular weight were prepared to appreciate the extent of spectral discrimination

due to competing ionization. The results gathered with these artificial mixtures were then completed by the analyses of real tryptic digests issued from the proteolysis of BSA, Cytochrome C, β -Casein, and Fibrinogen.

3.2. Nanostructured silicon surface design

The nanostructured silicon (NanoSi) surfaces investigated in this work are prepared by chemical etching of p-type <100> crystalline silicon wafer in $\text{NH}_4\text{F}/\text{HNO}_3/\text{AgNO}_3$ aqueous solution at room temperature (Scheme 2). During silicon etching, large quantities of silver particles and dendrites are produced by the galvanic displacement reaction. Chemical dissolution of the silver structures in HNO_3/HCl aqueous solution at room temperature reveals the silicon nanostructures. The technique displays several advantages, as it takes place at relatively low temperature and can be performed on a wafer scale.

As seen on SEM images displayed in Fig. 1, the surface morphology consists of two layers, the lower layer displaying a sponge-like structure with ~900 nm of height whereas the top layer presents a dense layer of nanostructures of height

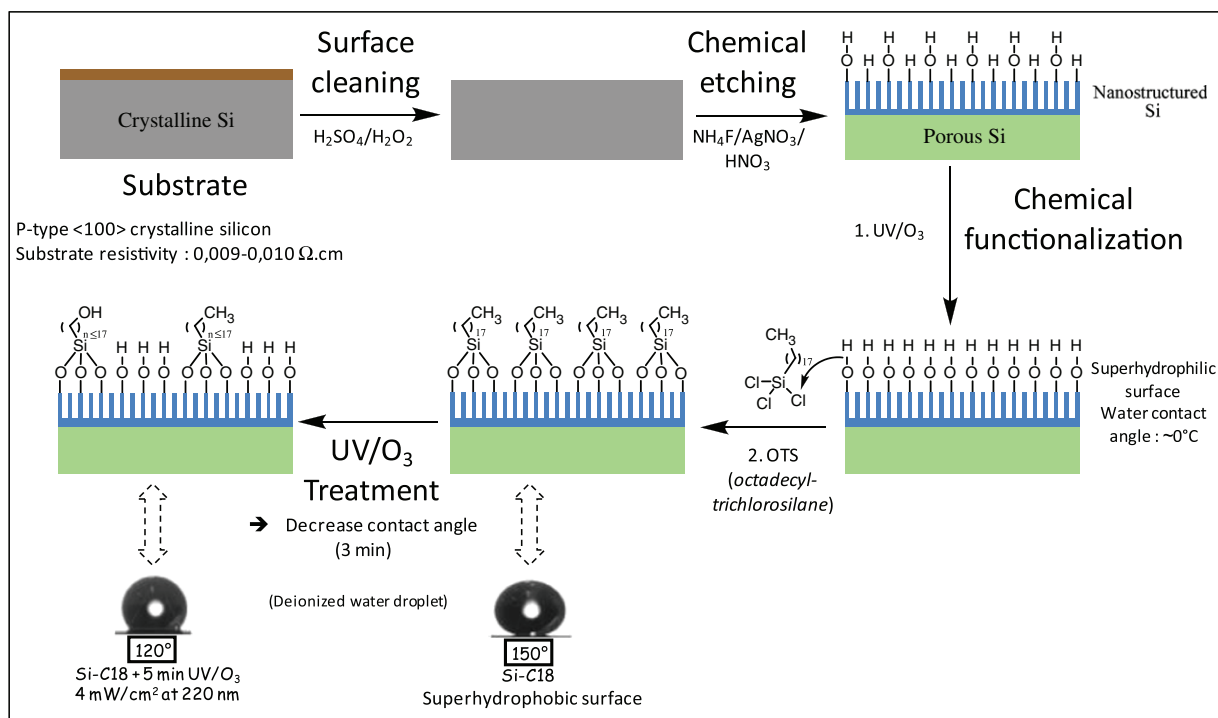


Scheme 1 – Retention times in RP-HPLC-MS of the designed peptides.

of 250 nm and widths ranging from 20 to 60 nm. The resulting surface consists of a black layer of silicon nanostructures with anti-reflective properties (reflectivity <3% at 355 nm).

The as-prepared NanoSi chips are superhydrophilic with a static contact angle $\sim 0^\circ$. A liquid droplet deposited on the surface tends to wet completely the surface and thus limiting its performance in LDI-MS analysis. To control the wetting properties of the surface and to limit droplet spreading, the NanoSi surface was chemically functionalized with octadecyltrichlorosilane (OTS). The resulting OTS-terminated NanoSi surface displays a superhydrophobic character with a contact angle higher than 150° . A water droplet deposited on this

surface tends to roll off, making difficult the deposition of analyte sample. The superhydrophobic surface was subsequently subjected to UV/ozone treatment to reach a final contact angle of 120° . Indeed, depending on the surface wetting properties, the solvent solubilizing the peptides i.e. water or water/acetonitrile, must be adjusted accordingly either to avoid the drop rolling or, on the contrary, the drop spreading. In the case of severe drop repulsion from the surface (“rolling ball effect”), the sample failed to be deposited i.e., the droplet has the tendency to roll off the surface. However, when a quantity of organic solvent is added to water, that will lead to lowering the surface tension of the droplet of analytes



Scheme 2 – Workflow of NanoSi interfaces preparation.

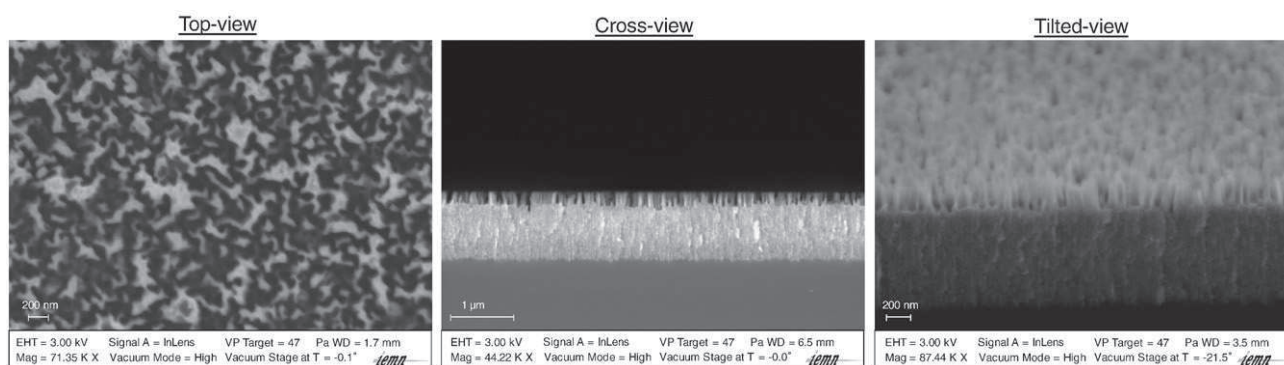


Fig. 1 – SEM images of the NanoSi used for MS and MS/MS analyses with top, cross and tilted views.

and then to the spreading of the compound on a rather large area diminishing its local concentration for further LDI-MS analysis. Sample deposition can thus be troublesome in these extreme cases if the proper adequacy between surface wetting properties and the surface tension of the deposited droplet was not found.

From a general point of view, these home-made interfaces are rather cheap, easy to fabricate with no need of specific equipment, easy to scaling-up for mass production, easy to cut in smaller pieces on demand, limiting their exposition to air contaminations and can be directly attached by electrically conductive adhesive tape to a conventional MALDI plate holder due to the very small material thickness ($380 \pm 25 \mu\text{m}$). Another alternative consists in excavating a MALDI target with cavity sizes corresponding to the area of the prepared interfaces, conventional MALDI and NanoSi LDI experiments can thus be conducted on the same plate as shown in the supplemental information section (Scheme S1).

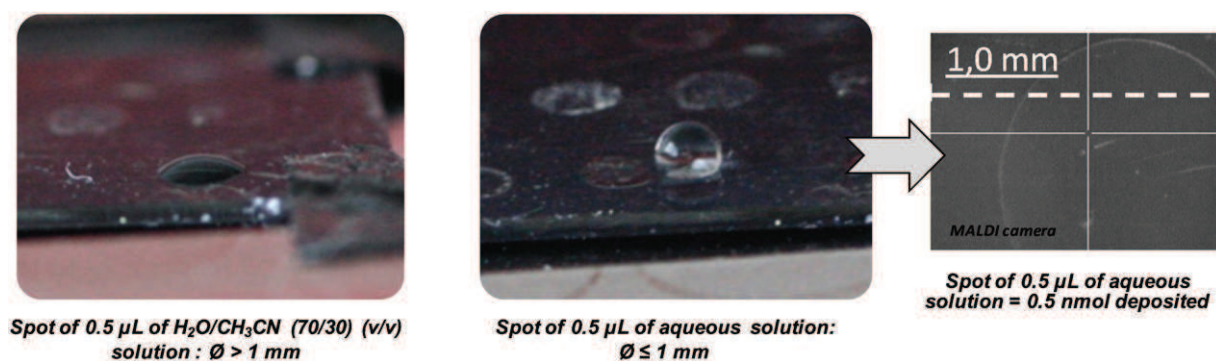
3.3. Evaluation of NanoSi performances for peptide detection by LDI-MS

Several aspects of sample deposition and data acquisition from the prepared NanoSi interface were questioned.

3.3.1. Solvent

First of all, the nature of the solvent solubilizing the peptides was carefully examined in order to select a reproducible efficient sample droplet deposition. Indeed, the more the peptide was

concentrated on a small area the most effective was the ionization yield. Formation of ‘hot spots’ within the deposit, indicating a nonhomogeneous sample localization, was also decreased. Besides, a facile deposit with the drop being stuck at once onto the interface without rolling all over (known as the “rolling ball effect”) ensured a controlled experimental protocol required for a robust analytical method. Ammonium citrate aqueous solutions (10^{-3} M) with a varying percentage of acetonitrile (organic content from 0 to 30%) were checked as solvents. Preliminary studies undertaken with 29 peptides presenting very different sequences showed that the amount of water in the final deposited solution was crucial. High water content in the deposited droplet allowed producing a tiny spot after drying with an increased relative peptide concentration and subsequent improved desorption/ionization performance. However, to ensure complete solubilization of all peptides, especially the most hydrophobic ones, a stock solution at 10^{-2} M was prepared in a mixture of water/ammonium citrate and acetonitrile ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 50/50, v/v), which was then diluted to the required concentration in $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (70/30, v/v). The same behavior was also observed when starting with stock solutions in aqueous acetonitrile at a 70/30 volumic ratio, indicating that all studied peptides were still soluble with a low content of organic solvent. Although the LDI-MS responses of such samples were very encouraging, producing mass spectra better than the ones recorded from silica gel in terms of S/N and sensitivity (data not shown), the deposition of such solution onto the NanoSi target still provided a rather enlarged droplet as seen in Scheme 3. Restricting the size of the spot should improve the detection sensitivity by increasing the ionization



Scheme 3 – Droplet deposition according to two different solvent conditions.

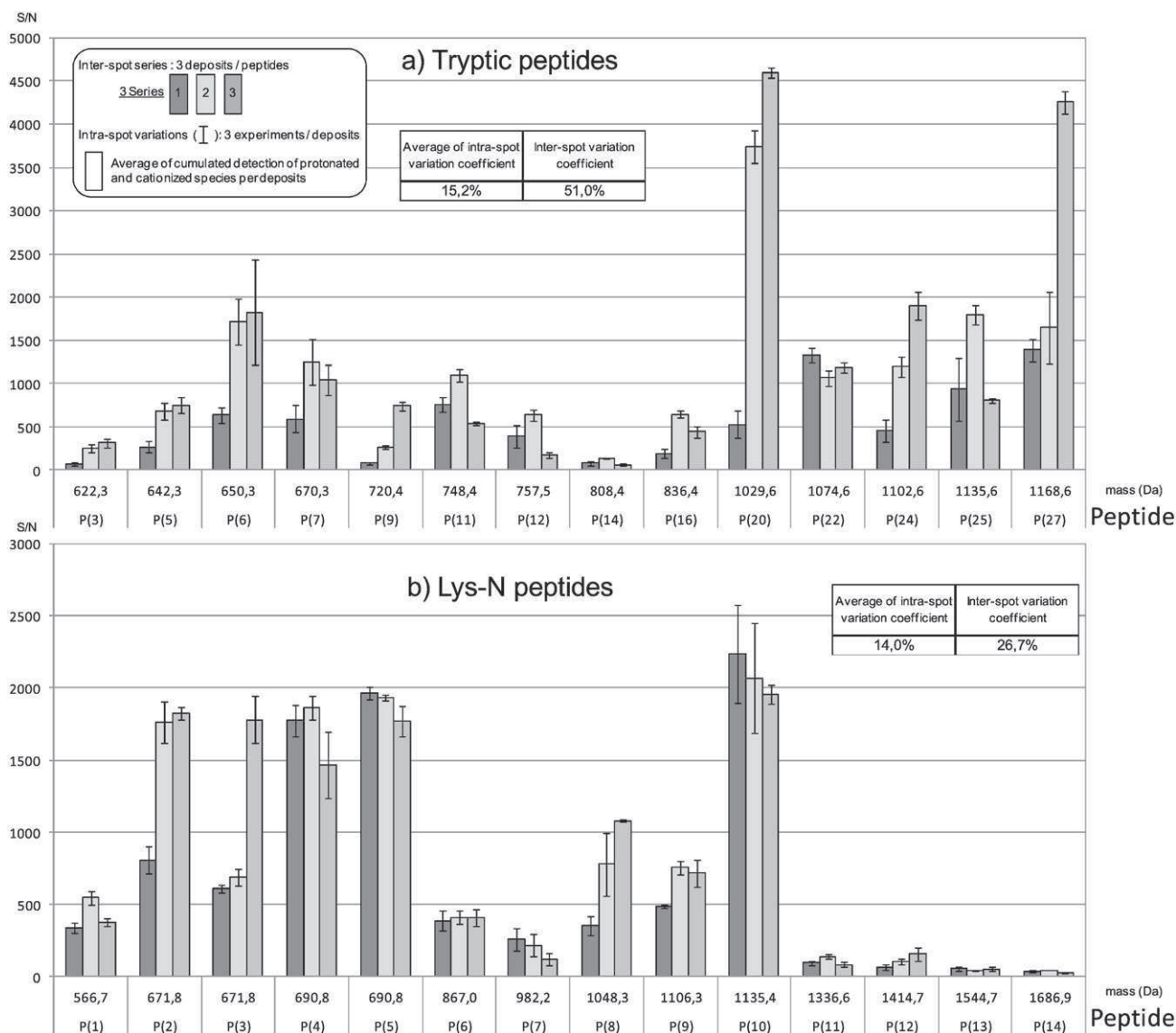


Chart 1 – Evaluation of the repeatability on intra-spot and inter-spot analyses from a) 15 tryptic peptides and b) 14 Lys-N peptides.

yield. To pursue that goal, the organic solvent was completely removed from the protocol to work only with aqueous samples from more diluted stock peptide solutions (10^{-3} M). As expected, the sample was easy to drop onto the NanoSi interface leading to a concentrated peptide deposit after drying, as demonstrated in Scheme 3.

3.3.2. Ionization additive

Since the addition of a chemical in the sample solution to be analyzed by LDI-MS was sometimes reported in the literature [45], we investigated the effect of an additive on the laser desorption/ionization yield. An array of frequently used organic compounds such as citric acid (10^{-3} M), ammonium citrate (10^{-3} M) and trifluoroacetic acid (0.1%, volumic ratio) were tested in aqueous media at concentrations commonly reported in the literature [31,45] on the LDI response of a few model peptides, keeping in mind that these additives must not produce ions in the low mass range of the mass spectra. Overall, from

these three sets of experiments, an aqueous solution of ammonium citrate at 10^{-3} M provided the best results and was then systematically used to make the peptide solutions to be analyzed by LDI-MS on inert surfaces. The sensitivity and reproducibility of the LDI detection from the studied NanoSi samples were then examined under the established sample deposition protocol.

3.3.3. Dynamic range and sensitivity

Among all available peptides, a selection of 15 tryptic sequences covering a mass range from 600 to 1200 Da was subjected to LDI-MS to probe the detection limit. First of all, it must be stated that the laser fluence to detect the peptides at all studied concentrations from the NanoSi substrates was rather low and similar to the ones used in conventional MALDI-MS for the same compounds (Fig. S1 in Supplementary data). From preliminary studies, we found that NanoSi LDI mass spectra for peptides with masses superior to 1200 Da

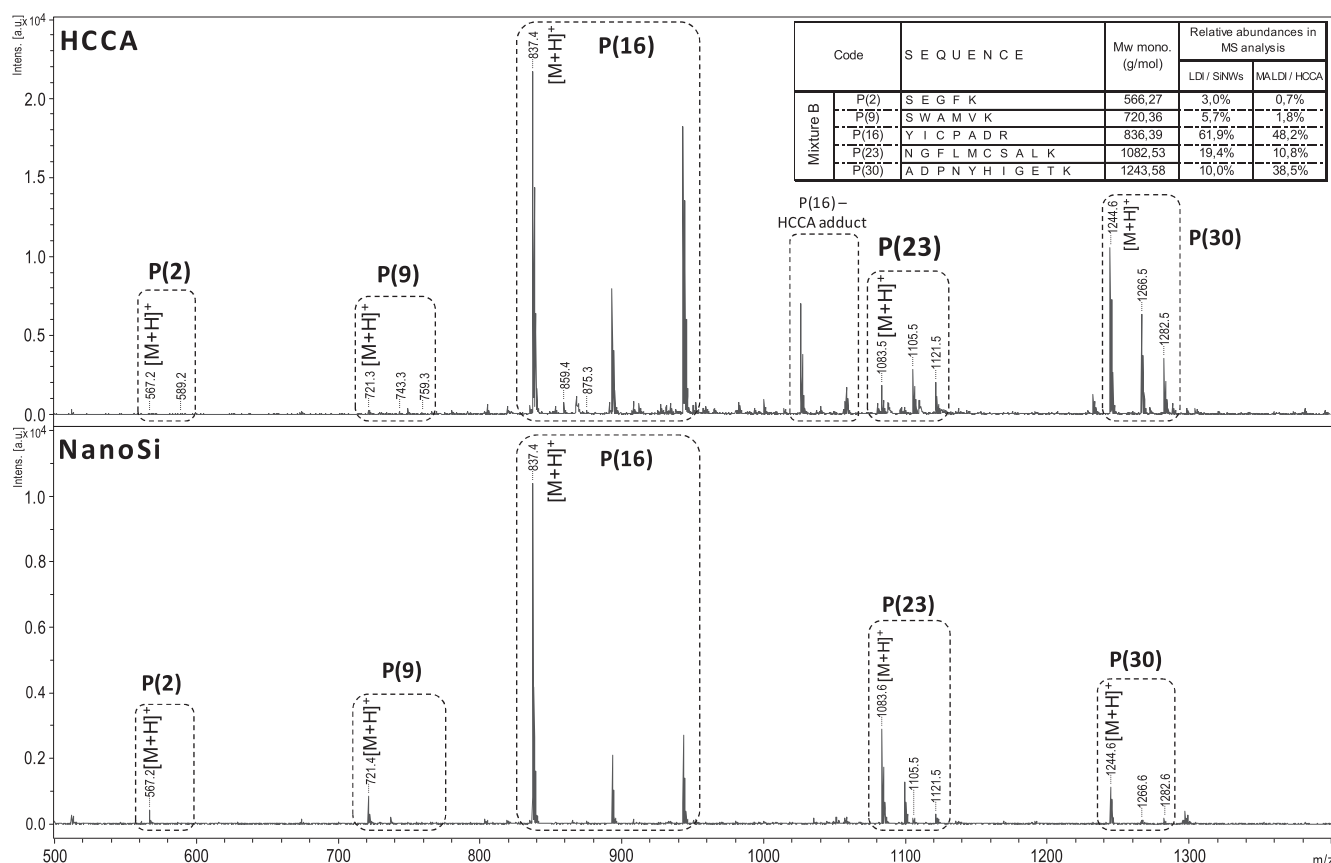


Fig. 2 – MALDI/HCCA and LDI/NanoSi MS spectra of peptide mixture B (5 pmol/peptides).

were more difficult to record, explaining why the heavy peptides were not considered. The detection response for such medium to high mass peptides was highly sequence dependent, tryptic sequences responding far better than Lys-N peptides. Samples obtained by dilution of a stock peptide solution in acetonitrile/water (30/70, v/v) providing concentrations from 10^{-3} M to 10^{-7} M (from 500 pmol to 50 fmol deposited on the inert surface for aliquots of 0.5 μ L) were analyzed with and without ammonium citrate. Taking into account that only signals presenting at least a signal to noise ratio superior to 5 were considered to guarantee nonbiased ion finding of known compounds, the observed low detection limit was different for the two dilution conditions. The most concentrated solutions (10^{-3} M) gave rise to very intense signals but without any detector saturation, indicating that the upper detection limit was not reached for nanomolar deposited quantities. Regarding the lower limit, 50 pmol of nearly all peptide solutions was detected in aqueous conditions (acetonitrile/water, 30/70, v/v). Only half of them were still observed when diluted by a factor 10 (5 pmol deposited). The addition of ammonium citrate and the high water content (70%, v/v) significantly increased the sensitivity detection down to 5 pmol for all selected sequences. Under that condition, even 100-time diluted peptide samples (50 fmol deposited) still showed acceptable detection responses (8/15 analyzed peptides) showing that such additive really improved the peptide ionization yield by a factor of 100. Finally,

although the ionization efficiency was found to be highly sequence-dependent, some peptides being detected at very low concentrations (<1 fmol deposited), a mean response has been estimated around 500 fmol for miscellaneous peptide detection in LDI-MS from the prepared NanoSi substrates. This level of sensitivity ensured to observe very clean isotopic distribution of molecular ions with relative abundances well above the noise threshold. Although lowering the S/N limit from 5 to 3 enabled to detect more diluted peptides, such nondiscriminative condition would certainly affect the reliability of signal detection in the case of unknown peptides.

3.3.4. Reproducibility

Further investigations on the same 15 tryptic peptides were performed to assess the robustness of the LDI-MS method on the studied NanoSi. The reproducibility of analyses carried out from different batches of the prepared NanoSi interface was first tested at 3 levels of concentration for samples containing ammonium citrate (5 pmol, 500 fmol and 50 fmol deposited for high, medium to low quantities determined according to the formerly established detection dynamic range). It has been noticed that fresh peptide solutions prepared prior to the LDI-MS experiments were preferred since better results were always obtained compared to stored samples either at 4 $^{\circ}$ C or -20 $^{\circ}$ C. Reproducible analyses at the fmol level (50 fmol) were achieved for the studied surface. These results confirmed that the

Table 2 – Average relative response of peptides in mixture analysis from MALDI/HCCA and LDI/NanoSi.

7 Mixtures with peptides compiled according to their m/z values	Average of relative abundance in LDI — NanoSi	Average of relative abundance in MALDI — HCCA
7 Peptides (530–670)	11%	5%
7 Peptides (671–808)	12%	9%
7 Peptides (829–1032)	32%	38%
7 Peptides (1074–1179)	29%	23%
7 Peptides (1194–1481)	17%	25%
S/N cumulated	21,204	22,598
Average error on MH+ measurement (ppm)	25.17	40.72
% laser (average)	15%	13%

interface preparation was perfectly mastered, leading to materials with controlled surface properties.

3.3.5. Repeatability

The repeatability with experiments conducted from the same surface analyzed several times was explored for 5 pmol peptide solutions containing ammonium citrate. This concentration was chosen to ensure the detection of high mass peptides ($m/z > 1200$ Da). Results are summarized in Chart 1. To assess the inter-spot and intra-spot signal intensity variation, 3 deposits analyzed once and 3 analyses on the same spot were realized, respectively. The laser was shot randomly throughout the deposits. In addition to the selected 15 tryptic peptides (Chart 1a), another batch of 14 peptides mimicking

Lys-N digestion (Chart 1b) were also included in this workflow to ensure a broad scope of the LDI-MS detection not biased by the peptide sequence type. Overall, 261 analyses have been performed showing a very limited intra-spot variation but a higher discrepancy between deposits. This latter remark could be explained by some partial degradation of peptide solutions upon storage, from surface contamination for these long-lasting experiments or from structural variations in the overall surface morphology. Nevertheless, the good intra-spot repeatability guarantees non-biased detection responses even in automated acquisition mode with random laser irradiation.

3.3.6. Analysis of peptide mixtures

To avoid peptide sequence redundancy, we chose to gather peptides of very different molecular weights from our tryptic peptide collection. Seven mixtures containing each equimolar quantity of 5 peptides were designed as described in Table S1 in the Supplementary data. The simultaneous analyses with the same MALDI-TOF/TOF instrument of the 7 mixtures from HCCA matrix and from the NanoSi interface allowed comparing the detection of the peptide molecular ions in both techniques. First of all, discrimination in peptide detection was evidenced for the two techniques. As expected, LDI-MS on NanoSi was better for the detection of small molecules whereas MALDI from HCCA deposit was more adapted to the detection of heavier peptides as shown in Fig. 2 for a peptide mixture. The average relative abundances for 5 sets of peptides that were grouped according to their molecular weight (Table 2) clearly confirmed such specific detection behavior (the results for all mixtures are gathered in Table S1 in the Supplementary data). It should

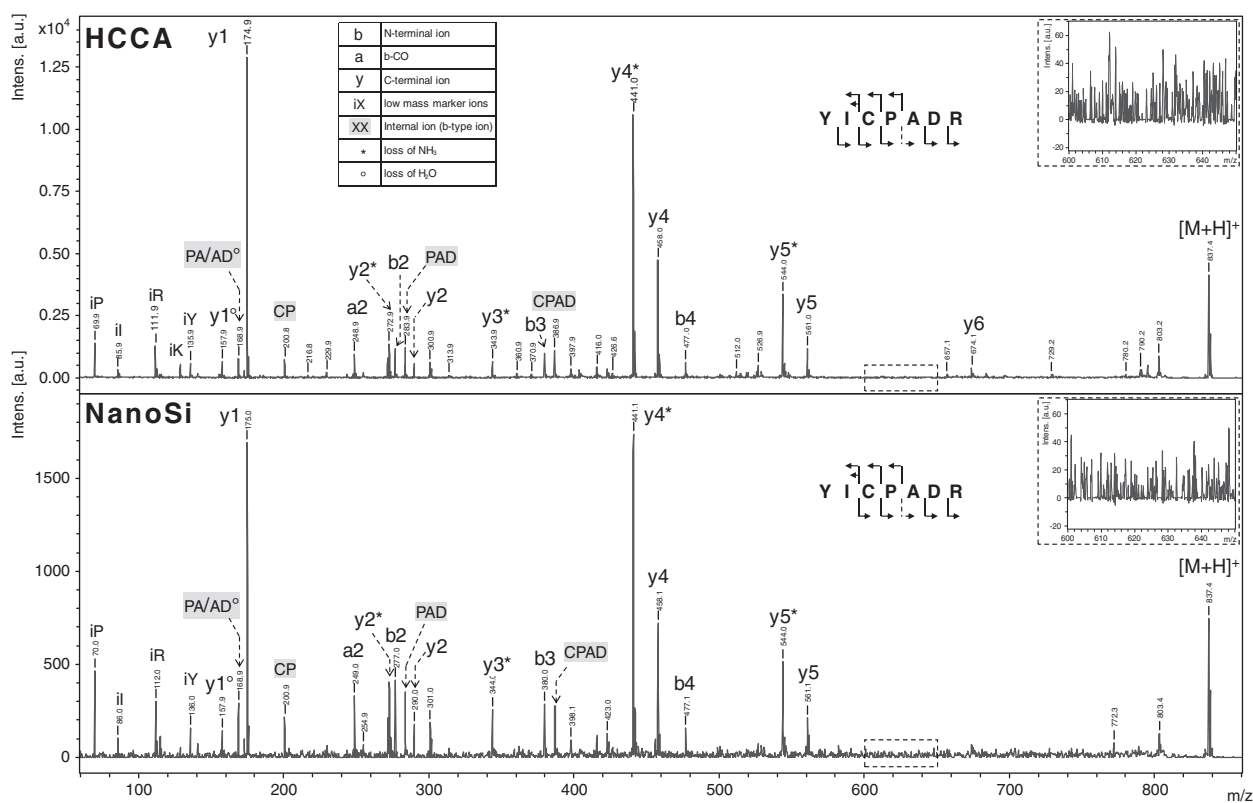
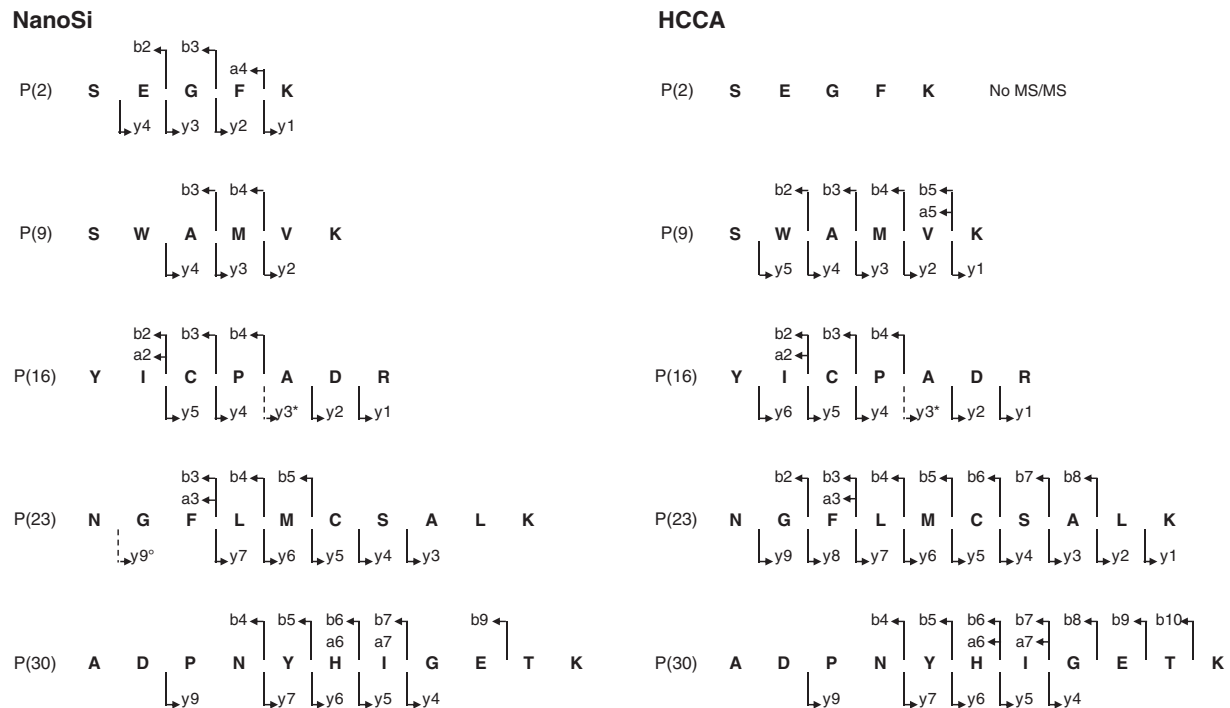


Fig. 3 – MALDI and LDI MS/MS spectra of the $[M+H]^+$ precursor ion of peptide P-16 (YICPADR) from peptide mix 8.



Scheme 4 – Illustration of sequence coverage in peptide sequencing for mixture B by LDI/NanoSi- and MALDI/HCCA-MS/MS.

be noticed that some peptides were very reluctant to be desorbed and ionized when present as part of mixtures in both MALDI and LDI conditions even if they provided very good MS data when analyzed pure as previously described. It is thus very difficult to define a limit for peptide detection since the

method sensitivity greatly depends on the complexity of the sample. Despite the fact that 500 fmol was ascertained as the required deposited quantity for informative LDI on NanoSi mass spectra acquisition whatever the studied peptide sequences, handling mixtures surely affects this mean response.

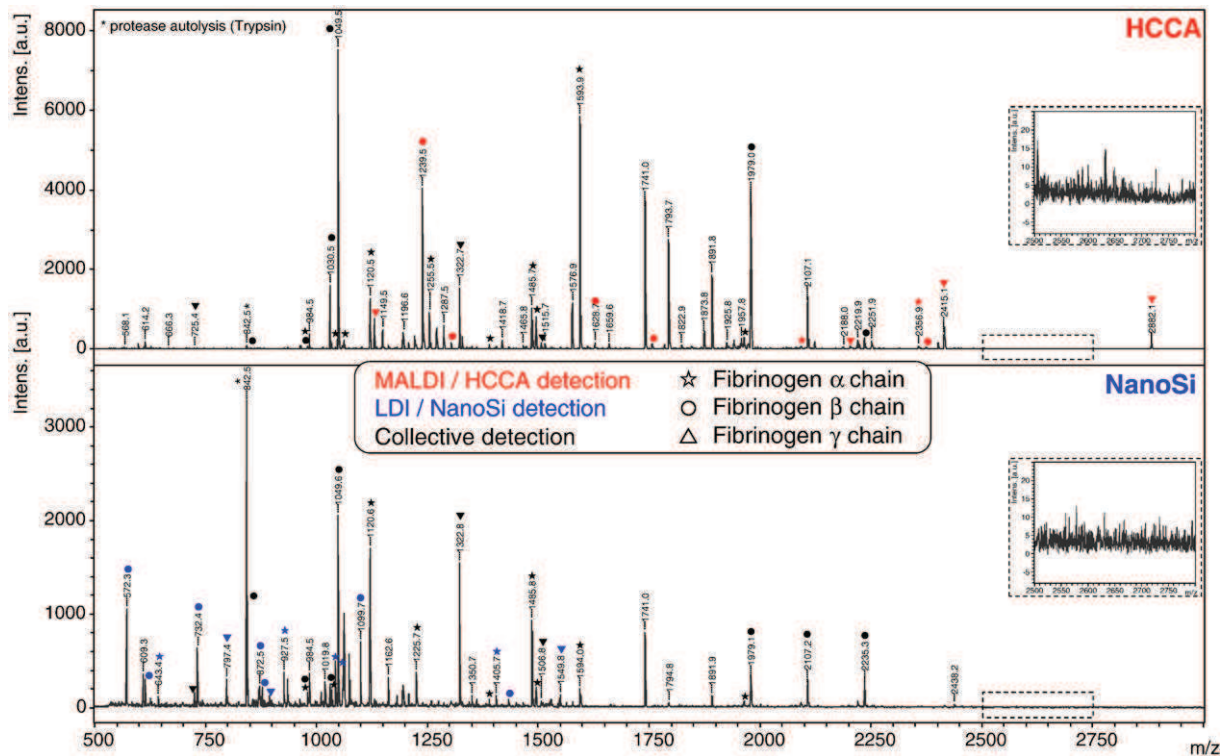


Fig. 4 – MALDI/HCCA and LDI/NanoSi MS spectra of Fibrinogen tryptic digest (75 fmol).

MALDI / HCCA detection
LDI / NanoSi detection
Collective detection
No detection

Fibrinogen
α chain

1	MFSVRDLCLV	LSLVGAIK	EGSDPPSGDF	LTEGGGVRGP	RLVERQQSAC
51	KETGWFFCSQ	EDWNTKCP	CRMKGLIDEV	DQDFTSRINK	LRDLSLFNYQK
101	NSKDSNTLTK	NIVELMRGDF	AKANNNDNTF	KQISEDLRSR	IEILRRK
151	QVORIKVLQK	NVRDQLVDMK	RLEVDIDIKI	F	RCKGSCSRA
201	NQKQLEQV	I	AINLLPSRD	IOYLPLIKMS	TTTGVPVRF
251	WKALLEMQQT	F	MVLETFGGD	GHARGDSVSQ	GTGLAPGSPR
301	NPGSYGPGSS	GTWNPGRPEP	GSAGTWNPCR	PEPGSAGTWN	PGRPEPGSAG
351	TWNPGRPEPG	SAGTWNPCR	EPGSAGTWN	GSSGSSSFRP	DSSGHGNIRP
401	SSPDWGTFRE	EGSVSSGTQK	EFHTGKLVTT	KGDKELLIDN	EK
451	TR	SCSKVIT	KTVTNADGR	T	ETTKEVVKSE
501	NLDDFFHRDK	DDFFTR	SSSHE	FDGRTGLAPE	FAALGSESGS
551	FVSSSTTVNR	GGSAIESKHF	KMEDEAESLE	DLGFKGAHGT	QKGHTKARPA
601	GIHTSPLGE	PSLTP			

Fibrinogen
β chain

1	QFPIDYDEGQ	DDRPKVGLGA	RGHRPYDKK	EEAPSLRVP	PPISGGGYRA
51	RPATATVGQK	KVERKPPDAD	GCLHADPDLG	VLCPTGCKLQ	DTLVRORPI
101	R	SIEDLRNT	VDSVSR	TSSS	TFQYITLLKN
151	SHLEK	QLYI	DETVKNNIPT	KLRVLR	SILE
201	RTPCTVTCNI	PVVS	GKECEK	IIRNEGETSE	MYLIQPEDSS
251	TEKGGWTVIQ	NRQDGSVDFG	RKWD	PYKQGF	GNIA
301	LGNDR	SQLT	NMGPTKLLIE	MEDWKGDKVT	ALYEGFTVQN
351	KYKGTAGNAL	IEGASQLVGE	NRTMTIHNSM	FFSTYDFDND	GWKTTDPRKQ
401	CSK	EDGGGW	YNR	CHAANPN	GRYWGGAYT
451	WYSMKKMSMK	IRPYFPEQ			

Fibrinogen
γ chain

1	MSWSSHPSPV	IFYILSLESS	ACLAYVATRD	NCCILDERFG	SYCPTTCGIA
51	DPLNNYQTSV	DKDLRTLBI	LYQVENKTSE	ARELVK	AIQI
101	NNIESATK	IS	KSMMEIIMKY	ETLISTHES	IR
151	KVVQLEANCQ	EPCQDTV	IH	DVTGRDCQDV	ANKGAP
201	FLVYCEIDGS	GNGWTVFOKR	LDGSLDFKKN	WIQYKGGFGH	LSPTGTGNT
251	FWLGNEKIHL	ISTQSSIPYV	LR	IQLEDWNG	RTSTADYASF
301	LTAYFIGGD	AGDAFDGYDF	GDDSSDK	FT	SHNGMQFSTW
351	CAEQVIGIWW	MNKCHAGHLN	GVYYQGGTYS	KTSTPNGYDN	GIIWATWKR
401	WYSMKKTK	IPLNRLAIG	EGQQHQLGGA	KDVGVEHVE	TEYD

	Total number of peptides assigned	Number of amino acids spanned by the peptides assigned	Number of amino acids of the sequence length	Sequence coverage
α chain				
MALDI/HCCA detection	15	124		20,2%
LDI/NanoSi detection	17	145	615	23,6%
Collective detection		167		27,2%
β chain				
MALDI/HCCA detection	13	94		20,1%
LDI/NanoSi detection	13	88	468	18,8%
Collective detection		133		28,4%
γ chain				
MALDI/HCCA detection	8	99		22,3%
LDI/NanoSi detection	8	64	444	14,4%
Collective detection		132		29,7%

Scheme 5 – Sequence coverage from MALDI/HCCA and LDI/NanoSi MS spectra of Fibrinogen tryptic digest (75 fmol).

The analysis of proteolytic digests and the overall detection sensitivity with LDI-MS on NanoSi will thus be conditioned by the ability of specific sequences to be preferentially desorbed and ionized from the peptide mixture.

3.4. Evaluation of NanoSi performances for peptide sequencing by LDI-MS

To verify that such NanoSi LDI-MS method could be applied for proteomic analysis, one needs to both detect and sequence the recorded ions from complex mixtures in the usual standard

working concentration conditions (i.e. femtomolar range). As a proof of concept, two sets of experiments were conducted. Pure peptides were first examined, followed by synthetic peptide mixtures each containing 5 sequences of different masses.

3.4.1. Pure peptides

LDI-MS/MS experiments from a series of 15 tryptic and 14 Lys-N peptides deposited on the NanoSi interfaces were performed and the data were compared with those recorded in MALDI-TOF/TOF using HCCA as organic matrix. Obviously, the peptides

that were detected with difficulties in LDI-MS (Lys-N peptides with $m/z > 1200$ Da, see Chart 1b) could not be sequenced. Apart from that constraint, very analogous MS/MS spectra were obtained from inert NanoSi support and HCCA deposit (Fig. S2 in Supplementary data). The NanoSi LDI-TOF/TOF method was thus sufficiently resourceful to be probed as a viable alternative and/or complementary strategy to MALDI-TOF/TOF peptide mass fingerprinting.

3.4.2. Artificial peptide mixtures

For all detected protonated ions, the MS/MS stage was conducted meaning that on a single deposit many MS experiments were performed in the raw. The method sensitivity was thus of utmost importance for such strategy. The performances of LDI-MS/MS from NanoSi interface were assessed according to the similarity of the MS/MS spectra from reference data recorded as aforementioned from the pure peptides and to the sequence coverage deduced from the recorded ions. Very promising results were obtained from these MS and consecutive MS/MS analyses indicating that LDI-TOF/TOF conducted from NanoSi were sensitive enough to allow both detection and sequencing on a single spot while being as informative as conventional MALDI-TOF/TOF from HCCA matrix for reliable fragmentation. This result is illustrated in Fig. 3 for the dissociation of one peptide of mixture B [P(16), detected at m/z 837.4 in Fig. 2] upon LDI-TOF/TOF and MALDI-TOF/TOF. Besides, having performed MS/MS experiments for all detected peptides of mixture B in general produced very similar sequence coverage in both techniques as summarized in Scheme 4. As expected,

the smallest peptide [P(2), detected at m/z 567.3 in Fig. 2] was only successfully fragmented from the NanoSi surface, with the detection of the whole y ion series, whereas the very low ion abundance from HCCA matrix deposit was not sufficient for sequencing. For all analyzed mixtures, Table S1 of the Supplementary data presents the detected peptides that were successfully fragmented in both LDI and MALDI MS/MS experiments. Small peptides were better sequenced in LDI-MS/MS whereas heavy chains were better dissociated in MALDI-MS/MS. The next step was then to tackle real tryptic digests.

3.5. Proteomic digests: fingerprinting and sequencing by LDI-MS/MS on NanoSi surface

The four protein digests that were analyzed on the NanoSi by LDI-MS strategies showed efficient peptide mass fingerprinting. Samples were diluted with an ammonium citrate solution (1 mM) after ZipTip desalting and then, these protein digest solutions (H_2O +ammonium citrate 1 mM/acetonitrile, 70/30, v/v) were deposited twice with aliquoted volumes of 0.5 and 1 μ L, respectively. The deposited quantities on the NanoSi surfaces depended on the protein molecular weight and aliquoted volume: 4 and 2 pmol for Cytochrome C, 2 and 1 pmol for β -Casein, 750 and 350 fmol for BSA and 150 and 75 fmol for Fibrinogen.

The protein digests behaved similarly as synthetic peptide mixtures in LDI-MS and MALDI-MS. As observed previously, the low-mass sequences were better detected from NanoSi

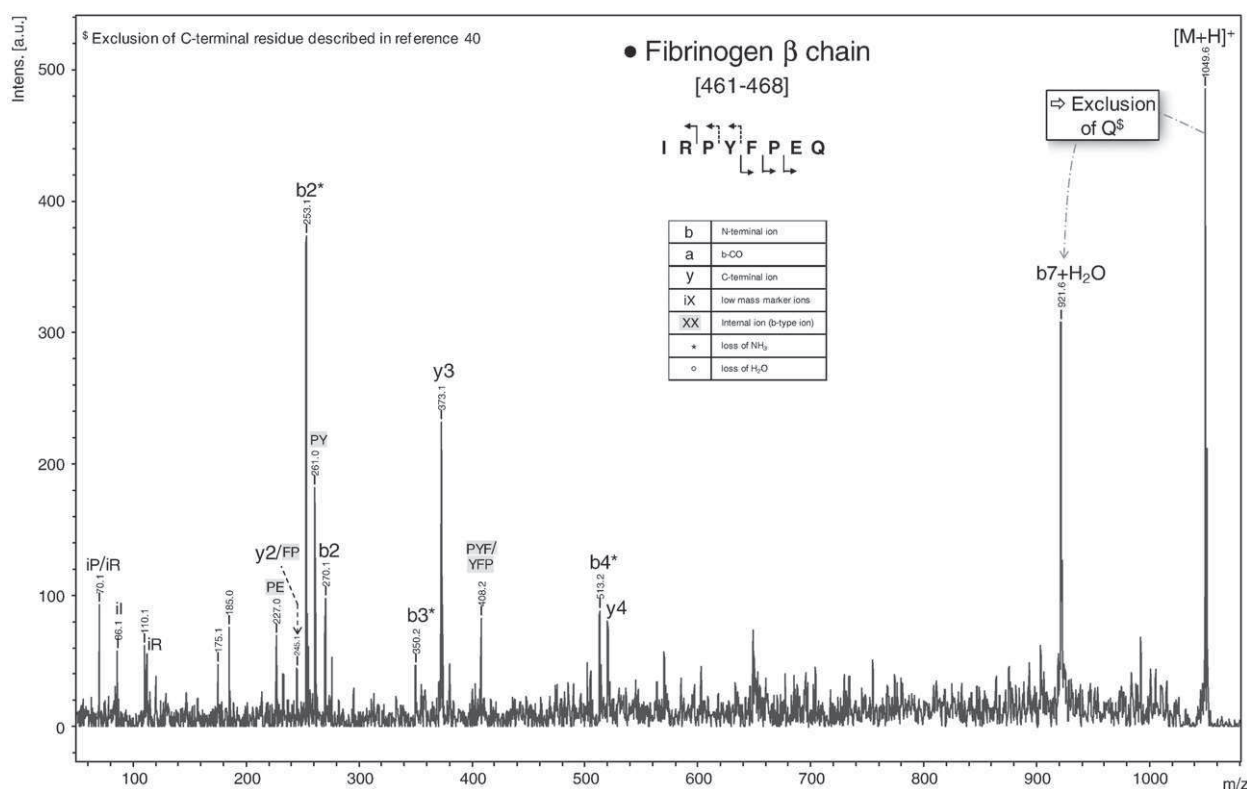


Fig. 5 – LDI/NanoSi MS/MS spectra of the $[M+H]^+$ precursor ion of m/z 1049 (IRPYFPEQ), m/z 1120 (GNLDDFFHR) and m/z 1593 (QLQVIAILLPSR) from Fibrinogen tryptic digest (75 fmol).

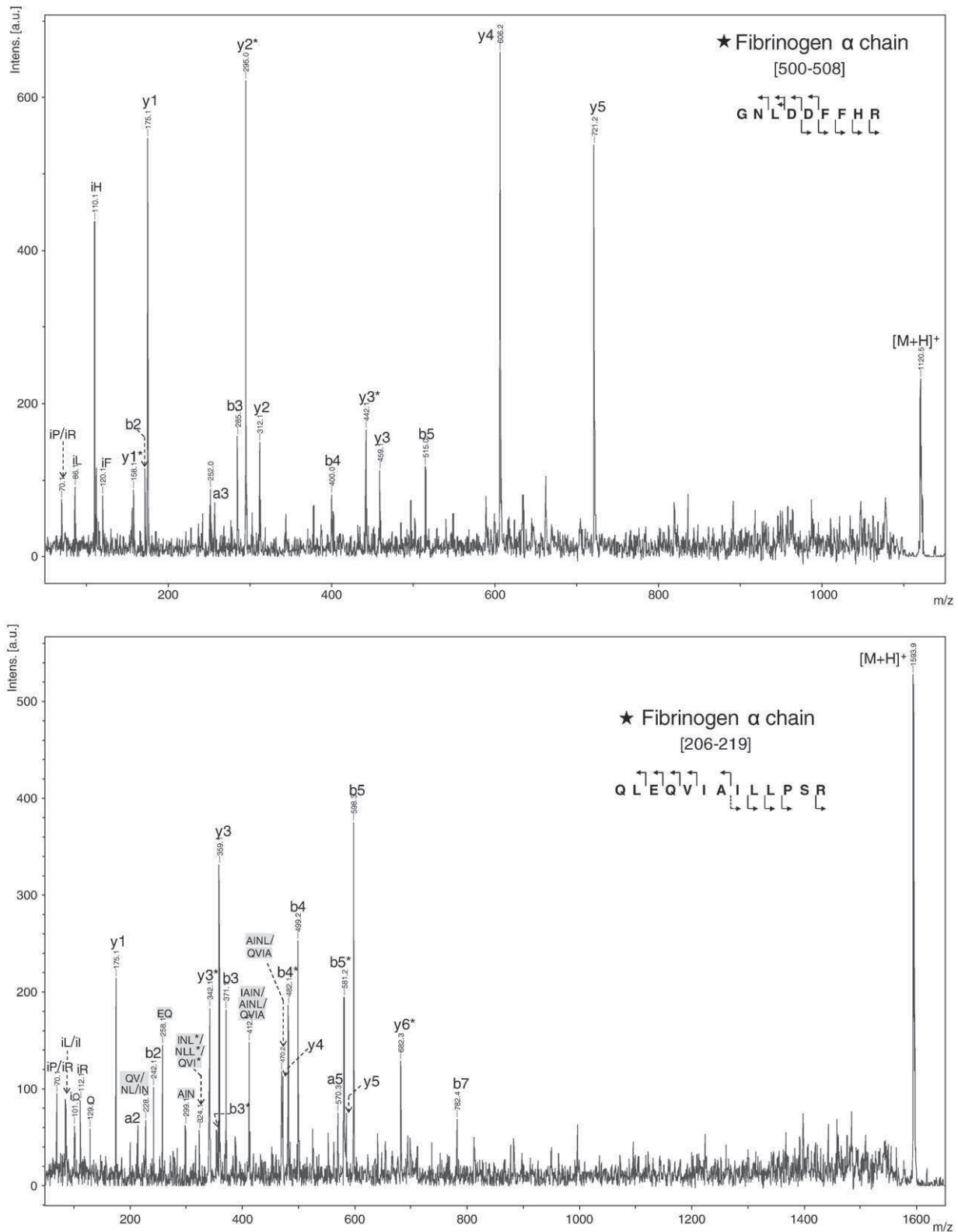


Fig. 5 (continued).

interface whereas longer chains were better suited to conventional MALDI-HCCA experiments. In the case of Cytochrome C and β -Casein, the recorded ions were the same in both techniques; only their relative abundances were affected. As an illustration, the mass spectra of the tryptic digest

issued from Fibrinogen (340 kDa) (75 fmol deposited) recorded from NanoSi and HCCA matrix in LDI and MALDI mass spectrometry are reproduced in Fig. 4. The low mass range (m/z 500–1000) exhibited more peptide ions in the case of NanoSi interface whereas heavier ions (m/z

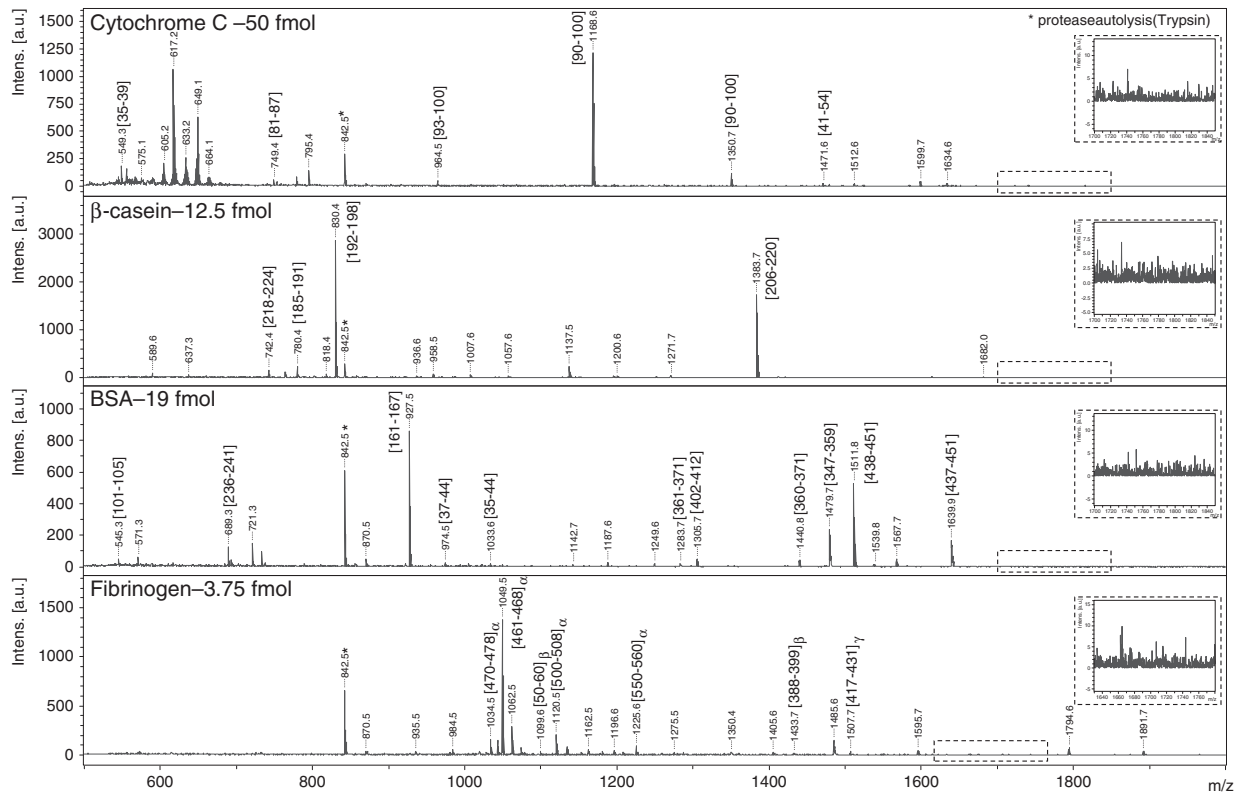


Fig. 6 – LDI/NanoSi MS spectra at the lowest concentration allowing both MS and MS/MS experiment of tryptic digest of Cytochrome C, β -Casein, Bovine Serum Albumin and Fibrinogen.

1500–3000) were better responding in conventional MALDI. Since this protein is composed of 3 chains (α , β and γ), the ions are identified in Fig. 4 with different symbols (\star , \bullet , \blacktriangledown , respectively) with a color code corresponding to the detection method (blue for unique detection in NanoSi LDI-MS, red for unique detection in HCCA MALDI-MS and black for collective detection). Assignment of the detected Fibrinogen tryptic peptides was performed with MASCOT, checked with ExpASY, and the sequence coverage in NanoSi LDI-MS and HCCA MALDI-MS for the 3 chains is represented in Scheme 5, including all statistical data, following the same color code. The peptide sequences are listed in Table S2 in the Supplementary data.

Moreover, the purpose of the study was not only to set up an LDI method alternative to MALDI for sensitive peptide mass fingerprinting, but also to allow rapid peptide sequencing within the same experiment. We aimed to switch directly from MS to MS/MS acquisition mode while maintaining the sample target into the ionization source in order to ensure high throughput peptide detection and identification in one run. It must be noticed that this analytical strategy excludes the addition onto the deposit of a chemical [45] (MALDI matrix, additive, surfactant...) acting as an ionization enhancer to improve parent ion detection and subsequent fragmentation. Both MS detection and MS/MS dissociation were pursued in the raw from the same deposit for peptide mass fingerprinting and sequencing upon 'matrix-free' NanoSi LDI mass spectrometry.

NanoSi LDI-MS/MS experiments were conducted for the 4 studied tryptic digests. The peptide precursor ions that were activated upon laser induced dissociation (LID MS/MS mode) gave standard sequence fragments belonging to the b and y ion series together with the loss of small neutral (mainly H_2O and NH_3 from both series) as expected from literature data [37,38,46,47]. Compared to peptide dissociation recorded from HCCA deposit, the total ion current observed in the LDI-MS/MS from NanoSi was lower, but the relative ion abundances were similar. The data were thus the same to deduce the peptide sequence. For some peptides that were reluctant to be fragmented from both HCCA and NanoSi deposits, more energetic precursor ion activation was achieved by combining LID with high energy CID (argon admitted in the collision cell) as usually performed in MALDI-TOF/TOF experiments [38,48]. For instance, considering the Fibrinogen digest (75 fmol deposited onto NanoSi interface), the protonated molecular ions of the peptide of the β chain [461–468] (m/z 1049.6), the two peptides of the α chain [500–508] (m/z 1120.5) and [206–219] (m/z 1593.9) detected in the mass spectrum reproduced in Fig. 4 were fragmented upon LID activation. The three corresponding MS/MS spectra are reproduced in Fig. 5. The first peptide of the β chain [461–468] (m/z 1049.6, IRPYFPEQ) was the result of a trypsin miscleavage, an arginine residue being present within the sequence. As recently reported, such arginine-containing sequence is prone to a C-terminal rearrangement leading to the abundant loss of the C-terminal residue providing a truncated peptide ion

referred as a 'b_{n-1}+H₂O' fragment ion [40]. This behavior was also here observed from NanoSi deposit in LDI-MS/MS, the C-terminal glutamine (Q) residue being excluded from the protonated precursor ion to give an abundant b₇+H₂O (m/z 1049.6→m/z 921.6) as displayed in Fig. 5. Moreover, the

presence of two proline residues triggered, as expected, fragmentation of the amide bond located at their N-terminus leading to abundant (b₂/b₂-NH₃) and y₃ ions. In the same manner, the two other MS/MS spectra from GNLDDFFHR and QLEQVIAILLPSR sequences of the α chain (Fig. 5) followed the

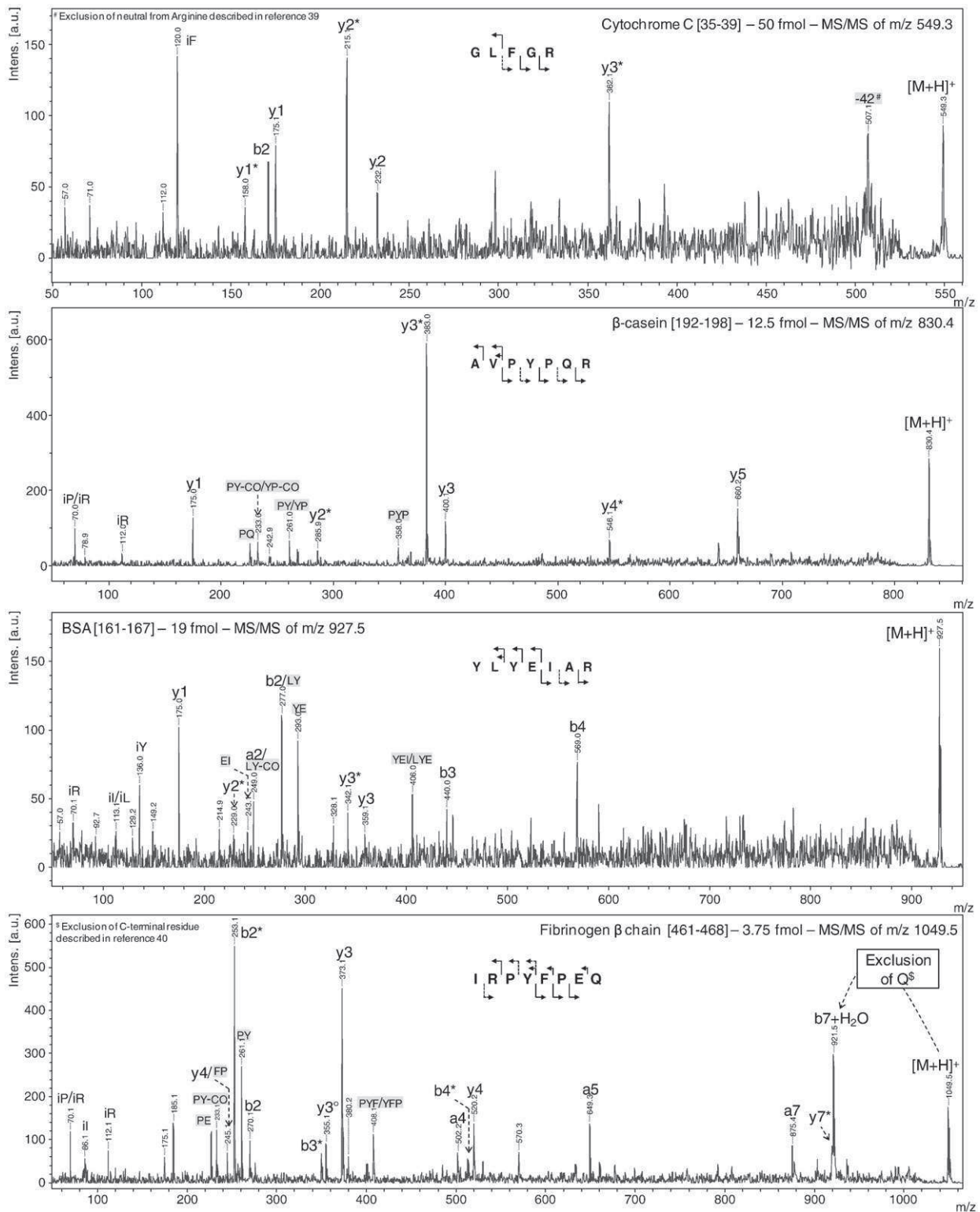


Fig. 7 – LDI/NanoSi MS/MS spectra at the lowest concentration allowing both MS and MS/MS experiment of tryptic digest of Cytochrome C, β-Casein, Bovine Serum Albumin and Fibrinogen.

fragmentation rules based on the mobile proton model [49]. Other examples can be found in the Supplemental data about BSA tryptic digest peptide mass fingerprinting (Fig. S3) and sequencing (Fig. S4) on NanoSi interface. The dissociated precursor ions (m/z 689.4 for protonated AWSVAR, m/z 1439.8 for protonated RHPEYAVSVLLR and m/z 1479.8 for protonated LGEYGFQNALIVR) were also satisfying the fragmentation rules [49]. An abundant loss of the C-terminal residue (R) was observed for the second peptide (RHPEYAVSVLLR) corresponding to a miscleavage [40] as seen in Fig. S4b together with the loss of a neutral molecule from the arginine side-chain as depicted previously in the literature [39]. Finally, we checked that the addition of HCCA onto the deposit after MS acquisition and prior to MS/MS experiment did not provide better MS/MS experiments as seen in Supplemental data (Fig. S5). Globally, the total ion abundance was higher with HCCA added onto the NanoSi deposit, but the resulting MS/MS was not more informative (the same ions were recorded with roughly the same relative abundances). This extra sample/target manipulation was thus not required allowing direct rapid MS and MS/MS acquisitions on the same spot. By dilution of the stock digest samples, both MS and MS/MS detection limits were determined for the 4 proteins. The minimum concentration values for informative MS and subsequent MS/MS acquisitions were of 50 fmol for Cytochrome C, 12.5 fmol for β -Casein, 19 fmol for BSA and 3.75 fmol for Fibrinogen. The corresponding MS spectra are shown in Fig. 6 and some MS/MS results obtained for the 4 proteins are displayed in Fig. 7. However, recording MS data was achieved with slightly lower deposited quantities of 25 fmol for Cytochrome C, 2.5 fmol for β -Casein, 9.5 fmol for BSA and 1.9 fmol for Fibrinogen as shown in Fig. S6 of the Supplemental data. These limits of tryptic peptide detection and of tryptic peptide sequencing in the low femtomolar range were in accordance to the concentrations encountered in proteomic experiments.

4. Conclusion

We have demonstrated that nanostructured silicon substrates, easily prepared by chemical etching of crystalline silicon in $\text{NH}_4\text{F}/\text{HNO}_3/\text{AgNO}_3$ aqueous solution, can be used as new targets for matrix-free LDI-MS analysis. The NanoSi substrates allowed soft desorption/ionization of a large variety of peptides with masses ranging from 380 to 1700 Da. Furthermore, we have shown that both MS and MS/MS experiments can be conducted on the same deposit onto NanoSi allowing rapid and easy data acquisition (peptide mass fingerprinting and some sequencing data according to the number of protonated peptide ions dissociated). The described LDI-MS method was as efficient as conventional MALDI experiment and produces complementary data in the low mass range. Further investigation for spotting a nanoLC eluent directly onto the NanoSi substrate will considerably improve the applicability of such LDI-MS technology in proteomics.

Acknowledgment

We thank Dr Laetitia Mouis, Dr Nawar Shenar and Dr Pascal Verdié for providing some peptides.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at [doi:10.1016/j.jprot.2011.12.039](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.12.039).

REFERENCES

- [1] Sunner J, Dratz E, Chen Y-C. Graphite surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides and proteins from liquid solutions. *Anal Chem* 1995;67:4335–42.
- [2] Wei J, Buriak JM, Siuzdak G. Desorption/Ionization Mass Spectrometry on porous silicon. *Nature* 1999;399:243–6.
- [3] Peterson DS. Matrix-free methods for laser desorption/ionization mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2007;26:19–34.
- [4] Zhang Q, Zou H, Guo Z, Zhang Q, Chen X, Ni J. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using porous silicon and silica gel as matrix. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2001;15:217–23.
- [5] Okuno S, Arakawa R, Okamoto K, Matsui Y, Seki S, Kozawa T, et al. Requirements for laser-induced desorption/ionization on submicrometer structures. *Anal Chem* 2005;77:5364–9.
- [6] Cha S, Yeung ES. Colloidal graphite-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and MS^n of small molecules. 1. Imaging of cerebrosides directly from rat brain tissue. *Anal Chem* 2007;79:2373–85.
- [7] Zhang H, Cha S, Yeung ES. Colloidal graphite-assisted laser desorption/ionization MS and MS^n of small molecules. 2. Direct profiling and MS imaging of small metabolites from fruits. *Anal Chem* 2007;79:6575–84.
- [8] Black C, Poile C, Langley J, Hermiman J. The use of pencil lead as a matrix and calibrant for matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006;20:1053–60.
- [9] Woldegiorgis A, Kieseritzky FV, Dahlstedt E, Hellberg J, Brinck T, Roeraade J. Polymer-assisted laser desorption/ionization analysis of small molecular weight compounds. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004;18:841–52.
- [10] Chen C-T, Chen Y-C. Desorption/ionization mass spectrometry on nanocrystalline titania sol-gel-deposited films. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004;18:1956–64.
- [11] Law KP, Larkin JR. Recent advances in SALDI-MS techniques and their chemical and bioanalytical applications. *Anal Bioanal Chem* 2011;399:2597–622.
- [12] Xu S, Li Y, Zou H, Qiu J, Guo Z, Guo B. Carbon nanotubes as assisted matrix for laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 2003;75:6191–5.
- [13] Go EP, Apon JV, Luo G, Saghatelian A, Daniels RH, Sahi V, et al. Desorption/ionization on silicon nanowires. *Anal Chem* 2005;77:1641–6.
- [14] McLean JA, Stumpo KA, Russell DH. Size-selected (2–10 nm) gold nanoparticles for matrix assisted laser desorption ionization of peptides. *J Am Chem Soc* 2005;127:5304–5.
- [15] Chen C-T, Chen Y-C. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ core/shell nanoparticles as affinity probes for the analysis of phosphopeptides using TiO_2 surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 2005;77:5912–9.
- [16] Hua L, Chen J, Ge L, Tan SN. Silver nanoparticles as matrix for laser desorption/ionization mass spectrometry of peptides. *J Nanoparticle Res* 2007;9:1133–8.
- [17] Kawasaki H, Yonezawa T, Watanabe T, Arakawa R. Platinum nanoflowers for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biomolecules. *J Phys Chem C* 2007;111:16278–83.

- [18] Yalcin T, Li L. Cobalt coated substrate for matrix-free analysis of small molecules by laser desorption/ionization mass spectrometry. *Appl Surf Sci* 2009;256:1309–12.
- [19] Bi H, Qiao L, Busnel J-M, Devaud V, Liu B, Girault HH. TiO₂ printed aluminum foil: single-use film for a laser desorption/ionization target plate. *Anal Chem* 2009;81:1177–83.
- [20] Seino T, Sato H, Yamamoto A, Nemoto A, Torimura M, Tao H. Matrix-free laser desorption/ionization mass spectrometry using self-assembled germanium Nanodots. *Anal Chem* 2007;79:4827–32.
- [21] Watanabe T, Kawasaki H, Yonezawa T, Arakawa R. Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (SALDI-MS) of low molecular weight organic compounds and synthetic polymers using zinc oxide (ZnO) nanoparticles. *J Mass Spectrom* 2008;43:1063–71.
- [22] Taira S, Kitajima K, Katayanagi H, Ichiishi E, Ichiyanagi Y. Manganese oxide nanoparticle-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for medical applications. *Sci Technol Adv Mater* 2009;10:034602.
- [23] Chiang C-K, Yang Z, Lin Y-W, Chen W-T, Lin H-J, Chang H-T. Detection of proteins and protein–ligand complexes using HgTe nanostructure matrixes in surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 2010;82:4543–50.
- [24] Kailasa SK, Wu H-F. Multifunctional ZrO₂ nanoparticles and ZrO₂-SiO₂ nanorods for improved MALDI-MS analysis of cyclodextrins, peptides, and phosphoproteins. *Anal Bioanal Chem* 2010;396:1115–25.
- [25] Wyatt MF, Ding S, Stein BK, Brenton AG, Daniels RH. Analysis of various organic and organometallic compounds using nanostructure-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (NALDI-TOFMS). *J Am Soc Mass Spectrom* 2010;21:1256–9.
- [26] Shenar N, Martinez J, Enjalbal C. Laser desorption/ionization mass spectrometry on porous silica and alumina for peptide mass fingerprinting. *J Am Soc Mass Spectrom* 2008;19:632–44.
- [27] Shenar N, Cantel S, Martinez J, Enjalbal C. Comparison of inert supports in laser desorption/ionization mass spectrometry of peptides: pencil lead, porous silica gel, DIOS-chip and NALDITM target. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2009;23:2371–9.
- [28] Coffinier Y, Szunerits S, Drobecq H, Melnyk O, Boukherroub R. Diamond nanowires for highly sensitive matrix-free mass spectrometry analysis of small molecules. *Nanoscale* 2012;4:231–8.
- [29] Coffinier Y, Janel S, Addad A, Blossey R, Gengembre L, Payen E, et al. Preparation of superhydrophobic silicon nanowires surfaces. *Langmuir* 2007;23:1608–11.
- [30] Piret G, Coffinier Y, Roux C, Melnyk O, Boukherroub R. Biomolecule and nanoparticle transfer on patterned and heterogeneously wetted superhydrophobic silicon nanowire surfaces. *Langmuir* 2008;24:1670–2.
- [31] Piret G, Drobecq H, Coffinier Y, Melnyk O, Boukherroub R. Matrix-free laser desorption/ionization mass spectrometry on silicon nanowire arrays prepared by chemical etching of crystalline silicon. *Langmuir* 2009;26:1354–61.
- [32] Lapierre F, Piret G, Drobecq H, Melnyk O, Coffinier Y, Thomy V, et al. High sensitive matrix-free mass spectrometry analysis of peptides using silicon nanowires-based digital microfluidic device. *Lab Chip* 2011;11:1620–8.
- [33] Piret G, Desmet R, Diesis E, Drobecq H, Segers J, Rouanet C, et al. Chips from chips: application to the study of antibody responses to methylated proteins. *J Proteome Res* 2010;9:6467–78.
- [34] Michalski A, Cox J, Mann M. More than 100,000 detectable peptide species elute in single shotgun proteomics runs but the majority is inaccessible to data-dependent LC-MS/MS. *J Proteome Res* 2011;10:1785–93.
- [35] Beck M, Schmidt A, Malmstroem J, Claassen M, Ori A, Szymborska A, et al. The quantitative proteome of a human cell line. *Mol Syst Biol* 2011;549:1–8.
- [36] Nagaraj N, Wisniewski JR, Geiger T, Cox J, Kircher M, Kelso J, et al. Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Syst Biol* 2011;548:1–8.
- [37] Falkner JA, Kachman M, Veine DM, Walker A, Strahler JR, Andrews PC. Validated MALDI-TOF/TOF mass spectra for protein standards. *J Am Soc Mass Spectrom* 2007;18:850–5.
- [38] Shenar N, Sommerer N, Martinez J, Enjalbal C. Comparison of LID versus CID activation modes in tandem mass spectrometry of peptides. *J Mass Spectrom* 2009;44:621–32.
- [39] Dupré M, Cantel S, Verdié P, Martinez J, Enjalbal C. Sequencing Lys-N proteolytic peptides by ESI and MALDI tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2011;22:265–79.
- [40] Dupré M, Cantel S, Martinez J, Enjalbal C. Occurrence of C-terminal residue exclusion in peptide fragmentation by ESI and MALDI tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2012;23:330–46.
- [41] Stewart JM, Young JD. *Solid Phase Peptide Synthesis—Second Edition*. Rockford, Illinois: Pierce Chemical Company; 1984.
- [42] Nonaka T, Hashimoto Y, Takio K. Kinetic characterization of lysine-specific metalloendopeptidases from *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies. *J Biochem* 1998;124:157–62.
- [43] Krokhin OV, Ying S, Cortens JP, Ghosh D, Spicer V, Ens W, et al. Use of peptide retention time prediction for protein identification by off-line reversed-phase HPLC-MALDI MS/MS. *Anal Chem* 2006;78:6265–9.
- [44] Moulis L, Subra G, Aubagnac J-L, Martinez J, Enjalbal C. Tandem mass spectrometry of amidated peptides. *J Mass Spectrom* 2006;41:1470–83.
- [45] Nordström A, Apon JV, Uritboonthai W, Go EP, Siuzdak G. Surfactant enhanced Desorption/Ionization on Silicon (DIOS) mass spectrometry. *Anal Chem* 2006;78:272–8.
- [46] Macht M, Asperger A, Deininger S-O. Comparison of laser-induced dissociation and high-energy collision induced dissociation using matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight (MALDI-TOF/TOF) for peptide and protein identification. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004;18:2093–105.
- [47] Suckau D, Resemann A, Schuerenberg M, Hufnagel P, Franzen J, Holle A. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem* 2003;376:952–65.
- [48] Moneti G, Francese S, Mastrobuoni G, Pieraccini G, Seraglia R, Valitutti G, et al. Do collisions inside the collision cell play a relevant role in CID-LIFT experiments? *J. Mass Spectrom* 2007;42:117–26.
- [49] Paizs B, Suhai S. Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrom Rev* 2005;24:508–48.

III.2.2. Illustrations complémentaires

Peptide synthesis.

La synthèse des peptides présentée dans le "supporting information" original n'a pas été incluse dans cette partie du manuscrit. Elle est consultable dans l'Annexe 3 – synthèse peptidique sur support semi-automatisée.

Table S1. Table of peptide mixtures (5 pmol/peptide/mixture) including relative response of peptides in MS analyses and MS/MS experiments.

	Code	S E Q U E N C E	Mw mono. (g/mol)	Relative abundances in MS analysis		Achieved experiments in MS/MS analysis	
				LDI / NanoSi	MALDI / HCCA	LDI / NanoSi	MALDI / HCCA
Mixture A	P(1)	P I C A K	530,29	1,5%	0,0%	✓	
	P(8)	D I G L V R	671,40	47,4%	31,5%	✓	✓
	P(15)	W L I A G D R	829,44	30,5%	42,6%	✓	✓
	P(22)	L M Y V H W V K	1074,57	7,2%	7,7%	✓	✓
	P(29)	W G V Y A P L F D K	1194,61	13,4%	18,2%	✓	✓
Mixture B	P(2)	S E G F K	566,27	3,0%	0,7%	✓	
	P(9)	S W A M V K	720,36	5,7%	1,8%	✓	✓
	P(16)	Y I C P A D R	836,39	61,9%	48,2%	✓	✓
	P(23)	N G F L M C S A L K	1082,53	19,4%	10,8%	✓	✓
	P(30)	A D P N Y H I G E T K	1243,58	10,0%	38,5%	✓	✓
Mixture C	P(3)	V T E F K	622,33	2,5%	0,0%	✓	
	P(10)	T P S S V L K	730,42	0,3%	0,0%	✓	
	P(17)	L G H A P E V R	877,48	20,8%	43,4%	✓	✓
	P(24)	L M Y V H W V R	1102,58	64,2%	21,4%	✓	✓
	P(31)	M L Q Y G M F V E R	1272,60	12,1%	35,2%	✓	✓
Mixture D	P(4)	F A Q I R	633,36	39,7%	27,6%	✓	✓
	P(11)	S W A M V R	748,37	28,6%	25,8%	✓	✓
	P(18)	Y D T S I V Q K	952,49	1,3%	1,0%	✓	
	P(25)	P G A H I W E A G A K	1135,58	17,2%	40,9%	✓	✓
	P(32)	L E S M G V D F N A N K	1323,61	13,3%	4,7%		✓
Mixture E	P(5)	A G V D G P K	642,33	1,5%	0,9%	✓	✓
	P(12)	A V G K K K K	757,52	0,8%	2,4%	✓	✓
	P(19)	Y D T S I V Q R	980,49	50,7%	51,0%	✓	✓
	P(26)	V E Y L A S I T L K	1135,65	36,4%	13,5%	✓	✓
	P(33)	A E Q V P L G S Y D T G K	1363,66	10,6%	32,2%		✓
Mixture F	P(6)	V T E F R	650,34	5,1%	4,0%	✓	✓
	P(13)	M W A E N K	777,35	0,3%	0,1%		
	P(20)	A F I S V G P L A R	1029,60	52,9%	34,5%	✓	✓
	P(27)	G N G Q I V F H A A R	1168,61	17,2%	34,0%	✓	✓
	P(34)	Q L D F G E V L A N T G R	1418,72	24,6%	27,4%	✓	✓
Mixture G	P(7)	A G V D G P R	670,34	20,5%	3,9%	✓	✓
	P(14)	Y I C P A D K	808,38	0,0%	0,2%		
	P(21)	C A S H T F L V R	1032,52	5,6%	42,3%	✓	✓
	P(28)	G H L P T V S E N A R	1179,60	42,2%	34,5%	✓	✓
	P(35)	I W D P S N L I A Q P T K	1481,79	31,7%	19,0%		✓

not detected

not sequenced

Table S2. List of peptides and sequence attribution corresponding from the MALDI/HCCA and LDI/NanoSi MS spectra of Fibrinogen tryptic digest (75 fmol).

[M+H] ⁺ _{calc}	Chain	Sequence	Postion	Miscleavage
572,351	β	(K)/VGLGAR/(G)	16-21	0
614,398	γ	(K)/IVNLR/(D)	145-149	0
643,425	α	(R)/INKLR/(D)	88-92	1
725,467	γ	(K)/IIPLNR/(L)	411-416	0
732,389	β	(K)/SIEDLR/(N)	103-108	0
797,426	γ	(K)/IHDVTGR/(D)	169-175	0
<u>844,489</u>	β	<u>(R)/SILENLR/(S)</u>	<u>177-183</u>	<u>0</u>
<u>844,489</u>	β	<u>(K)/LQDTLVR/(Q)</u>	<u>89-95</u>	<u>0</u>
872,437	β	(R)/GHRPYDK/(K)	22-28	1
877,437	β	(R)/NTVDSVSR/(T)	109-116	0
894,457	γ	(R)/LDGSLDFK/(K)	221-228	0
927,61	α	(R)/IEILRRK/(V)	141-147	2
<u>980,453</u>	α	<u>(R)/EEGSVSSGTK/(Q)</u>	<u>410-419</u>	<u>0</u>
<u>980,443</u>	β	<u>(R)/QDGSVDFGR/(K)</u>	<u>263-271</u>	<u>0</u>
1030,543	β	(K)/GGWTVIQNR/(Q)	254-262	0
1034,573	α	(R)/TETTKEVVK/(S)	470-478	1
1043,479	α	(R)/DKDDFFTR/(S)	509-516	1
1049,541	β	(K)/IRPYFPEQ	461-468	1
1058,566	α	(K)/MSTITGPVPR/(E)	229-238	0
1060,538	α	(K)/VTSGHTTTTR/(R)	443-452	0
1099,622	β	(R)/ARPATATVGQK/(K)	50-60	1
1120,517	α	(R)/GNLDDFFHR/(D)	500-508	0
1130,559	γ	(R)/IQLEDWNGR/(T)	273-281	0
1225,617	α	(K)/QFVSSSTTVNR/(G)	550-560	0
1239,518	β	(K)/EDGGGWYNR/(C)	404-413	0
1304,587	β	(R)/DNDGWKTTDPR/(K)	388-398	1
1322,747	γ	(K)/ESGLYFIRPLK/(A)	187-197	1
1389,658	α	(K)/MVLETFGGDGHAR/(G)	262-274	0
1405,667	α	(R)/SCKGSCSRALHK/(V)	182-194	2
1405,732	α	(R)/GIHTSPLGEPSTLP	602-615	0
1432,681	β	(R)/DNDGWKTTDPRK/(Q)	388-399	2
1485,729	α	(R)/GDSVSQGTGLAPGSPR/(K)	275-290	0
1494,707	α	(K)/GLIDEVDQDFTSR/(I)	75-87	0
1506,802	γ	(R)/LAIGEGQQHQLGGAK/(Q)	417-431	0
1549,786	γ	(K)/YETLISTHESTIR/(F)	120-132	0
1593,932	α	(K)/QLEQVIINLLPSR/(D)	206-219	0
1628,716	β	(K)/YCGVPGEYWLGNDR/(I)	292-305	0
1756,811	β	(K)/KYCGVPGEYWLGNDR/(I)	291-305	1
1964,107	α	MFSVRDLCLVLSLVGAIK/(T)	1-18	1
1979,034	β	(K)/EEAPSLRPVPPPISGGGYR/(A)	31-49	0
2092,187	α	(K)/NQKQLEQVIINLLPSR/(D)	202-219	1
2107,129	β	(K)/KEEAPSLRPVPPPISGGGYR/(A)	30-49	2
2202,046	γ	(R)/IQLEDWNGRTSTADYASFK/(V)	273-291	1
2235,224	β	(K)/KKEEAPSLRPVPPPISGGGYR/(A)	29-49	3
2357,068	α	(K)/CPSGCRMKGLIDEVDQDFTSR/(I)	67-87	2
2374,091	β	(R)/QNQVQDNENVVNEYSSHLEK/(H)	136-155	0
2415,215	γ	(K)/AIQISYNPDQPSKPNNIESATK/(N)	87-108	1
2882,195	γ	(R)/LTYAYFIGGDAGDAFDGYDFGDDSSDK/(F)	301-327	0

Legende

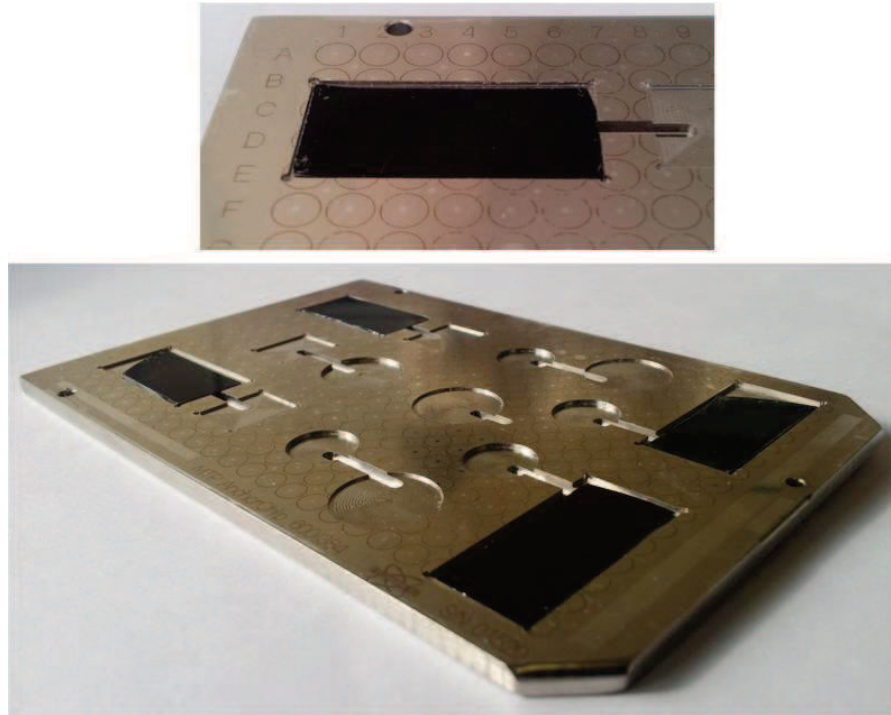
xxx MALDI / HCCA detection

xxx LDI / NanoSi Detection

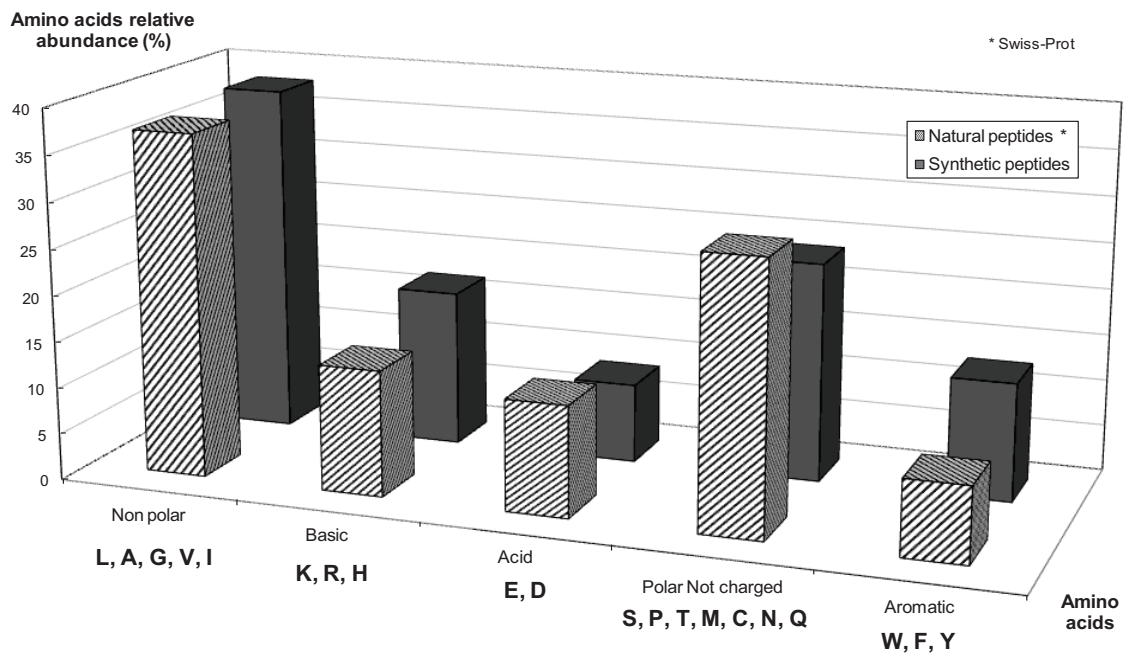
xxx Collective detection

xxx *These peptides have not been taken in account in sequence coverage due to the two possibilities of attribution for the detected m/z values*

Scheme S1. Picture of MALDI target with cavities for NanoSi insertion.



Scheme S2. Occurrence of amino acids in the designed peptides.



Scheme S3. Sequence coverage from MALDI/HCCA and LDI/NanoSi MS spectra of Bovine Serum Albumin tryptic digest (375 fmol).

MALDI / HCCA detection LDI / NanoSi detection Collective detection No detection	Bovin Serum Albumine							
	0	MKQVTFISLL	LLFSSAYSRG	VFRRDTH	SE IAHR	FDLGE	EHFKGLVLIA	
	50	FSQYLQCCPF	DEHV	LVNEL	TEFAKTCVAD	ESHACCEKSL	HTLFGDELCK	
	100	VASLR	ITYGD	MADCEKQEP	ERNECFLSHK	DDSPDLPLK	PDPNTLCDEF	
	150	KADEKF	FWGK	YLYEIARRHP	YFYAPELLYY	ANK	YNGVFOE CCOAEDKGAC	
	200	LLPKIETMRE	KVLASSARQR	LRCASIQKFG	ER	ALKAWSVA	RLSQKFPKAE	
	250	FVEVTKLVTD	LTK	VHKECCH	GDLLCADDR	ADLAKYICDN	QDTISSKLKE	
	300	CCDKPLLEKS	HCIAEVEK	DA	IPENLPPLTA	DFAEDK	DVCK NYQEAR	DAFL
	350	GSFLYEYSRR	HPEYAVSVLL	RLAKEYEATL	EECCA	KDDPH	ACYSTVFDKL	
	400	KHLVDEPQNL	IK	QNCDFEK	LGEYGFQNAL	IVR	YTKVPQ	VSTPTLVEVS
	450	RSLGKVGTRC	CTKPESEMP	CTEDYLSLIL	NRLCVLHEKT	PVSEKVT	CC	
500	TESLVNR	RPC	FSALTPDETY	VPKAFDEKLF	TFHADICTLP	DTEKQIK	QT	
550	ALVELLK	HKP	KATEEQLKTV	MENFVAFVDK	CCAADDKEAC	FAVEGPKLVV		
600	STQTALA							

	Total number of peptides assigned	Number of amino acids spanned by the peptides assigned	Number of amino acids of the sequence length	Sequence coverage
MALDI/HCCA detection	15	143		23,6%
LDI/NanoSi detection	21	159	607	26,2%
Collective detection		197		32,5%

Figure S1. MALDI/HCCA and LDI/NanoSi MS spectra of peptide P(3) (VTEFK) (5 pmol).

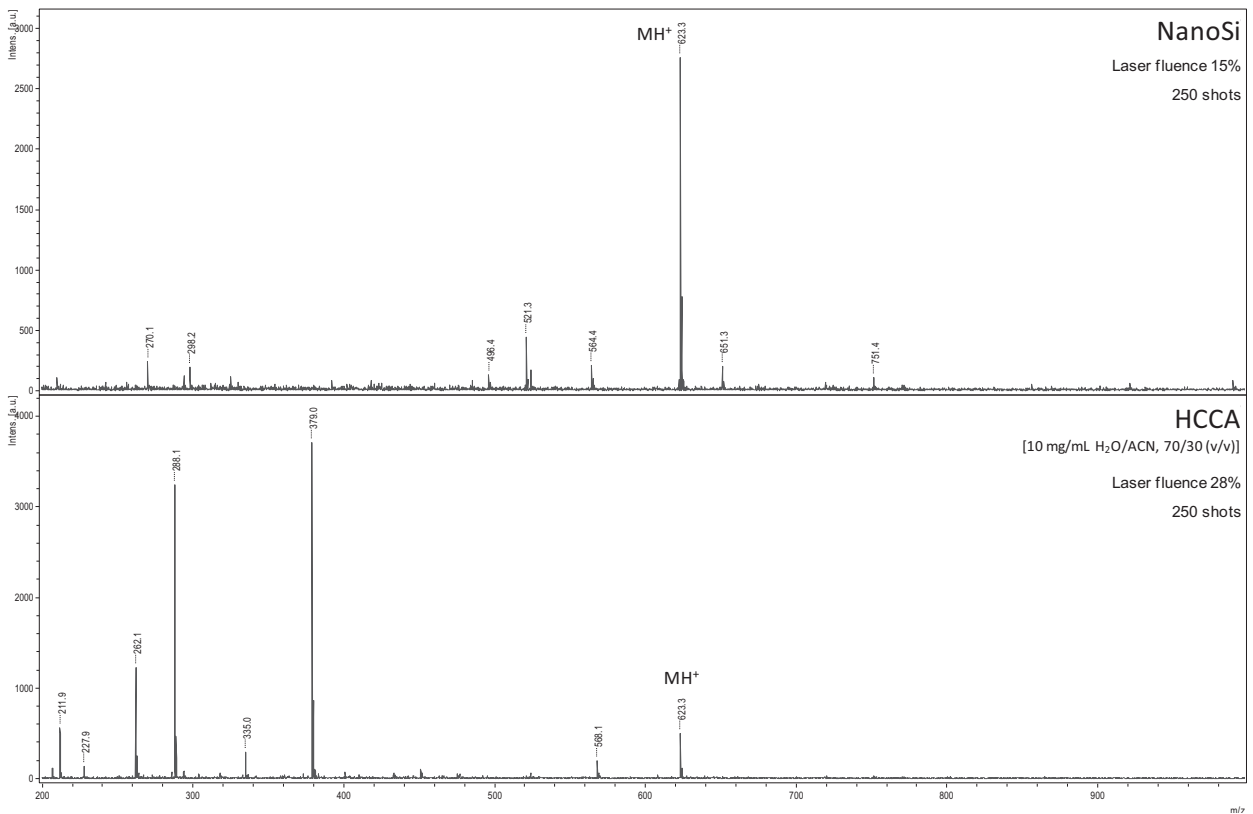


Figure S2. MALDI/HCCA and LDI/NanoSi MS/MS spectra of peptide P(3) (VTEFK) (500 pmol).

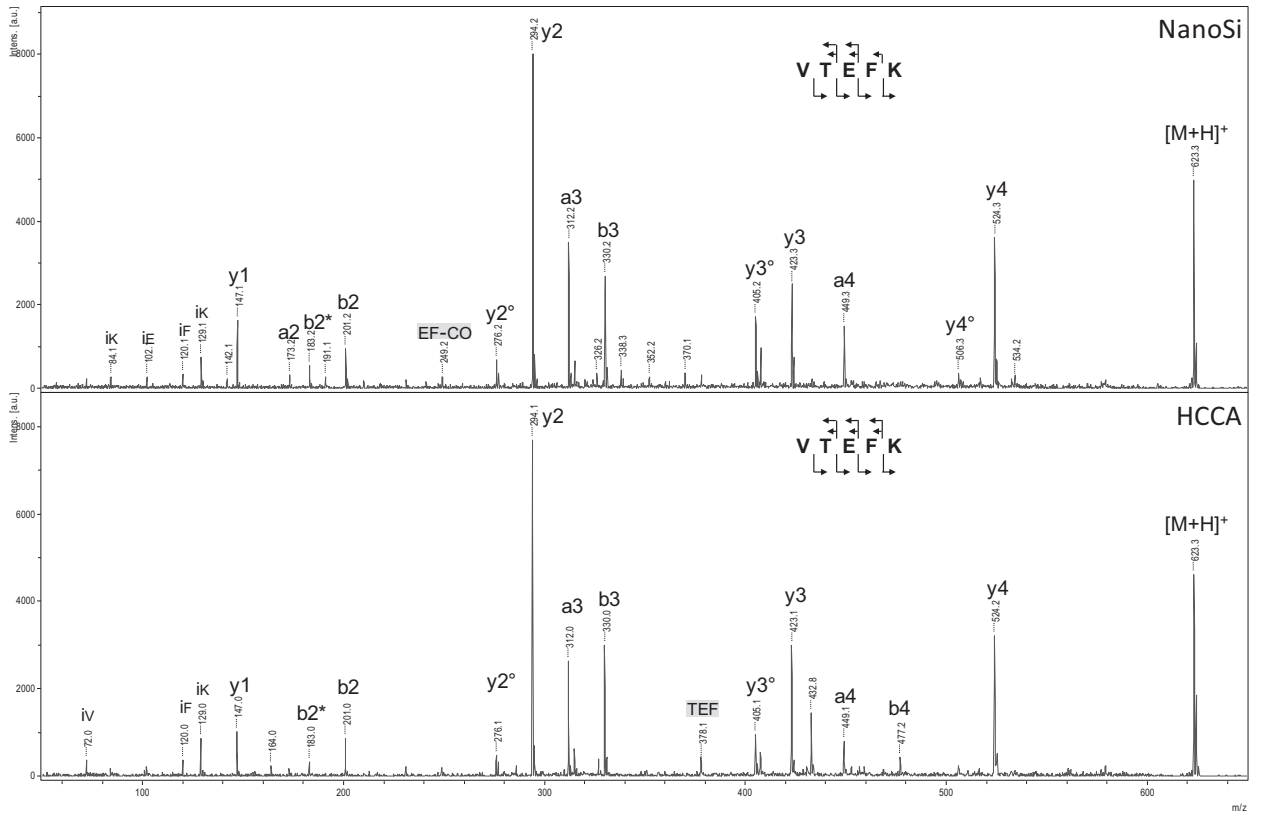


Figure S3. MALDI/HCCA and LDI/NanoSi MS spectra of Bovine Serum Albumin tryptic digest (375 fmol).

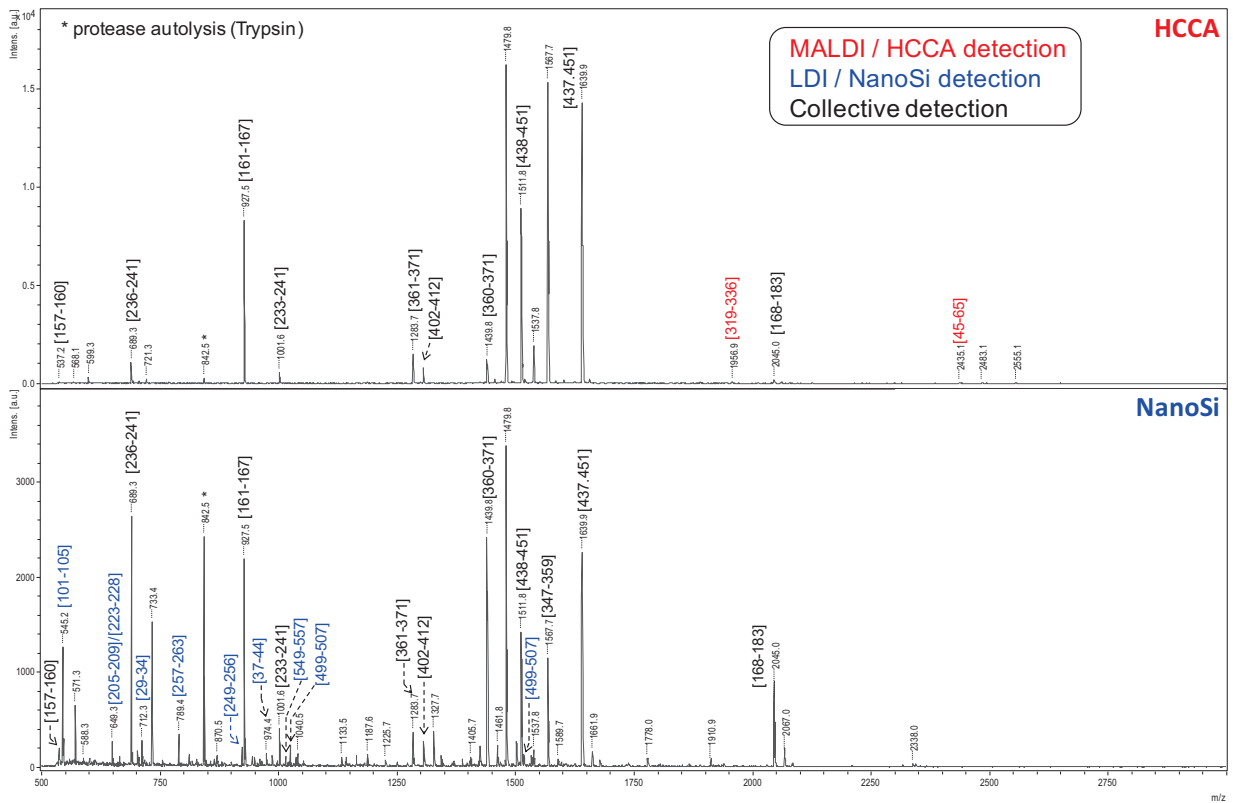
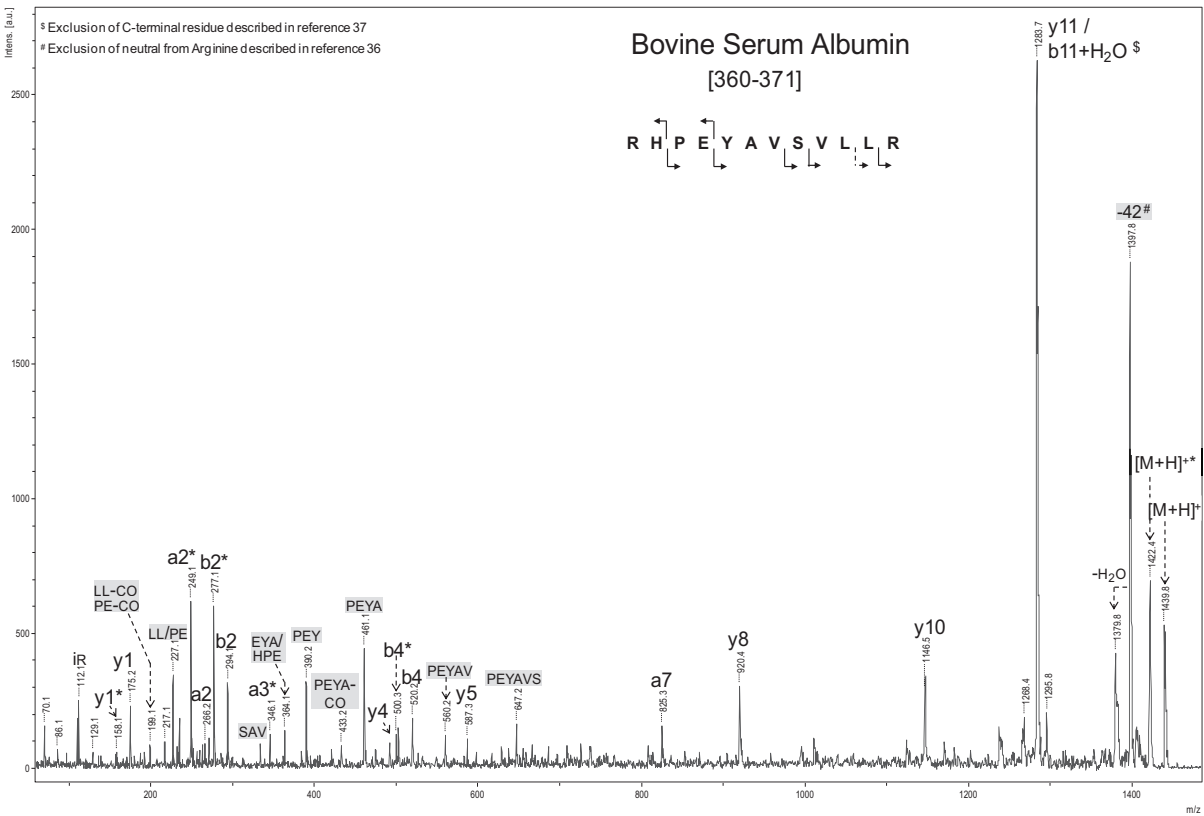
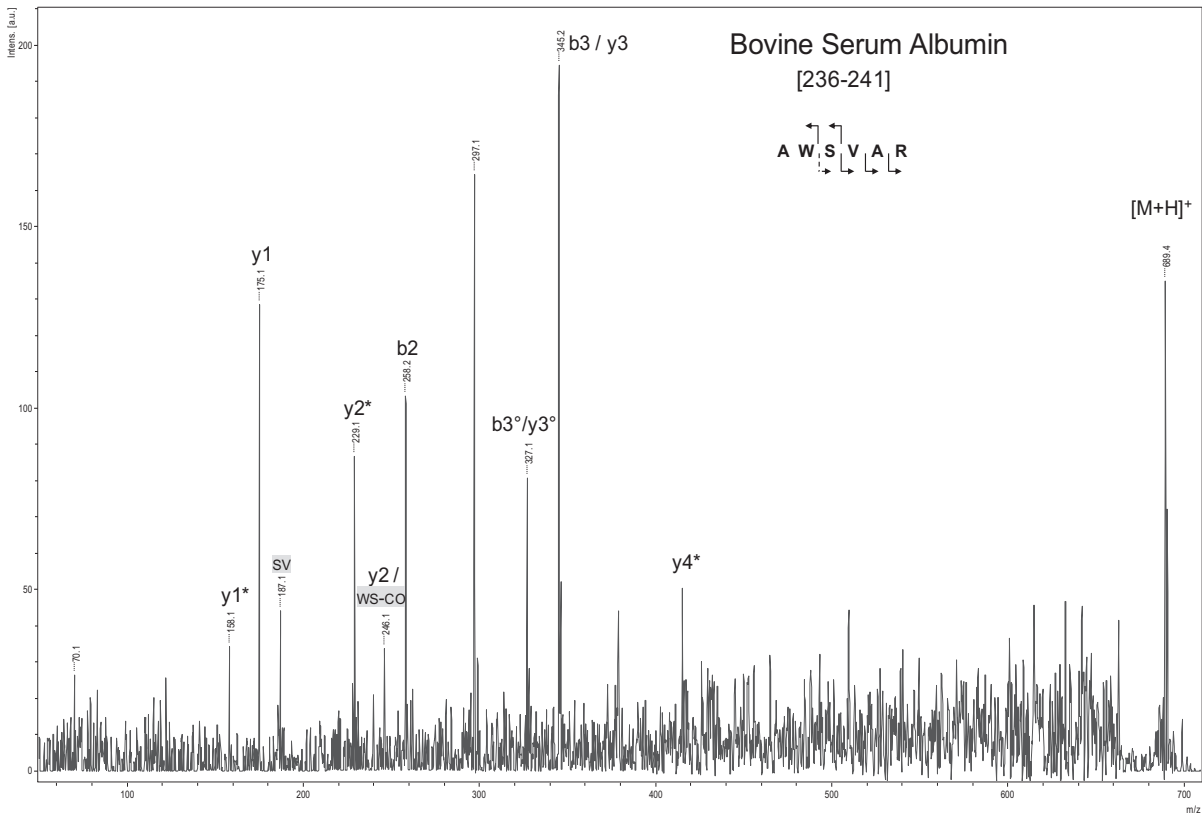


Figure S4. LDI/NanoSi MS/MS spectra of the $[M+H]^+$ precursor ion of a) m/z 689 (AWSVAR) b) m/z 1439 (RHPEYAVSVLLR) c) m/z 1479 (LGEYGFQNALIVR) from Bovine Serum Albumin tryptic digest (375 fmol).



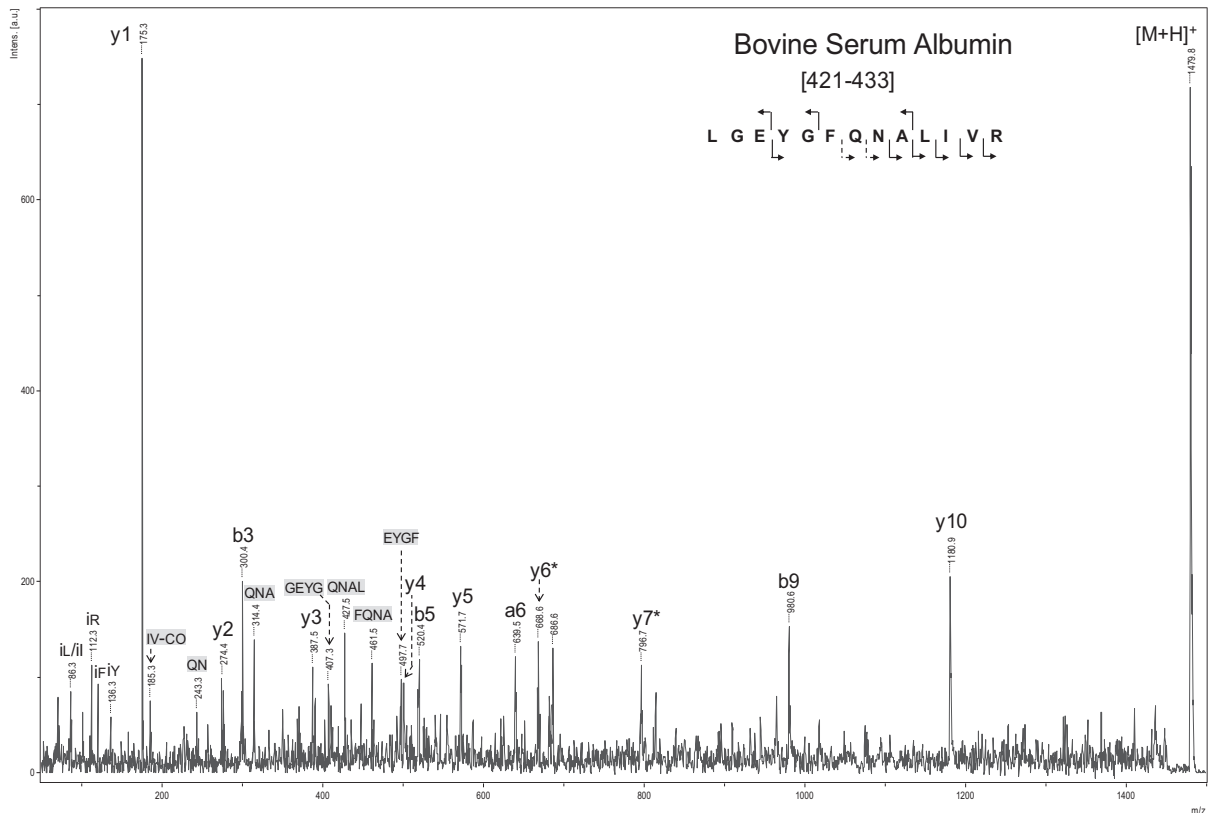


Figure S5. LDI/NanoSi MS/MS spectra of the $[M+H]^+$ precursor ion of m/z 1479 (LGEYGFQNALIVR) from Bovine Serum Albumin tryptic digest (350 fmol) with addition of HCCA solution on spot.

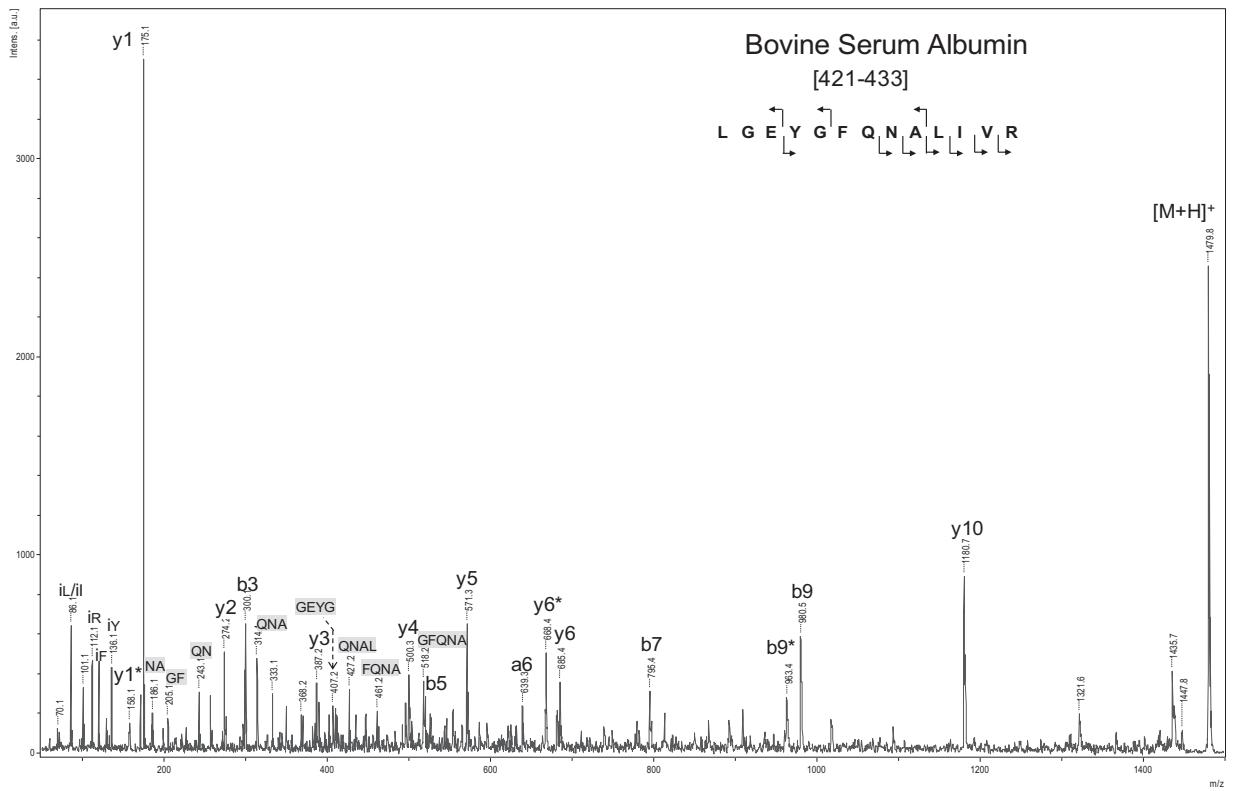
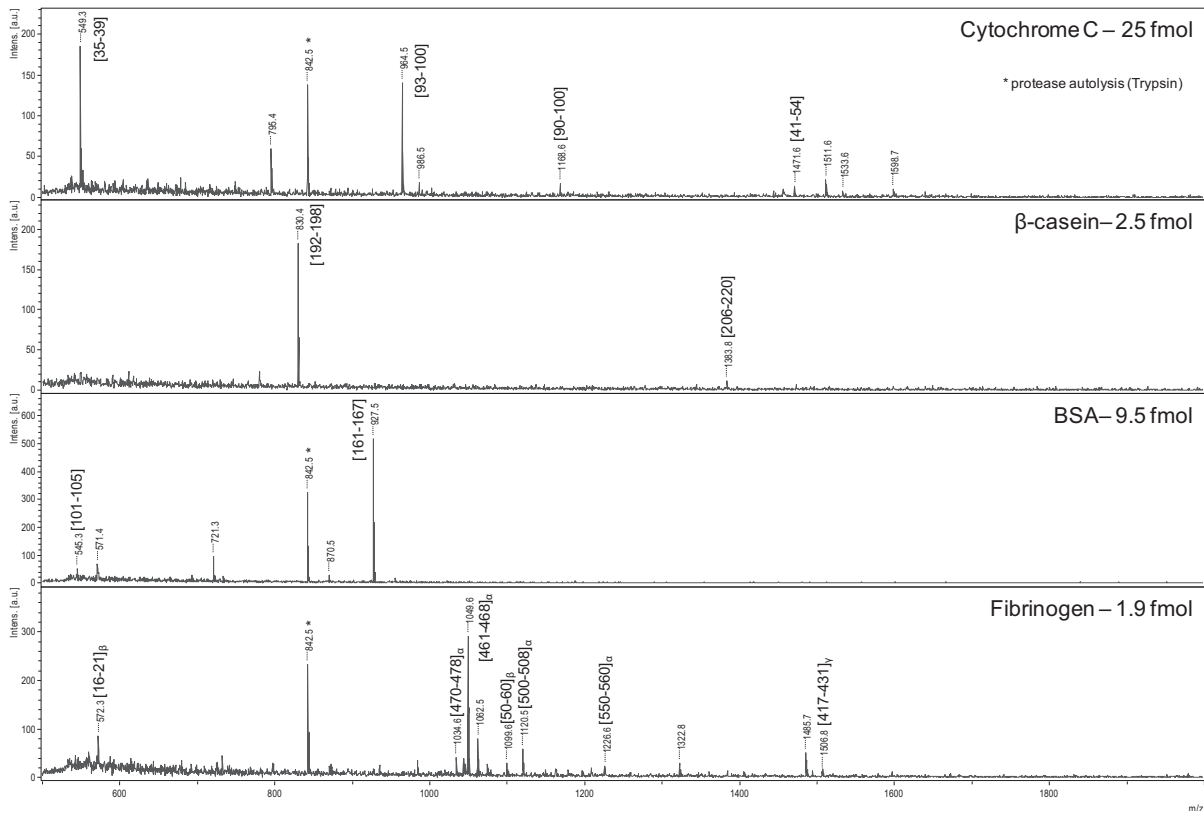


Figure S6. LDI/NanoSi MS spectra at the lowest concentration allowing MS experiment of tryptic digest of a) Cytochrome C, b) β -Casein, c) Bovine serum albumin and d) Fibrinogen.



**PARTIE D. *CONCLUSION ET
PERSPECTIVES***

"On ne fait jamais attention à ce qui a été fait ; on ne voit que ce qui reste à faire."

Marie Curie

Ce travail de thèse, axé autour de l'analyse de peptides en spectrométrie de masse, a fait suite d'une part aux travaux réalisés lors de la thèse de L. Mouls sur l'identification structurale de peptides en spectrométrie de masse en tandem, et d'autre part aux recherches mises en œuvre lors de la thèse de N. Shenar consacrées aux développements méthodologiques en spectrométrie de masse par Désorption/Ionisation Laser (LDI). Pendant ces trois années, ces deux axes d'études complémentaires ont été poursuivis et ont abouti à des résultats d'intérêt pour la communauté scientifique. En effet, les recherches développées en caractérisation de peptides en spectrométrie de masse en tandem et les investigations menées avec des méthodes LDI assistées de matrices inertes ont démontré tout l'intérêt de ces méthodologies, notamment dans le cadre d'études protéomiques. Dans cette conclusion, les deux axes d'investigation sont discutés successivement de façon indépendante. Ces recherches présentant un grand nombre d'études complémentaires à envisager, les perspectives de ce travail seront détaillées au fil de la discussion.

Le séquençage de peptide en spectrométrie de masse en tandem

Pour mener à bien les développements méthodologiques des méthodes alternatives LDI douces, des séquences peptidiques ont été conçues et synthétisées comme analytes modèles. Dans un premier temps, il a donc été nécessaire de caractériser les peptides modèles sélectionnés avec les méthodes d'ionisation douce traditionnelles, à savoir l'Ionisation Electrospray (ESI) et la Désorption/Ionisation Laser Assistée par une Matrice organique (MALDI). L'objectif de ce travail d'analyses MALDI-MS et MS/MS et ESI-MS et -MS/MS a été d'évaluer, tant en détection qu'en séquençage, le comportement de ces peptides synthétiques. Ces études ont permis de disposer de spectre de référence servant de base de travail pour pouvoir juger de la pertinence des résultats obtenus avec les techniques alternatives douces LDI-MS et -MS/MS.

Tout d'abord, les recherches menées sur ces peptides synthétiques ont permis d'appréhender le séquençage de peptides en spectrométrie de masse en tandem, de disposer d'une meilleure compréhension des mécanismes impliqués, mais également de déceler des comportements spécifiques à certaines séquences étudiées. Il est important de rappeler que la mise en œuvre d'études de séquençage de peptides modèles en spectrométrie de masse en tandem demeure primordiale pour la communauté des chercheurs en spectrométrie de masse et particulièrement en protéomique, pour tenter d'accéder à des informations de séquences de plus en plus fiables et complètes. L'intérêt de ces études prend tout son sens dans les recherches visant à une amélioration de l'interprétation des spectres MS/MS, notamment aux travers des logiciels d'identification, lorsqu'on s'aperçoit que malgré l'existence de mécanismes de dissociation bien établis, il persiste des ions fragments non déterminés. Dans certains cas, l'assignation de ces ions marginaux pourrait avoir une incidence non négligeable sur la détermination de séquences peptiques et donc réduire les erreurs ou imprécisions d'attribution.

Il faut signaler que la grande quantité de peptides synthétiques disponibles dans l'équipe de spectrométrie de masse (392 peptides), et de la bibliothèque de spectres MS/MS qui en découle (spectres ESI-MS/MS et MALDI-MS/MS), a joué un rôle important dans ces études. En effet, l'approche statistique constitue le principal outil pour observer et rationaliser des comportements particuliers en dissociation de peptides en spectrométrie de masse en tandem et remonter aux causes des fragmentations remarquées : est-ce propre à des séquences peptidiques, à des enchaînements particuliers d'acides aminés ou encore à la réactivité d'un résidu ? Pour mettre en œuvre ce type d'étude, il est donc nécessaire de disposer d'un nombre conséquent de peptides, de nature, taille, et composition différentes, et représentatifs des séquences rencontrées naturellement ou dans des études protéomiques. C'est dans ce cadre que la base de donnée établie au sein de l'équipe a permis d'effectuer un examen approfondi des spectres MS/MS issus des 392 peptides.

Un autre axe primordial de ce travail a été de confronter les résultats obtenus sur différents types d'appareillage permettant la mise en œuvre de la spectrométrie de masse en tandem. En effet, il est important de déterminer si les observations qui peuvent être déduite d'un spectre MS ou MS/MS sont propres à un instrument, à un dispositif, ou s'il est possible de standardiser les résultats obtenus quelles que soient les conditions expérimentales, la nature du peptide seul portant la clé de toutes les voies de fragmentation observées. De plus, la diversité des instruments commercialisés aujourd'hui fait qu'il n'est pas possible de se limiter à étudier le comportement des analytes sur un seul spectromètre de masse si on souhaite intéresser l'ensemble de la communauté. De part l'accessibilité à différents appareils propres à la plateforme analytique de l'IBMM, au Laboratoire de Mesures Physiques, et grâce à la mise en place de collaboration avec l'IRCM et le CEA (Marcoule), nous avons pu disposer de différents instruments. Cette diversité de techniques analytiques de spectrométrie de masse a constitué un atout majeur de ce travail car elle nous a permis de pouvoir disposer de spectres MS/MS obtenus à partir de différents mécanismes d'activation et de mettre en œuvre des comparaisons de comportement en fragmentation de peptides. Comme illustré dans la **Figure D-1**, il a été possible de comparer les approches réalisées avec les sources d'ionisation ESI et MALDI.

	ESI	MALDI
Couplage méthodes séparatives	✓	✗
Variété de méthodes d'analyse / d'activation	✓	✗
Sélection du précurseur	✓	✗
Gamme de masse	✓	~
Apport en information spectrale	✓	✓
Reproductibilité des intensités relatives	✗	✓
Fragmentation de chaînes latérales	selon activation	~
Reproductibilité des résultats d'un appareil à un autre	✗	✓
Facilité / rapidité d'acquisition	~	✓
Simplicité d'interprétation du spectre	selon précurseur	✓

Légende

✓ Satisfaisant

~ Acceptable

✗ Insuffisant

Technique de référence en protéomique (shotgun / top-down) et approches quantitatives

Pertinence de la technique

↓

LDI-MS/MS

Figure D-1. Comparaison des stratégies ESI-MS et –MS/MS et MALDI-MS et -MS/MS.

Tout d'abord, il a été observé que les analyses réalisées avec les MALDI-CID-TOF/TOF (4800 plus, AB Sciex) et MALDI-LIFT-TOF/TOF avec et sans ajout de gaz (CID) (Ultraflex III, Bruker) ont conduit à des spectres MS/MS très similaires, autant dans la nature des fragmentations observées que dans leurs intensités. Ensuite, malgré le peu d'engouement à l'heure actuelle pour la technique MALDI-TOF/TOF en séquençage peptidique, ces résultats ont également démontré la pertinence de l'utilisation de cet appareillage. En effet, l'ionisation ESI reste la technique de référence dans les approches protéomiques notamment pour les stratégies de type Shotgun et dans les analyses quantitatives, compte tenu de la facilité de couplage avec les méthodes séparatives et les associations possibles avec de multiples analyseurs, impliquant la possibilité de mettre en œuvre différentes méthodes d'activation. Néanmoins, la technique MALDI présente des atouts pour le séquençage de peptides puisque pour une pratique simple et rapide, elle permet d'accéder à des spectres MS/MS présentant des informations spectrales similaires avec des intensités relatives très reproductibles. Par la mise en place de ces deux axes de travail, nous avons pu aboutir à un travail de caractérisation profitable pour la communauté des chimistes et biologistes confrontés à la caractérisation de peptides, à travers la publication de deux articles, tout en prouvant la pertinence de continuer à travailler sur les stratégies LDI dans le cadre d'études en peptidomique et protéomique.

Analyses par Désorption/Ionisation Laser avec des matrices inertes

Dans la seconde partie de ce travail de thèse, il a été démontré tout le potentiel des méthodes LDI assistées par des matrices inertes pour la détection et la caractérisation de peptides. Différentes approches étudiées simultanément, basées sur des supports de type poudre et de type surface, ont permis de mener à bien le développement de méthodes alternatives à la technique MALDI. Ces travaux ont été validés à travers la publication de trois articles. Dans cette conclusion, il a été choisi de discuter indépendamment les voies de recherche étudiées en présentant pour chaque axe d'investigation les conclusions et les prochaines expériences à mener afin d'améliorer les méthodes LDI mises en place. Dans un second temps, une conclusion plus générale de ce travail a ensuite été présentée.

– Analyses LDI avec des matrices inertes de type poudre

Parmi les matrices de type poudre, plusieurs facteurs ont été abordés à travers principalement la nature et les caractéristiques des particules, et la fonctionnalisation de surface. Tout d'abord, les nanoparticules de silice non poreuses (NPs SiO₂) se sont avérées être le support permettant d'accéder aux meilleures performances, tant pour la simplicité de mise en œuvre du protocole expérimental que pour les prestations analytiques dans le cadre de détection des peptides, en présence d'un adjuvant d'ionisation. Les capacités de ce substrat à promouvoir la désorption/ionisation laser de peptides ont donc été minutieusement évaluées et validées à travers l'analyse de peptides synthétiques, purs et en mélange, et de peptides issus du digestat trypsique de la BSA. Les résultats obtenus pour les autres matrices inertes, particulièrement les substrats de titane, doivent encore être soumis à des investigations complémentaires pour satisfaire l'ensemble des objectifs posés. En particulier, il reste à trouver un adjuvant d'ionisation permettant de réduire la forte proportion d'espèces cationisées et inversement d'augmenter celles des espèces protonées, les études menées sur les additifs testés n'ayant pour le moment pas donné de résultats probants. Cependant, ce phénomène de cationisation ne constitue pas un obstacle pour toutes les analytes et des résultats prometteurs obtenus pour les nanoparticules de titane (NPs Ti) laissent penser qu'il est envisageable de développer des méthodes LDI basées sur ces substrats. Dans ce contexte, la détection d'échantillons de nature différente, principalement polymérique, ont notamment fait l'objet d'études préliminaires concluantes. A titre d'exemple, la **Figure D-2** illustre le comportement observé pour l'analyse d'un polyéthylène glycol (PEG 1000 commercial) réalisée avec une matrice organique HCCA et une matrice de NPs Ti. Il est remarqué sur les spectres MALDI / HCCA la présence de signaux abondants dans les faibles masses et une discrimination sur la distribution du PEG. En revanche, le spectre obtenu par l'analyse LDI / NPs TI permet de considérer une distribution plus large du PEG avec des signaux permettant de détecter des polymères présentant de 5 à 30 monomères, avec une intensité tout à fait satisfaisante.

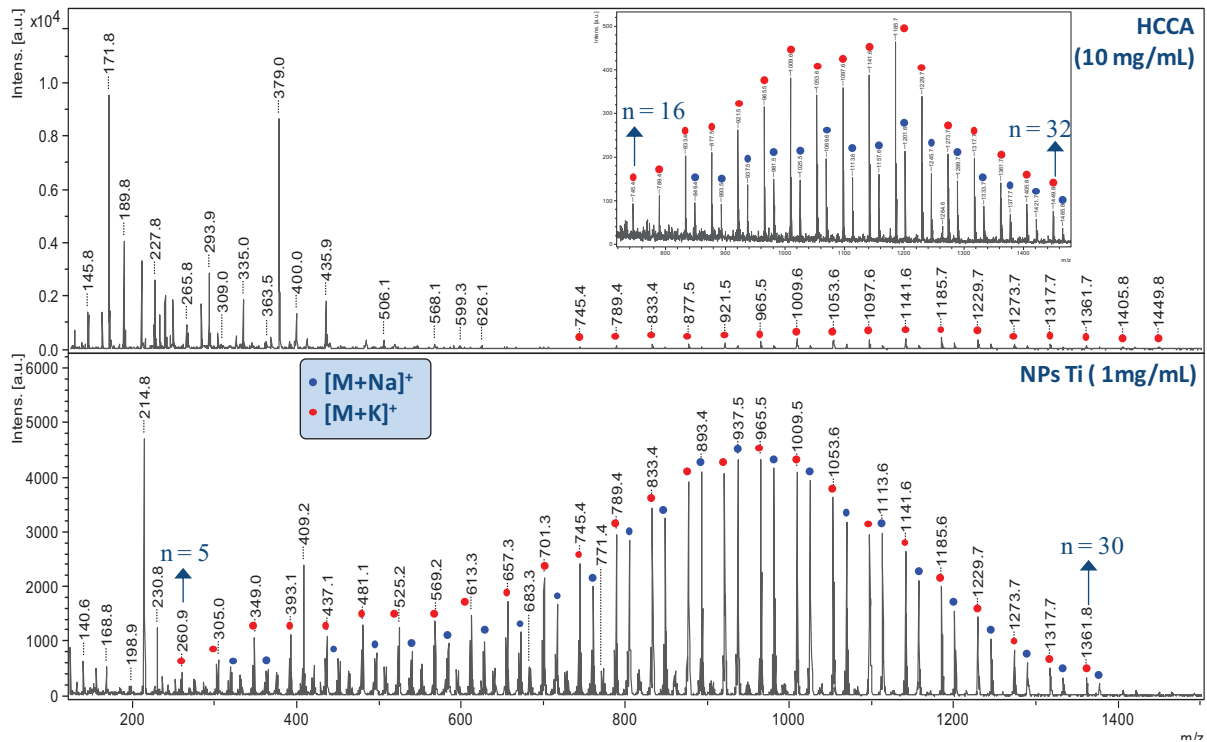


Figure D-2. Spectres du PEG 100 à 5 pmol déposées en MALDI-HCCA et en LDI-NPs Ti.

Ensuite, la fonctionnalisation de particules, bien que n'ayant pas permis d'obtenir les résultats escomptés, est également une voie à poursuivre, tant il a été démontré dans l'introduction qu'elle avait un rôle prépondérant dans l'ionisation. En ce qui concerne la fonctionnalisation avec des matrices organiques MALDI (HCCA et DHB), une explication pour l'absence d'augmentation de performances LDI peut être proposée. En effet, il est admis que la matrice organique est efficace dans le phénomène MALDI lorsqu'elle se présente avec une densité très importante. Dans ce cas, c'est un événement collectif qui permet d'accéder à la désorption/ionisation laser, les molécules de matrice étant toutes excitées simultanément en absorbant l'énergie du laser. Il est donc possible de supposer que dans notre cas, le taux de greffage de la matrice sur/dans les particules de silice doit être pris en considération et réévalué. Des recherches en collaboration avec des chimistes peuvent donc être envisagées pour tenter d'étudier l'influence de ce paramètre sur la désorption/ionisation laser assistée par ces particules plus largement modifiées. Outre la poursuite des investigations sur la fonctionnalisation avec des matrices MALDI, un autre aspect consistera à envisager de greffer différentes entités hydrophobes (groupements méthylés ou perfluorés par exemple) telles que celles utilisées dans les approches de type surface. Compte tenu de l'importance de la fonctionnalisation, il est logique de vouloir examiner l'effet de telles modifications sur les particules. Cela pourrait également permettre de disposer d'information supplémentaire sur le rôle de la silice non modifiée sur la détection, en observant si avec une fonctionnalisation de ce type, les performances sont exaltées ou au contraire détériorées.

Enfin, un autre axe d'investigation consiste en l'étude de l'influence de la taille des nanoparticules sur le phénomène LDI. Si les particules de silice non poreuses utilisées ont bien été caractérisées et ont présentées une distribution monodisperse en taille, il serait intéressant de réaliser des lots de différentes tailles en jouant sur des paramètres de la synthèse (temps de réaction notamment) pour appréhender l'impact de ce facteur sur les résultats LDI. En effet, il a été présenté dans l'introduction des travaux précisant que la taille des nanoparticules influait fortement sur la performance des méthodologies LDI. Il pourrait donc être envisagé de réaliser une étude en modulant la taille des nanoparticules de silice non poreuses de manière à disposer de différents lots (par exemple 10, 25, 50, 100, 150, 250 et 500 nm). L'évaluation des capacités LDI des ces NPs SiO₂ pourrait alors être menée pour juger si leurs dimensions influe positivement ou négativement sur les performances en détection de peptides.

– **Analyses LDI avec des matrices inertes de type surface**

La seconde voie d'investigation de ces méthodologies LDI assistée par des matrices inertes a été focalisée sur l'utilisation de surfaces nanostructurées pour permettre l'analyse par désorption/ionisation laser de peptides. Dans cette partie, différentes surfaces nanostructurées, réalisées par des méthodes de gravures chimiques ou par des approches de dépôts chimiques en phase vapeur, ont fait l'objet d'investigations sur leur potentiel en tant que matrice LDI. Une relation entre la structuration de surface et la fonctionnalisation chimique avec les performances LDI du support a ainsi pu être démontrée, toutefois sans qu'il soit possible réellement d'affirmer qu'un facteur soit plus déterminant que les autres dans le phénomène de désorption/ionisation. Les études détaillées ont ainsi démontré que la surface réalisée par gravure chimique d'un wafer de silicium par NH₄F/HNO₃/AgNO₃, composée d'une couche de silicium mésoporeux surmontée d'une couche de silicium nanostructurée fonctionnalisée par l'octadécyltrichlorosilane – dénommée NanoSi B - OTS – permettait d'accéder aux meilleurs performances notamment en termes de sensibilité de détection, mais également en limitant la discrimination spectrale. Après une validation poussée, cette méthodologie a ensuite été appliquée pour la détection de peptides provenant de digestats tryptiques issus de quatre protéines étudiées : le Cytochrome C (12 kDa), la β -Caséine (24 kDa), l'albumine de sérum bovin (BSA, 66 kDa) et le fibrinogène (340 kDa). Le recouvrement de séquences pour ces protéines a été déterminé non seulement à partir de la cartographie peptidique massive en LDI-MS, mais aussi à partir des données de séquence générées en LDI-MS/MS.

Au cours de ces études, il a également été démontré tout l'intérêt de la fonctionnalisation des surfaces pour améliorer les performances LDI intrinsèques du support. Cependant, cette propriété chimique peut intervenir dans de nombreux autres aspects qui n'ont pas du tout été étudiés au travers de cette thèse. En effet, il sera intéressant à l'avenir de se tourner vers des échantillons plus complexes, issus de milieux biologiques par exemple. Dans ce contexte, tel qu'il l'a déjà été

mentionné dans l'introduction, la fonctionnalisation de surface pourrait avoir un rôle prépondérant à travers la mise en place de protocoles simultanés permettant de réaliser sur une même surface des étapes de purification ou de concentration puis ensuite une analyse en spectrométrie de masse en irradiant directement le dépôt en désorption/ionisation laser.

Outre la chimie de surface, la mise en œuvre de technique complémentaire telle que la lithographie est un axe d'étude à développer pour améliorer les performances de cette approche. En effet, cette technique d'impression permet d'une part effectuer un repérage des zones de dépôt et d'autre part de réaliser un confinement des gouttes déposées en délimitant des zones hydrophobes/hydrophiles, comme illustré dans la **Figure D-3**.



Figure D-3. Surface NanoSi B – OTS après une étape de lithographie. La fonctionnalisation OTS est au centre des croix situées aux intersections des lignes (A, C, E) et des colonnes (1, 3, ...,11).

– **Bilan des méthodologies de Désorption/Ionisation Laser sur supports inertes**

Chacune des deux approches développées au cours de ces travaux, avec l'utilisation de matrices inertes se présentant sous la forme de poudre ou sous la forme de surface, a présenté des avantages qui permettraient d'apprécier la matrice la plus compétitive et efficace selon l'application que l'on souhaite mettre en œuvre. Pour établir une comparaison de ces méthodologies, il a été proposé dans la **Figure D-4** de résumer leurs principales caractéristiques sous la forme d'un tableau comparatif. Les capacités de chaque approche (dans l'état) sont ainsi récapitulées suivant les deux axes principaux que sont la mise en œuvre du protocole expérimental et les performances analytiques globales.

	Approche type poudre <i>NPs SiO₂</i>	Approche type surface <i>Surface B - OTS</i>
Protocole		
<u>Substrat</u>	Facile (Sol-gel) < 2 € / mg → 2 000 dépôts Accessible (DLS, TEM) Aisée	Délicate (gravure à l'HF) 4-10 € / cm ² → 10 dépôts Difficile (SEM, angle de contact) < 1 mois pour performances optimales
<u>Manipulation</u>	Aucun double (avec pré-déposition de la silice) peu sensible	Préférable Dépôt direct sensible
Global	++	+
Analyse de peptides		
Adjuvant d'ionisation	Indispensable (PFOS, K ⁺)	Recommandé (Citrates d'ammonium)
% laser	~ 20-30 % (> MALDI/HCCA)	~ 10-20 % (~ MALDI/HCCA)
% espèces protonées	~ > 70 %	~ > 70 %
Absence d'interférences dans les basses masses	Bonne mais présence de l'ion [PFOS+K] ⁺ (m/z 577)	Bonne mais présence de l'ion [CA+K] ⁺ (m/z 231)
Répétabilité / Variation	< Seuil de tolérance	< Seuil de tolérance
Gamme d'analyse efficace	100 - 2 000	100 - 2 500
Sensibilité peptides synthétiques	~ 50 fmol déposées	~ 50 fmol déposées
Sensibilité digestats tryptiques	~150 fmol déposées	~ 10 fmol déposées
Performances globales	+	++

Figure D-4. Comparaison des stratégies LDI-MS et -MS/MS assistées par des matrices inertes de type poudre et des matrices inertes de type surface.

De cette figure, il est possible de résumer les principaux atouts de chacun des deux méthodologies :

La méthode LDI / NPs SiO₂ propose une approche très simple, peu coûteuse, réalisable dans n'importe quel laboratoire disposant d'un équipement basique de synthèse organique. De plus, elle présente des performances LDI tout à fait satisfaisantes et complémentaires à celle obtenues en MALDI / HCCA. Le principal avantage de ce procédé est de pouvoir utiliser les NPs SiO₂ comme une matrice "parmi d'autres", permettant ainsi de réaliser simultanément sur une même cible des analyses LDI / NPs SiO₂ et MALDI / matrice(s) organique(s). Selon moi, cette approche est à utiliser en parallèle des matrices organiques traditionnelles lorsqu'on souhaite disposer de différentes conditions analytiques pour un échantillon, ce qu'on fait souvent en MALDI en utilisant par exemple systématiquement différentes matrices pour un échantillon inconnu.

La méthode LDI / surfaces NanoSi implique quant à elle une mise en œuvre un peu plus délicate à travers l'utilisation d'acide fluorhydrique notamment, ou de la maîtrise des outils de caractérisation. Une expertise dans la chimie des matériaux est donc indispensable pour parvenir à obtenir des surfaces robustes, fiables et bien caractérisées. Cette approche révèle un caractère plus spécifique, puisqu'elle nécessite un équipement nécessaire mais permet d'accéder à des performances élevées, notamment en termes de limite de détection. De mon point de vue, elle est à utiliser s'il y a une réelle nécessité d'obtenir une bonne sensibilité sur des analytes de petites masses pour lesquelles des difficultés auraient déjà été rencontrées dans des analyses préalables. Au vue des avancées déjà réalisées sur ces surfaces, particulièrement avec la fonctionnalisation de surface, cette voie de

recherche semble la plus prometteuse pour se tourner vers les analyses présentant des caractères simultanées de séparation/détection.

Pour ces deux méthodologies, il est également possible de proposer des perspectives communes. Ainsi, un autre champ d'investigation à considérer est l'analyse de petites molécules. En effet, si l'identification de peptides constitue une réelle application des méthodologies LDI, l'analyse de petites molécules constitue elle aussi un véritable défi. En effet, depuis quelques années, la métabolomique, ou l'analyse du métabolome, a connu une progression majeure dans l'intérêt porté par les communautés scientifiques, et en particulier en spectrométrie de masse. Les approches métabolomiques sont basées sur l'identification voir la quantification de métabolites ciblés, qui sont des molécules ayant un rôle direct ou secondaire dans les processus métaboliques. Dans ce cadre, les molécules ont généralement des masses inférieures à 500 Da et elles sont donc difficilement analysables en stratégies MALDI classiques. Les approches LDI permettant de travailler avec des limites de masses inférieures à celles classiquement fixées en MALDI peuvent alors laisser présager de l'intérêt de cette technique.

Enfin, une autre application à proposer consisterait en l'utilisation de ces substrats inertes dans des études d'imagerie LDI. Les récents développements réalisés en imagerie MALDI font actuellement de cette technique un outil analytique très prometteur pour réaliser des analyses de composés sur tissus. Cette méthode permet en effet d'accéder directement à des informations capitales par la localisation de molécules ciblées sur des échantillons solide de natures biologiques. Cependant, il est reconnu que la mise en œuvre de cette technique reste très dépendante de la combinaison matrice/échantillon. En effet, des problèmes de mise en œuvre du dépôt de la matrice peuvent particulièrement limiter ces approches, dont la délocalisation des molécules d'intérêt dans le tissu constitue un exemple. C'est dans ce contexte que pourrait intervenir l'utilisation de matrices inertes, permettant d'une part de simplifier le protocole de préparation, et d'autre part de conserver l'intégrité des tissus et des répartitions moléculaires en évitant toute interaction avec l'échantillon.

Pour conclure, il a été démontré au travers de ce manuscrit que les travaux réalisés pendant cette thèse ont permis d'avancer sur les deux axes d'investigations que sont la caractérisation de peptides en spectrométrie de masse en tandem et le développement de méthodes d'analyse de peptides par désorption/ionisation laser. Ces recherches, bien que productives en termes de résultats, ont amené à se poser de nouvelles interrogations, à ouvrir de nouvelles voies de recherches. Selon moi, il est donc important de poursuivre les investigations sur les deux thématiques en parallèle car, comme il a été présenté dans ce dernier chapitre, de nombreuses perspectives se présentent maintenant. D'un point de vue plus personnel, pouvoir traiter ces sujets complémentaires m'a permis de disposer

d'une formation pointue dans la spécialisation que j'ai choisie, la spectrométrie de masse, mais aussi, grâce aux nombreuses collaborations que j'ai pu menées, de disposer de connaissances très enrichissantes dans d'autres domaines. A l'heure où les sciences interagissent de plus en plus entre elles, cet aspect pluridisciplinaire est un atout pour poursuivre une carrière de chercheur...

LISTE DES FIGURES, TABLES ET GRAPHES

Figures

Figure A-1. Illustration de l'impact d'une particule primaire en spectrométrie de masse par désorption/ionisation d'après [3 Busch, 1995].	3
Figure A-2. Spectre "Matrix-UVLD" de la lactoglobuline A d'après [15 Karas <i>et al.</i> , 1988].	6
Figure A-3. Désorption ion-molécule avec une matrice UFMP (poudre de métal ultrafine) d'après [18 Tanaka, 2003].	6
Figure A-4. Schéma de principe des techniques a) DESI et b) DART selon [24 Cooks <i>et al.</i> , 2006].	8
Figure A-5. Représentation du changement de densité pendant un événement MALDI (La courbe bleue représente une impulsion laser typique, la courbe verte la population d'états excités et les courbes rouges la densité relative de la plume s'étendant contre le temps).	12
Figure A-6. Processus unimoléculaire et bimoléculaire selon le modèle "pooling/photoionization" d'après [33 Knochenmuss, 2006].	14
Figure A-7. Représentation des processus majoritaires proposé dans le modèle "cluster" d'après [33 Knochenmuss, 2006].	15
Figure A-8. Sélection des principales méthodologies LDI assistées par des matériaux inertes (représentée en page suivante).	23
Figure A-9. Spectres de masse LDI-UV de la gramicidine D, l'ubiquitine, et le cytochrome C utilisant (a-c) le système glycérol/graphite et (d-f) le système NBA/graphite comme matrices d'après [54 Dale <i>et al.</i> , 1996].	27
Figure A-10. Spectres de masse MALDI du stéarate de méthyle en utilisant des particules de TiO ₂ suspendues dans (a) du glycérol et (b) de la paraffine liquide d'après [62 Kinumi <i>et al.</i> , 2000].	29
Figure A-11. Interface utilisée pour le dépôt CCM des analytes d'après [63 Han <i>et al.</i> , 2000].	30
Figure A-12. Préparation de l'analyse TLC-SALDI d'après [65 Wu <i>et al.</i> , 2002].	30
Figure A-13. Principe de la méthode LDI utilisant des nanoparticules d'or fonctionnalisées à l'HCCA en mélange dans du glycérol d'après [66 Duan <i>et al.</i> , 2009].	31
Figure A-14. Exemple de la fonctionnalisation par la méthode SEND [67 Hutchens <i>et al.</i> , 1993], et différentes surfaces réalisées pour la mise en œuvre de la technique SELDI d'après [69 Tang <i>et al.</i> , 2004].	33
Figure A-15. Schéma d'une matrice SAM et des monomères utilisés (orientation des molécules arbitrairement définie) [71 Mouradian <i>et al.</i> , 1996].	33

Figure A-16. (a) Structure de l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque et (b) Proposition de structure polymérique sol-gel piégeant le DHB d'après [75 Lin <i>et al.</i> , 2002].	34
Figure A-17. Configuration expérimentale d'une expérience DIOS d'après [78 Wei <i>et al.</i> , 1999]. a. Plaque MALDI contenant 4 plaques de silicium poreux, b. Désorption/ionisation sur silicium poreux induite par le laser, c. Coupe transversale de la surface de silicium poreux fonctionnalisée après hydrosilylation.	36
Figure A-18. Spectres de mélanges de petites molécules obtenus sur les surfaces DIOS avec deux fonctionnalisations différentes, d'après [89 Trauger <i>et al.</i> , 2004].	39
Figure A-19.a. Les structures des différents tensioactifs étudiés b. Spectres de masse de la BSA (100 fmol) obtenus sur la surface DIOS selon différents tensioactifs (0,25 mM) d'après [94 Nordstrom <i>et al.</i> , 2006].	40
Figure A-20. Schéma de fabrication du réseau de nanocavités ordonnées de silicium par RIE d'après [105 Finkel <i>et al.</i> , 2005].	45
Figure A-21. D'après [107 Go <i>et al.</i> , 2005] A. Energie laser par impulsion utilisée dans différentes techniques LDI. B. Comparaison de l'énergie laser requise pour désorber/ioniser des petites molécules sur pSi et sur SiNWs. C. Taux de survivants obtenus pour l'analyse du chlorure de 3-méthoxybenzylpyrimidium selon différentes techniques LDI et MALDI.	46
Figure A-22. D'après [108 Daniels <i>et al.</i> , 2008] A. Plaques NALDI et images SEM à deux échelles différentes. B. Illustration du caractère hydrophobe de la surface de SiNWs.	47
Figure A-23. Schéma des différentes modifications effectuées sur la surface de silicium d'après [124 Tsao <i>et al.</i> , 2012].	52
Figure A-24. Les différentes formes allotropiques du Carbone utilisées dans les méthodologies LDI.	55
Figure A-25. Image TEM des CNTs d'après [146 Xu <i>et al.</i> , 2003].	57
Figure A-26. D'après [150 Ren <i>et al.</i> , 2005], comparaison (a) de la solubilité des CNTs et des CNTs oxydés dans l'eau (b) des dépôt de CNTs et de CNTs oxydés sur la plaque en acier.	58
Figure A-27. Image SEM de la surface de graphite colloïdale déposé par nébulisation d'après [162 Cha <i>et al.</i> , 2007].	60
Figure A-28. Photographie d'un film PGS commercialisé par Panasonic.	61
Figure A-29. Schéma de préparation de 6 substrats LDI testés (graphène, MCWNT et graphène/MWNCT) d'après [170 Kim <i>et al.</i> , 2012].	62
Figure A-30. Schéma du support multicouche terminé par la surface DLC d'après [173 Najam-ul-Haq <i>et al.</i> , 2008].	63
Figure A-31. Principe de l'analyse de phosphopeptides utilisant des NPs Fe ₃ O ₄ /TiO ₂ d'après [172 Chen <i>et al.</i> , 2005].	66

Figure A-32. Spectres de l'angiotensine obtenus avec des NPs de TiO₂ suivant différentes modifications a) avec ajout de tampon citrate et b) sans ajout de tampon citrate d'après [189 Watanabe *et al.*, 2009]..... 68

Figure A-33. D'après [192 Bi *et al.*, 2009], a) Schéma de coupe de la plaque modifiée recevant la feuille d'aluminium. Photo de la plaque modifiée b) avec la feuille d'aluminium, c) avec le TiO₂ déposé par sérigraphie sur la feuille d'Aluminium d) avec le TiO₂ déposé par rotogravure sur la feuille d'aluminium. e) Processus de la rotogravure : image de l'appareillage, zoom sur les régions gravées définissant la forme de l'impression et schéma des structures des régions gravées..... 70

Figure A-34. Spectres de masses LDI-MS de la substance P obtenus avec la matrice AuNPs d'après [201 McLean *et al.*, 2005]..... 73

Figure B-1. Structures chimiques de quelques matrices utilisées dans la technique MALDI. 88

Figure B-2. Schéma de la source du MALDI Ultraflex III (d'après "Ultraflex III User Manual")..... 91

Figure B-3. Système d'introduction de la plaque sur (a) le MALDI Ultraflex III (Bruker) et (b) le MALDI 4800 plus (AB Sciex). 92

Figure B-4. Schéma (a) du spectromètre de masse MALDI 4800 plus (AB Sciex) et (b) de la spectrométrie de masse en tandem MALDI-CID-TOF/TOF d'après un schéma publié par Cotter [236 Cotter *et al.*, 2005]. 96

Figure B-5. Schéma (a) du spectromètre de masse MALDI Ultraflex III (d'après "Ultraflex III User Manual") [236 Cotter *et al.*, 2005]..... 98

Figure B-6. Principe de l'imagerie MALDI-TOF [239 Wisztorski *et al.*, 2007]..... 99

Figure B-7. La source Z-spray™, a) vue photographique de face et b) représentation schématique de coupe..... 100

Figure B-8. Principe de l'Electrospray d'après une schéma de [240 Vinh, 1999]. 101

Figure B-9. Schéma du spectromètre de masse ESI-QqQ (QUATTRO Micro 1). 103

Figure B-10. Schéma du spectromètre de masse ESI-QqTOF (QToF 1 Waters)..... 104

Figure B-11. Photo de l'adaptateur 1 et schéma de l'adaptateur 2 spécialement conçus pour les études LDI..... 112

Figure B-12. Photo de (a) la cible NALDI™ et son adaptateur et (b) de dépôts sur la cible NALDI. ... 113

Figure B-13. Schéma de principe de fabrication des nanostructures sur silicium par gravure chimique assistée par métal, reproduit d'après la thèse de Florian Lapierre [243 Lapierre, 2011]. 115

Figure B-14. Schéma du processus de croissance VLS d'un nanofils de silicium d'après la thèse de Florian Lapierre [243 Lapierre, 2011]. 116

Figure B-15. Représentation schématique des séquences peptidiques "trypsiques" et "Lys-N". 118

Figure B-16. Occurrences des acides aminés en milieu naturel et dans nos peptides [244 ExpASy].... 120

Figure B-17. Schéma du principe de la synthèse sur phase solide, d'après [247 Baron, 2010]. 121

Figure C-1. Modèle du proton mobile d'après [252 Paizs *et al.*, 2005]. 131

Figure C-2. Nomenclature des ions de séquence d'après [²⁴⁸ Roepstorff <i>et al.</i> , 1984].	131
Figure C-3. Les voies de fragmentation des peptides d'après [²⁵² Paizs <i>et al.</i> , 2005].	132
Figure C-4. Formation des ions b et y selon la voie de fragmentation b_x-y_z .	133
Figure C-5. Formation des ions y selon la voie de fragmentation y_z .	134
Figure C-6. Formation des ions y selon la voie de fragmentation y_z : cas particulier de la dicétopipérazine.	134
Figure C-7. Formation des ions y et a_1 selon la voie de fragmentation a_1-y_x par la formation d'une imine.	135
Figure C-8. Formation des ions y et a_1 selon la voie de fragmentation a_1-y_x par la formation d'une aziridinone.	136
Figure C-9. Formation des ions a puis d'ions b selon la voie de fragmentation b_x-b_{x-1} .	137
Figure C-10. Réarrangements des ions b par "scrambling" <i>via</i> la formation d'un macrocyle.	137
Figure C-11. Schéma de formation des ions immoniums par les voies de fragmentation $b_x \rightarrow a_x$ et $b_x \rightarrow a_x$ à partir d'ion b, ou la voie de fragmentation a_1-y_z à partir de l'ion y.	138
Figure C-12. Comparaison des approches de type poudre.	208
Figure D-1. Comparaison des stratégies ESI-MS et -MS/MS et MALDI-MS et -MS/MS.	283
Figure D-2. Spectres du PEG 100 à 5 pmol déposées en MALDI-HCCA et en LDI-NPs Ti.	285
Figure D-3. Surface NanoSi B – OTS après une étape de lithographie. La fonctionnalisation OTS est au centre des croix situées aux intersections des lignes (A, C, E) et des colonnes (1, 3, ...,11).	287
Figure D-4. Comparaison des stratégies LDI-MS et -MS/MS assistées par des matrices inertes de type poudre et des matrices inertes de type surface.	288

Tables

Table A-1. Les différentes techniques de désorption/ionisation utilisées en spectrométrie de masse.	8
Table A-2. Les différentes morphologies des matériaux poreux selon l'IUPAC [⁷⁹ IUPAC, 1994].	36
Table A-3. Récapitulatif des méthodes utilisant les nanoparticules d'or fonctionnalisées pour successivement extraire et analyser des composés organiques.	74
Table A-4. Présentation de quelques méthodes LDI récemment développées basées sur l'utilisation d'éléments métalliques et métalloïdes.	77
Table B-1. Poudres de silice synthétiques utilisées comme support LDI dans le cadre de cette thèse	109
Table B-2. Surfaces nanostructurées testées pour des analyses de peptides par LDI.	114
Table B-3. Peptides synthétisés dans le cadre de la thèse.	119
Table B-4. Tableau récapitulatif des séquences composant la peptidothèque interne à l'équipe de spectrométrie de masse.	119
Table B-5. Composition des 7 mélanges de peptides tryptiques.	124

Graphes

Graphe A-1. Répartition des publications parues sur les développements de techniques douces LDI.	22
Graphe A-2. Représentation des rapports S/N obtenus pour différents composés pharmaceutiques (10 pg/ μ l, 1 μ l déposé) analysés sur les plaques NALDI, d'après [¹¹⁰ Bruker.Daltonics, 2008].	48
Graphe B-1. Graphique des temps de rétention des peptides établis par RP-HPLC.	123

ANNEXE 1 - PARAMETRAGES DES SPECTROMETRES DE MASSES UTILISES

MALDI-LIFT-TOF/TOF (Ultraflex III, Bruker)

Les analyses MS et MS/MS en MALDI et LDI ont été effectuées en totalité sur le spectromètre de masse MALDI-LIFT-TOF/TOF (Ultraflex III, Bruker Daltonics. Il est équipé d'un laser pulsé Nd:YAG ($\lambda = 355$ nm), de la technologie LIFT offrant la possibilité de basculer en mode MS/MS.

Paramètres utilisés en mode MS :

- Polarité : positive (majoritairement)
- Délai d'extraction : 30 ns
- Source : IS1 25 kV et IS2 21,95 kV
- Lentille : 9,6 kV
- Réflectron : RV1 26.3 kV et RV2 13.8 kV
- Déflexion : variable
- Fréquence laser : 100-200 Hz
- Nombre de coups/spectre : 250 - 500
- Gamme d'analyse : variable (0 - 3500 m/z)
- Puissance laser : variable
- Focus laser : variable

Paramètres utilisés en mode MS/MS :

- Source : IS1 8,0 kV et IS2 7,25 kV
- Lentille : 3,2 kV
- Réflectron : RV1 29,5 kV et RV2 13.9 kV
- Puissance laser 1 → puissance laser 2 : variable
- Nombre de coups/spectre : 500 - 1 000
- Gamme d'analyse : 250 – 2 000 m/z)
- Avec/sans gaz inerte (LID/CID) : argon

MALDI-TOF/TOF (4800 plus, AB Sciex)

Une sélection de peptides a été analysé en MALDI-MS/MS sur le spectromètre 4800 plus (AB Sciex). Il est équipé d'un laser Nd-YAG (355 nm, 200 Hz), avec une cellule de collision permettant d'effectuer le mode MS/MS en CID haute énergie.

Paramètres utilisés en mode MS :

- Polarité : positive
- Délai d'extraction : 10 ns
- Source : Source 120 kV et Grid1 16 kV
- Lentille : 10 kV
- Réflectron : M1 14,1kV et M2 20,3 kV
- Fréquence laser : 100-200 Hz
- Nombre de coups/spectre : 250 - 500
- Gamme d'analyse : 250 – 2 000 m/z
- Puissance laser : variable

Paramètres utilisés en mode MS/MS :

- Energie de collisions : 0-2 keV
- Fréquence laser : 100-200 Hz

- Nombre de coups/spectre : 500 -1 000
- Gamme d'analyse : 250 – 2 000 m/z
- Puissance laser : variable

Paramètres du mode imagerie :

- Résolution : 50 μm
- Puissance laser : 75 % (intensité de 6 000)

ESI-Q (ZQ2000 Waters)

Le contrôle qualité des peptides synthétisés a été assuré par le spectromètre de masse ZQ2000 (Waters). Il est composé d'une source ESI de géométrie Z-Spray MKII et d'un simple quadripôle permettant de détecter sur la gamme de masse 50-2000 uma. Il est couplé à la chromatographie liquide haute performance (HPLC, Waters Alliance 2695) et est en complément de la détection UV (Waters 2489). L'acquisition des analyses ainsi que le traitement des données sont réalisés par le logiciel MassLynx, version 4.1. Deux méthodes de chromatographie ont été utilisées.

Une première méthode de routine a été employée pour effectuer le contrôle de la synthèse des peptides :

Phase mobile :

- eau/acétonitrile, 0,1% acide formique
- gradient linéaire de 0 à 100 % d'acétonitrile appliqué en 2 minutes et 30 secondes
- débit : 1,00 ml/min

Phase stationnaire :

- Phase monolithique Onyx C18
- Taille des pores : 2 μm
- Marque Phenomenex
- Température de colonne : 20°C
- Dimensions : 250 x 4,6 mm

Une seconde méthode a été utilisée pour effectuer l'évaluation du caractère hydrophobe des peptides :

Phase mobile :

- eau/acétonitrile, 0,1% acide formique
- gradient linéaire de 1% à 80% d'acétonitrile appliqué en 120 minutes
- débit : 1,00 ml/min

Phase stationnaire :

- Phase Nucleosil C18
- Particules : 5 μm
- Marque Phenomenex
- Température de colonne : 20°C
- Dimensions : 250 x 4,6 mm

- Paramétrages du spectromètre de masse
 - Source : Electrospray
 - Analyseur : Quadripôle
 - Mode d'acquisition : Positif
 - Mode de balayage : MS scan
 - Gamme de masse : 100 – 1 000
 - Détecteur : Photomultiplicateur
 - Calibration : NaI
 - Tension de capillaire : 3 kV
 - Tension de cône : 20 V
 - Température de source : 120°C
 - Température de désolvatation : 450°C
 - Débit du gaz nébulisateur (N₂) : 50 l/h
 - Débit du gaz desséchant (N₂) : 450 l/h

ESI-QqQ (QUATTRO Micro 1)

La fragmentation de peptides de synthèse a été effectuée sur le spectromètre QUATTRO Micro 1 (Waters). Il est composé d'une source ESI de géométrie Z-Spray MKII et d'un triple quadripôle permettant de détecter sur la gamme de masse 50-2000 uma et de réaliser les MS/MS. L'acquisition des spectres de masse ainsi que le traitement des données sont réalisés par le logiciel MassLynx, version 4.0. Il a été utilisé en mode introduction directe.

Les spectres MS et MS/MS ont été enregistrés selon les réglages instrumentaux suivants :

Mode MS

- Mode Positif
- Température de source : 120°C
- Tension du capillaire : 3 kV
- Tension de cône : 20-30 V
- Gaz nébulisateur et rideau : N₂
- Tension de cône : 20 V
- Température de source : 120°C
- Température de désolvatation : 400°C
- Débit du gaz nébulisateur (N₂) : 50 l/h
- Débit du gaz desséchant (N₂) : 400 l/h

Mode MS/MS

- CID (Collision-Induced Dissociation)
- Gaz de collision : Argon
- Ions précurseurs : [M+H]⁺, [M+2H]²⁺ et [M+3H]³⁺
- Tension de cône : 15-50 V
- Energie de collision : 5-45 eV

ESI-QqTOF (QTof 1 Waters)

La fragmentation de peptides de synthèse a été effectuée sur le spectromètre QTof premier (Waters). Il est composé d'une source ESI de géométrie ZSpray Mark1 et d'un quadripôle associé à un temps de vol permettant de détecter dans notre cas sur la gamme de masse 40-5000 uma et de réaliser les MS/MS. L'acquisition des spectres de masse ainsi que le traitement des données sont réalisés par le logiciel MassLynx, version 4.0. Il a été utilisé en mode introduction directe.

Les spectres MS et MS/MS ont été enregistrés selon les réglages instrumentaux suivants :

Mode MS

- Mode Positif
- Température de source : 100°C
- Tension du capillaire : 3 kV
- Tension de cône : 20-30 V
- Gaz nébulisateur et rideau : N₂
- Température de source : 120°C
- Température de désolvatation : 400°C
- Débit du gaz nébulisateur (N₂) : 50 l/h
- Débit du gaz desséchant (N₂) : 400 l/h

Mode MS/MS

- CID (Collision-Induced Dissociation)
- Gaz de collision : Argon
- Ions précurseurs : [M+H]⁺, [M+2H]²⁺ et [M+3H]³⁺
- Tension de cône : 15-50 V
- Energie de collision : 5-45 eV

HPLC préparative – ESI-Q (Waters Micromass ZQ)

Les peptides synthétiques (solubilisés dans un mélange eau/acétonitrile (50/50 v/v) contenant 0.1 % de TFA) ont été purifiés sur le système d'autopurification LC/MS (Waters) comprenant une pompe binaire (Waters 2525), un collecteur de fraction (Waters 2676), couplé à un spectromètre de masse (Waters Micromass ZQ). Le contrôle de la collection des fractions est effectué sur les ions monochargés et dichargés avec un seuil d'intensité minimal (MIT pour minimum intensité threshold) de 7.10⁵. L'acquisition des spectres de masse ainsi que le traitement des données sont réalisés par le logiciel MassLynxTM, version 4.1.

- Paramétrages de L'HPLC

Phase mobile :

- éluant A : eau/0.1 % de TFA ; éluant B : acétonitrile/0.1 % de TFA
- gradient de 0-40 % en éluant B de 10 minutes
- Débit : 20 ml/minute

Phase stationnaire :

- colonne préparative C18 (XBridgeTM Prep C18, Waters)
- dimension 19x100mm
- dimensions des particules sphériques : 5 µm (OBD)
- Partageur de débit : 204 µL/min vers la MS
- Température de colonne : 20°C
- Pression de la colonne : 50 bars pour 100 % d'eau

- Paramétrages du spectromètre de masse

- Source : Electrospray
- Analyseur : Quadripôle
- Mode d'acquisition : Positif
- Mode de balayage : MS scan
- Gamme de masse : 100 – 1 000
- Détecteur : Photomultiplicateur
- Calibration : NaI
- Tension de capillaire : 3 kV
- Tension de cône : 20 V
- Température de source : 120°C
- Température de désolvatation : 450°C
- Débit du gaz nébulisateur (N₂) : 50 l/h
- Débit du gaz desséchant (N₂) : 450 l/h

ANNEXE 2 - SYNTHÈSE DES MATERIAUX

Nanoparticules de silice non poreuse nue

Les nanoparticules ont été synthétisées sous l'encadrement du Dr. J-O Durand de l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier (ICGM) conformément à la méthode de synthèse sol-gel décrite dans une publication de Tang [²⁴² Tang *et al.*, 2005]. La réaction consiste à mélanger une solution de méthanol (99,9%, 24 ml), et une solution aqueuse d'hydroxyde d'ammonium (30% d'ammoniac, 6ml). L'ajout du précurseur tétraéthoxysilane (TEOS, 99,9%, 0,2 ml) se fait goutte à goutte sous agitation magnétique vigoureuse de la solution pour initier la réaction d'hydrolyse. La solution est agitée pendant 2h, puis est transférée dans une cellule d'ultracentrifugation. Après centrifugation (20 000 tr/min), le surnageant contenant les réactifs n'ayant pas réagi est éliminé et les particules formées sont lavées. Pour ce faire, elles sont solubilisées dans l'éthanol puis soumises aux ultrasons pendant 20 minutes afin d'assurer une bonne dispersion. De nouveau, la solution est centrifugée puis le surnageant éliminé. Le cycle de lavage et de centrifugation est répété 5 fois. Les particules sont ensuite récupérées et séchées sous vide. Les nanoparticules ont ensuite été caractérisées en diffusion dynamique de la lumière (DLS pour Dynamic Light Scattering) et en microscopie électronique à transmission (TEM). Elles présentent une forme sphérique, une distribution monodisperse et une taille comprise entre 100 et 200 nm selon les lots de synthèse. La synthèse ainsi que les résultats et les figures sont présentés dans l'[Article 3: Silica nanoparticles pre-spotted onto target plate for LDI mass spectrometry analyses of peptides](#).

Nanoparticules de silice non poreuse fonctionnalisées à l'HCCA et au DHB (approche 3)

On réalise le synthon [matrice fonctionnalisée par l'aminopropyltriéthoxysilane] et on l'introduit dans le protocole de synthèse des nanoparticules de silice. Pour cela, les molécules de matrices (HCCA ou le DHB, 1 eq) sont mises en solution sous agitation magnétique dans le dichlorométhane anhydre (2 ml), puis l'hydroxybenzotriazole (HOBT, 1eq) est rajouté. La solution de diisopropylcarbodiimide (DIC, 1,1 eq) est ensuite ajoutée. On additionne alors successivement l'aminopropyltriéthoxysilane (APTES, 1eq) au bout de 10 min et le précurseur tétraéthoxysilane (TEOS, 99,9%, 0,2 ml) de nouveau après 10 min. La solution est laissée pendant 30 min, puis on ajoute progressivement la solution aqueuse d'hydroxyde d'ammonium (30% d'ammoniac, 6ml) et une solution de méthanol (99,9%, 24 ml). Après agitation pendant 2H de la solution, la solution est centrifugée, les particules sont reprises dans l'éthanol sous ultrasons puis sont lavées selon plusieurs cycles de rinçage à l'éthanol (tel que décrit dans le protocole de synthèse des nanoparticules de silice non poreuses). Les particules sont ensuite récupérées et séchées sous vide. La présence de l'incorporation des molécules de matrice a été mise en évidence à travers des analyses UV, RMN ²⁹Si et des analyses élémentaires différentielles entre

des nanoparticules nues et des nanoparticules modifiées (%C et %N) (résultats non discutés). Les particules ont ensuite été caractérisées en diffusion dynamique de la lumière (DLS pour Dynamic Light Scattering) et en microscopie électronique à transmission (TEM). Le schéma réactionnel de synthèse est récapitulé ci-dessous.

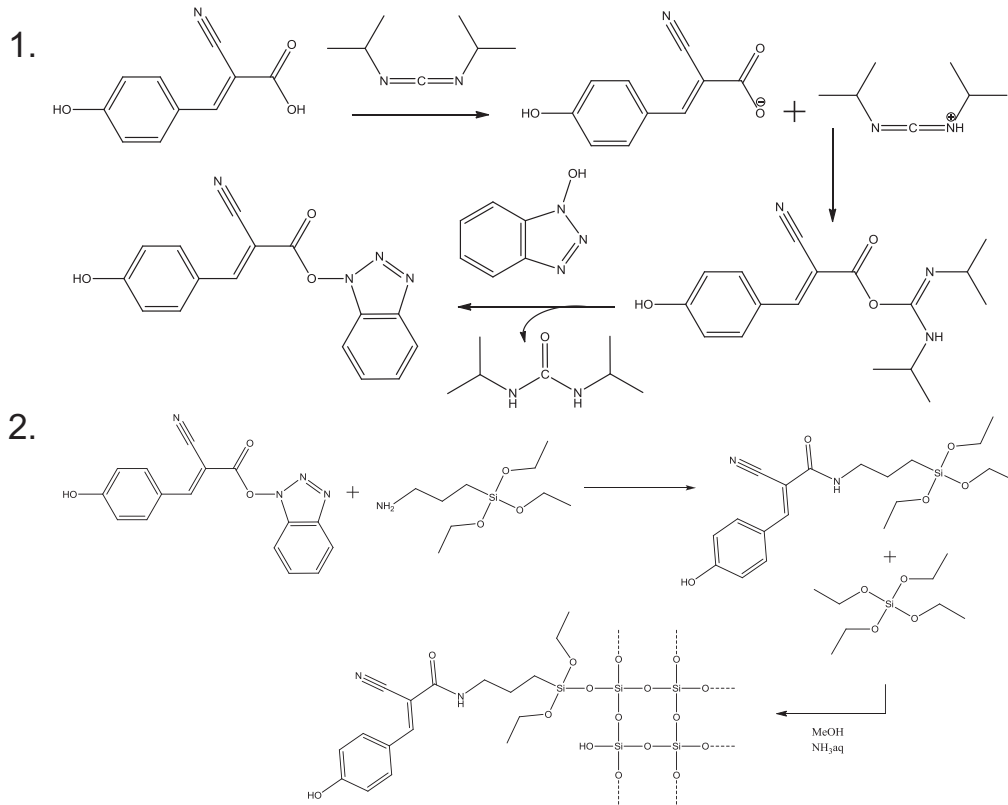
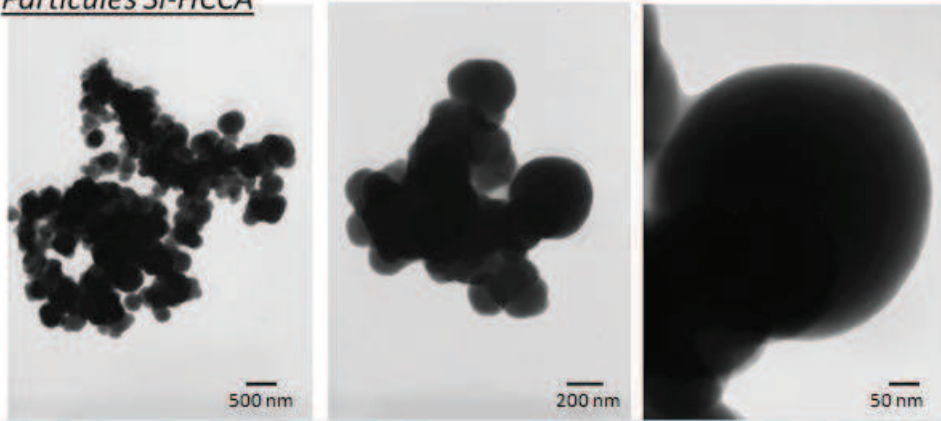
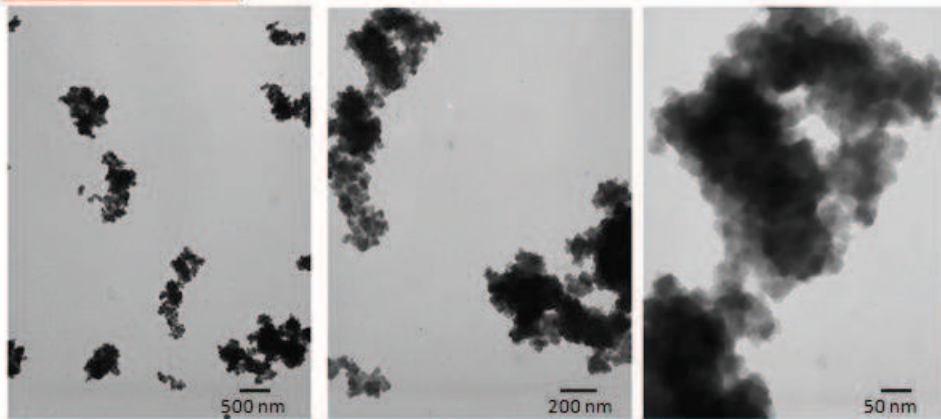


Schéma de la synthèse de la fonctionnalisation des nanoparticules de silice selon l'approche n°3. Le réseau final n'est qu'une représentation schématique.

Particules Si-HCCA

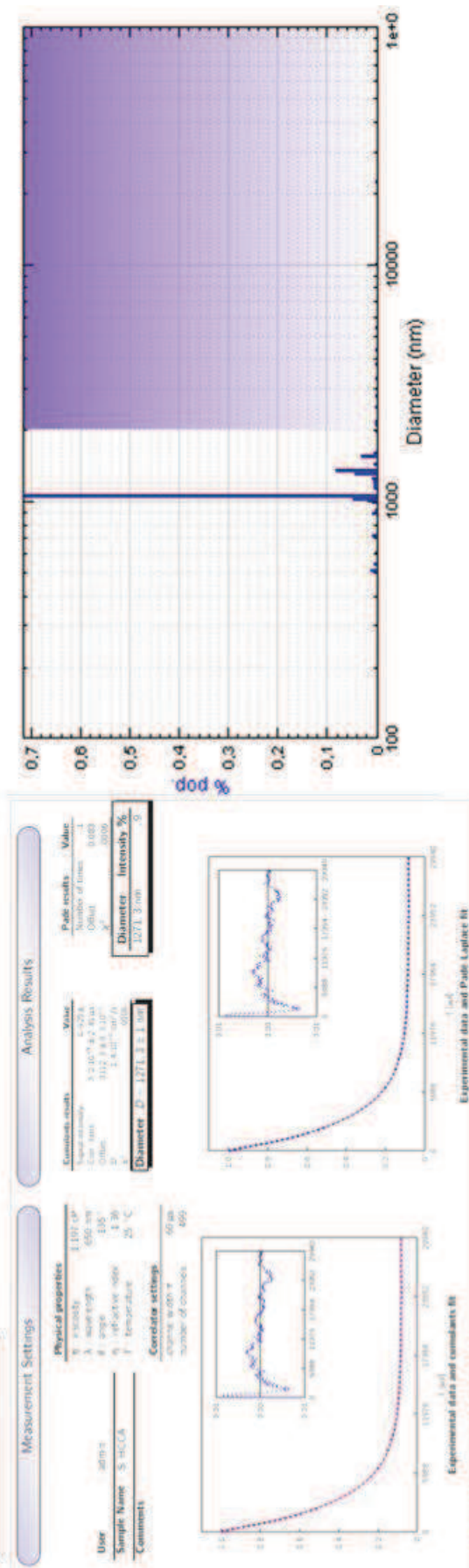


Particules Si-DHB

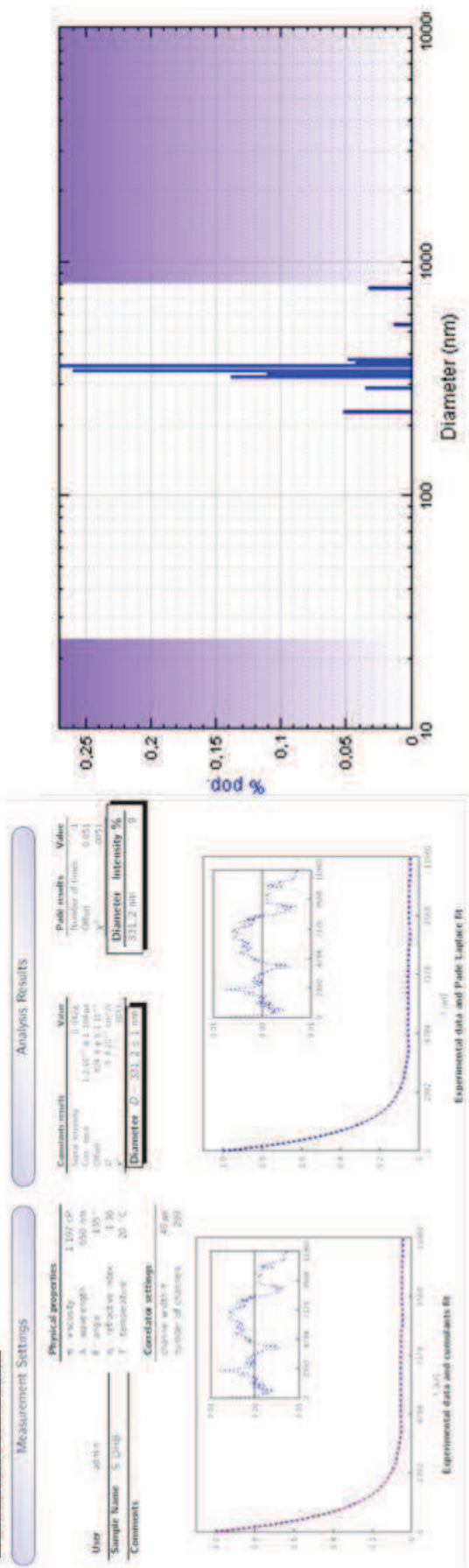


Images TEM obtenues pour des suspensions de particules modifiées avec l'HCCA et des particules modifiées avec le DHB.

Particules Si-HCCA



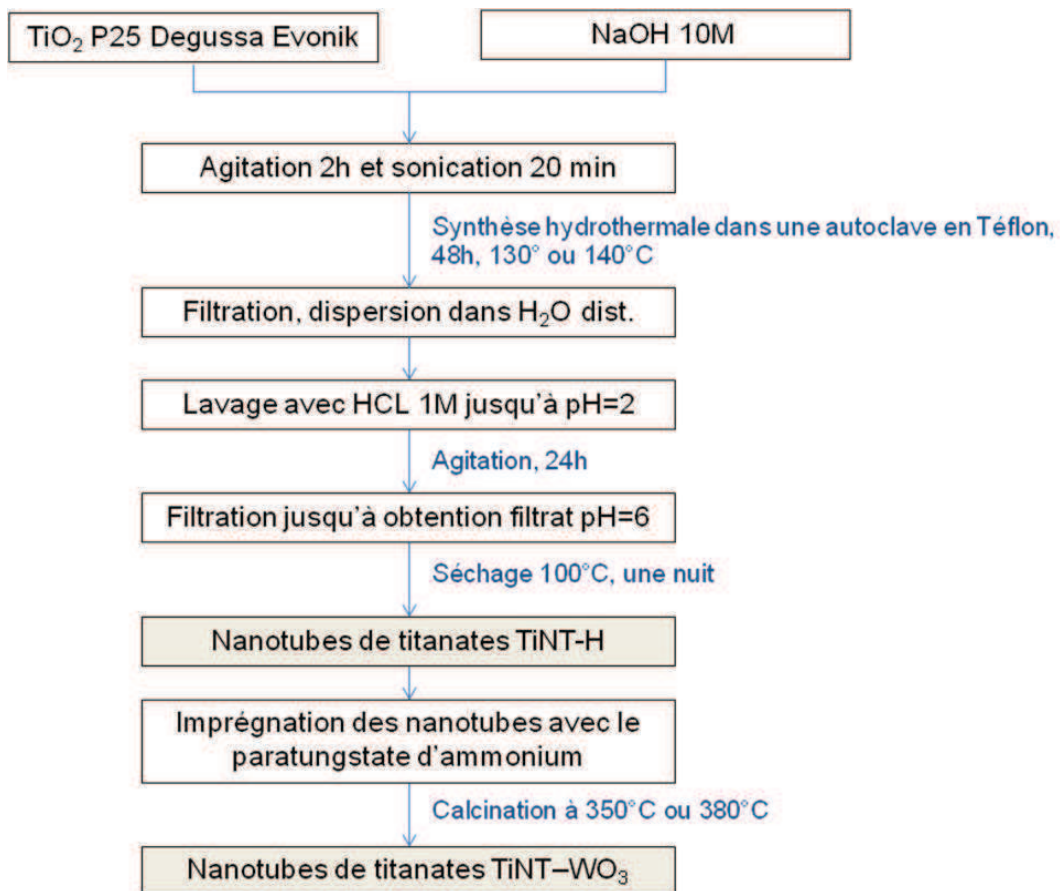
Particules Si-DHB



Résultats DLS obtenus pour des suspensions de particules modifiées avec l'HCCA et des particules modifiées avec le DHB.

Nanotubes de titane

Les nanotubes d'oxydes de titane ont été préparés par le Dr. A. Roemer-Hazane par traitement hydrothermal. 3g d'une poudre de TiO₂ P25 commerciale (P25 Degussa Evonik) sont ajoutés à 180 ml de soude concentrée (NaOH 10M) dans une autoclave, et placé à 130°C pendant 48 heures. La suspension obtenue est ensuite dispersée dans un grand volume d'eau distillée (500ml) et agitée. Elle est filtrée 2 fois puis le résidu est dispersé dans une eau acidifiée par adjonction d'acide chlorhydrique concentré jusqu'à l'obtention d'un pH 2. La suspension ainsi réalisée est agitée pendant 24 heures puis filtrée à l'eau distillée jusqu'à ce que le filtrat ait un pH neutre. Le résidu solide est récupéré sur verre de montre puis séché à 110° pendant une nuit. L'imprégnation à lieu directement sur les tubes séchés TiNT-H suivie de l'étape unique et finale de calcination pendant 2 heures soit à 350°, soit à 380°C. Le matériau obtenu est noté TiNT-WO₃. Les nanotubes de titanates ont été caractérisés en diffraction des rayons X (DRX), en méthode Brunauer Emmett Teller (B.E.T.), en spectrophotométrie UV-Visible et en microscopie électronique à transmission (MET). La procédure générale est rappelée ci-dessous.



Principe de la synthèse des nanotubes de titanate par voie hydrothermale.

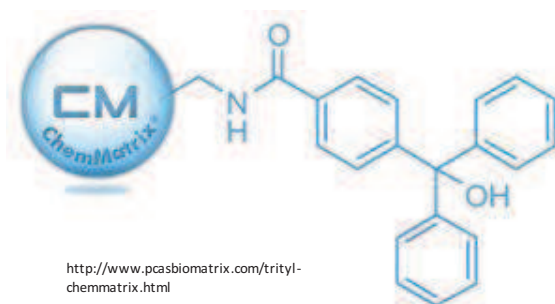
ANNEXE 3 – SYNTHÈSE PEPTIDIQUE SUR SUPPORT SEMI-AUTOMATISÉE

1. Chloration de la résine

Selon la nature du peptide à synthétiser (fonction acide carboxylique ou fonction amide en position C-terminale), la résine utilisée diffère. Nous souhaitons synthétiser des peptides acides. Dans notre cas, la résine doit être d'abord chlorée puis l'accrochage du premier acide aminé se fait manuellement. On obtient ensuite un ensemble Résine-1^{er}AA-Fmoc à partir duquel on lance la synthèse automatisée. Cette résine doit être utilisée immédiatement et ne peut être conservée pour des utilisations ultérieures.

La résine utilisée est une résine Trityl-Alcohol-ChemMatrix (figure ci-dessous) :

- Taille des particules : 150 – 500 μm
- Charge : 0,49 mmol/g



Structure de la résine Trityl-Alcohol-ChemMatrix.

La résine est le réactif en défaut puisque c'est elle qui conditionne toute la synthèse. On se base sur l'utilisation de 0,1 mmol de résine. Cependant, la réaction d'accrochage du premier acide aminé n'est pas quantitative, un excédent de résine est employé. La résine est mise en solution dans le dichlorométhane anhydre (DCM, 6 ml) en présence de SOCl_2 (100 μL), et la solution est laissée sous agitation pendant 2 heures.

2. Accrochage du premier acide aminé

La résine est chargée à 0,49 mmol/g. L'accrochage du premier acide aminé se fait dans les proportions suivantes :

Réactifs	Equivalent	Quantité de matière (mmol)	Volume - Masse
Résine	1	0.167	333 g
DIEA	4	0.668	116 μ L (d=0.742)
Fmoc-AA-OH	2	0.334	Selon AA

Tableau des réactifs pour l'accrochage du premier acide aminé en synthèse peptidique.

L'acide aminé (Fmoc-AA-OH) est solubilisé dans un minimum de DMF, puis la DIEA est ajoutée jusqu'à obtenir une solution basique (pH 8-9). Il est ensuite mis en présence de la résine chlorée (dégagement gazeux d'HCl). La solution est laissée sous agitation toute la nuit. La résine est rincée sur fritté au DMF et au DCM. La résine est récupérée dans du DMF et le Fmoc-AA-Résine en solution est introduit dans un tube Falcon pour être disposé sur le robot de synthèse.

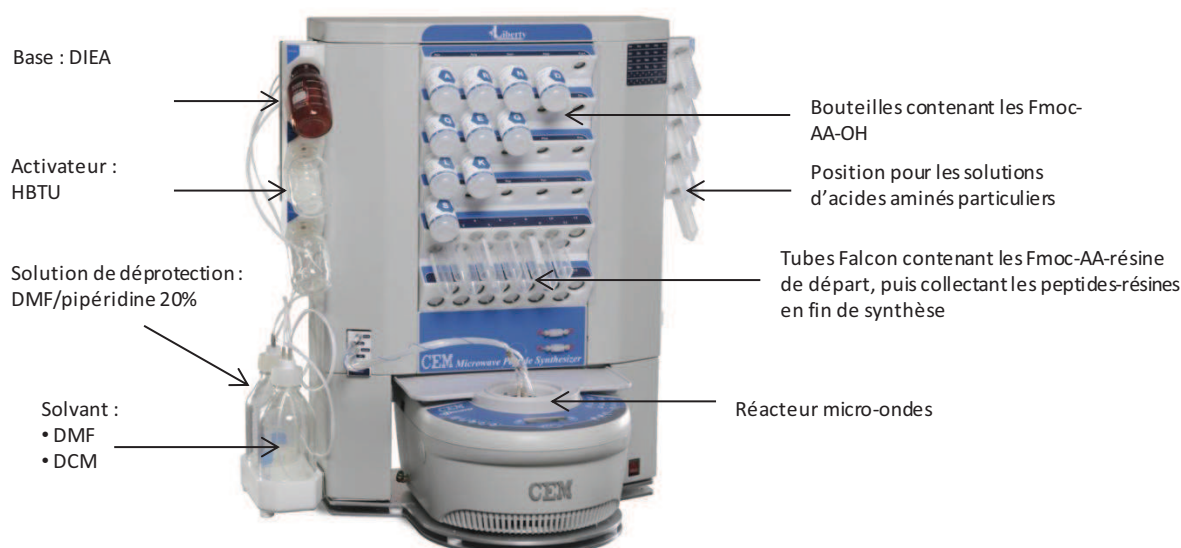
3. Couplage automatique aux micro-ondes (CEM Liberty)

La synthèse des peptides a été effectuée aux micro-ondes, sur un système automatisé Liberty™ (CEM Corporation, Matthews, NC) allié à un module additionnel Discover™ (CEM Corporation, Matthews, NC) permettant de combiner l'énergie micro-ondes à la synthèse peptidique sur phase solide. Le système est entièrement piloté par le logiciel PepDriver™.

Pour effectuer la synthèse, les tubes Falcon contenant les résines sont positionnés dans les positions 1-8 prévues à cet effet. Les bouteilles contenant les Fmoc-AA-OH sont disposées sur l'appareil dont les volumes de réactif ont été calculés par le logiciel. Les solutions d'activateur (HBTU), de base (DIEA) et de solvant (DCM et DMF) sont également préparées. Les séquences sont programmées dans le logiciel ainsi que les paramètres de synthèse :

- Couplage :
 - 5 min, 70°C pour tous les acides aminés classiques
 - 5 min, 50°C pour les acides aminés H et C pour éviter la réaction de racémisation
 - 10 min, 70°C pour Q, N, P, V et T : en effet, ces acides aminés posent généralement problème lors des réactions de couplages (Q, N : fonction amide protégée par un groupement trityl qui induit un encombrement stérique, P est une amine secondaire et V et T ont un C α encombré). La durée du temps de couplage est donc augmentée pour s'assurer d'un bon rendement.
- Déprotection : 3 min, 70°C.

Les peptides à synthétiser portent une fonction acide en position C- terminale. Le premier acide aminé doit être couplé manuellement à la résine et le synthétiseur ne le prend pas en compte. Il commence la synthèse automatique à partir du second acide aminé.



<http://www.laborwelt.de/service/alle-produkte/peptid-synthesizer-mit-mikrowellenaktivierung.html>

Image du robot de synthèse CEM Liberty

Les peptides sont récupérés encore ancrés à la résine, déprotégés en position N-terminale mais avec les chaînes latérales protégées. Le but est donc de cliver cette résine et de déprotéger l'ensemble des chaînes latérales des différents acides aminés en une seule étape.

4. Déprotection terminale et clivage

- 1^{ère} étape : Les résines-peptides issus du Liberty sont filtrées et lavées avec du DCM.
- 2^{ème} étape : le clivage de la résine et les déprotections des chaînes latérales sont effectués avec un mélange TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5) (10 ml de mélange pour 100 mg de résine, durée : 3 heures). Les peptides sont récupérés en solution après filtration de la résine.
- 3^{ème} étape : Après concentration du TFA, les peptides sont précipités dans l'éther, puis les solutions sont centrifugées.
- 4^{ème} étape : Les précipités sont récupérés, solubilisés dans un mélange eau/ACN, et analysés en HPLC-MS-UV afin d'avoir une première idée de la réussite de la synthèse. Les échantillons sont ensuite lyophilisés.

REFERENCES

- [1].Shenar, N., *Spectrométrie de masse par desorption/ionisation laser de peptides modèles : applications en protéomique*, in *Ecole Doctorale 459 - Sciences Chimiques*. **2008**, Université de Montpellier 2: Montpellier. p. 315.
- [2].Mouls, L., *Spectrométrie de masse en tandem de peptides et de peptides modifiés. Contribution à l'identification structurale par une approche De Novo*, in *Ecole doctorale Chimie des Biomolécules et chimie du solide*. **2005**, Université de Montpellier 2: Montpellier. p. 346.
- [3].Busch, K.L., *Special feature: Tutorial. Desorption ionization mass spectrometry*. *J. Mass Spectrom.* **1995** *30*: 233-240.
- [4].Herzog, R.F.K. and Viehboeck, F., *Ion source for mass spectrography*. *Phys. Rev.* **1949** *76*: 855-856.
- [5].Castaing, R. and Slodzian, G.J., *Optique corpusculaire-premiers essais de microanalyse par emission ionique secondaire*. *Microscopie* **1962** *1*: 395-399.
- [6].Liebl, H.J., *Ion microprobe mass analyzer*. *J. Appl. Phys.* **1967** *38*: 5277-5280.
- [7].Vastola, F. and Pirone, A., *Ionization of organic solids by laser irradiation*. *Adv. Mass Spectrom.* **1968** *4*: 107-111.
- [8].Vastola, F.J., Mumma, R.O., and Pirone, A.J., *Analysis of organic salts by laser ionization*. *Org. Mass Spectrom.* **1970** *3*: 101-104.
- [9].Posthumus, M.A., Kistemaker, P.G., Meuzelaar, H.L.C., and Ten Noever de Brauw, M.C., *Laser desorption-mass spectrometry of polar nonvolatile bio-organic molecules*. *Anal. Chem.* **1978** *50*: 985-991.
- [10].Kupka, K.-D., Hillenkamp, F., and Schiller, C., *Advances in mass spectrometry*, Heyden & Sons: London. **1980** Vol. 8A.
- [11].Verbueken, A.H., Bruynseels, F.J., and Van Grieken, R.E., *Laser microprobe mass analysis: A review of applications in the life sciences*. *Biol. Mass Spectrom.* **1985** *12*: 438-463.
- [12].Barber, M., Bordoli, R.S., Sedgwick, R.D., and Tyler, A.N., *Fast atom bombardment of solids as an ion source in mass spectrometry*. *Nature* **1981** *293*: 270-275.
- [13].Karas, M., Bachmann, D., and Hillenkamp, F., *Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules*. *Anal. Chem.* **1985** *57*: 2935-2939.
- [14].Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., and Hillenkamp, F., *Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds*. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1987** *78*: 53-68.
- [15].Karas, M. and Hillenkamp, F., *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. *Anal. Chem.* **1988** *60*: 2299-2301.
- [16].Tanaka, K., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., and Yoshida, T., *Detection of high mass molecules by laser desorption time-of-flight mass spectrometry. Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry*. Takarazuka Hotel, Osaka, Japan. **1987** p. 185-188.
- [17].Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., and Matsuo, T., *Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988** *2*: 151-153.
- [18].Tanaka, K., *The origin of macromolecule ionization by laser irradiation (Nobel Lecture)*. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003** *42*: 3860-3870.
- [19].Spengler, B., Hubert, M., and Kaufmann, R., *MALDI ion imaging and biological ion imaging with a new scanning UV-laser microprobe. Proceedings of the 42nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*. Chicago Illinois. **1994** p. 1041.

- [20].Caprioli, R.M., Farmer, T.B., and Gile, J., *Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS*. Anal. Chem. **1997** 69: 4751-4760.
- [21].Spengler, B., *Microprobing and imaging MALDI for biomarker detection*, in *MALDI MS*. **2007** Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 109-130.
- [22].Enjalbal, C., Maux, D., Combarieu, R., Martinez, J., and Aubagnac, J.-L., *Imaging Combinatorial Libraries by Mass Spectrometry: from Peptide to Organic-Supported Syntheses*. J. Comb. Chem. **2003** 5: 102-109.
- [23].Brunelle, A. and Laprevote, O., *Recent Advances in Biological Tissue Imaging with Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry: Polyatomic Ion Sources, Sample Preparation, and Applications*. Curr. Pharm. Des. **2007** 13: 3335-3343.
- [24].Cooks, R.G., Ouyang, Z., Takats, Z., and Wiseman, J.M., *Ambient Mass Spectrometry*. Science **2006** 311: 1566-1570.
- [25].Takáts, Z., Wiseman, J.M., Gologan, B., and Cooks, R.G., *Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization*. Science **2004** 306: 471-473.
- [26].Cody, R.B., Laramée, J.A., and Durst, H.D., *Versatile New Ion Source for the Analysis of Materials in Open Air under Ambient Conditions*. Anal. Chem. **2005** 77: 2297-2302.
- [27].Hillenkamp, F., Karas, M., P.B., O.C., Hjernø, K., Jensen, O.N., Spengler, B., van den Boom, D., Berkenkamp, S., Šagi, S., Peter-Katalinić, J., Schiller, J., Liang, L., Cohen, L., Go, E.P., and Siuzdak, G., *MALDI MS: a practical guide to instrumentation, methods and applications*. **2007**.
- [28].Zenobi, R. and Knochenmuss, R., *Ion formation in MALDI mass spectrometry*. Mass Spectrom. Rev. **1998** 17: 337-366.
- [29].Karas, M. and Krüger, R., *Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism*. Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.) **2003** 103: 427-440.
- [30].Dreisewerd, K., *The desorption process in MALDI*. Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.) **2003** 103: 395-426.
- [31].Knochenmuss, R. and Zenobi, R., *MALDI Ionization: the role of in-plume processes*. Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.) **2002** 103: 441-452.
- [32].Hillenkamp, F. and Karas, M., *The MALDI process and method*, in *MALDI MS*. **2007** Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 1-28.
- [33].Knochenmuss, R., *Ion formation mechanisms in UV-MALDI*. Analyst **2006** 131: 966-986.
- [34].Knochenmuss, R., *MALDI Ionization Mechanisms: an Overview*, in *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications, 2nd Edition*, Richard B. Cole, Editor. **2010**.
- [35].Ehring, H., Karas, M., and Hillenkamp, F., *Role of photoionization and photochemistry in ionization processes of organic molecules and relevance for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry*. Org. Mass Spectrom. **1992** 27: 472-480.
- [36].Karas, M., Glückmann, M., and Schäfer, J., *Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors*. J. Mass Spectrom. **2000** 35: 1-12.
- [37].Cohen, L., Go, E.P., and Siuzdak, G., *Small-molecule desorption/ionization mass analysis*, in *MALDI MS*. **2007** Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 299-337.
- [38].Feng, C.-H. and Lu, C.-Y., *A new matrix for analyzing low molecular mass compounds and its application for determination of carcinogenic areca alkaloids by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*. Anal. Chim. Acta **2009** 649: 230-235.
- [39].Woldegiorgis, A., Kieseritzky, F.v., Dahlstedt, E., Hellberg, J., Brinck, T., and Roeraade, J., *Polymer-assisted laser desorption/ionization analysis of small molecular weight compounds*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **2004** 18: 841-852.
- [40].Tholey, A. and Heinzle, E., *Ionic (liquid) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry - applications and perspectives*. Anal. Bioanal. Chem. **2006** 386: 24-37.
- [41].Wu, Z., Fernandez-Lima, F.A., Perez, L.M., and Russell, D.H., *A new copper containing MALDI matrix that yields high abundances of [Peptide + Cu]⁺ ions*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **2009** 20: 1263-1271.

- [42].Zhang, S., Liu, J.a., Chen, Y., Xiong, S., Wang, G., Chen, J., and Yang, G., *A novel strategy for MALDI-TOF MS analysis of small molecules*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **2010** 21: 154-160.
- [43].Grant, D.C. and Helleur, R.J., *Surfactant-mediated matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of small molecules*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **2007** 21: 837-845.
- [44].Trimpin, S. and Deinzer, M.L., *Solvent-free MALDI-MS for the analysis of biological samples via a mini-ball mill approach*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **2005** 16: 542-547.
- [45].Peterson, D.S., *Matrix-free methods for laser desorption/ionization mass spectrometry*. Mass Spectrom. Rev. **2007** 26: 19-34.
- [46].Law, K. and Larkin, J., *Recent advances in SALDI-MS techniques and their chemical and bioanalytical applications*. Anal. Bioanal. Chem. **2011** 399: 2597-2622.
- [47].Dattelbaum, A.M. and Iyer, S., *Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Expert Rev. Proteomics **2006** 3: 153-161.
- [48].Afonso, C., Budimir, N., Fournier, F., and Tabet, J.C., *Activated surfaces for laser desorption mass spectrometry: Application for peptide and protein analysis*. Curr. Pharm. Des. **2005** 11: 2559-2576.
- [49].Kuzema, P., *Small-molecule analysis by surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. J. Anal. Chem. **2011** 66: 1227-1242.
- [50].Rainer, M., Qureshi, M., and Bonn, G., *Matrix-free and material-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry for the analysis of low molecular weight compounds*. Anal. Bioanal. Chem. **2011** 400: 2281-2288.
- [51].Feuerstein, I., Najam-ul-Haq, M., Rainer, M., Trojer, L., Bakry, R., Aprilita, N.H., Stecher, G., Huck, C.W., Bonn, G.K., Klocker, H., Bartsch, G., and Guttman, A., *Material-enhanced laser desorption/ionization (MELDI)--a new protein profiling tool utilizing specific carrier materials for time of flight mass spectrometric analysis*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **2006** 17: 1203-1208.
- [52].Sunner, J., Dratz, E., and Chen, Y.-C., *Graphite surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides and proteins from liquid solutions*. Anal. Chem. **1995** 67: 4335-4342.
- [53].IUPAC. *Standard definitions of terms relating to mass spectrometry*. **2006**; Available from http://www.iupac.org/fileadmin/user_upload/publications/recommendations/murray_prs.pdf.
- [54].Dale, M.J., Knochenmuss, R., and Zenobi, R., *Graphite/liquid mixed matrices for laser desorption/ionization mass spectrometry*. Anal. Chem. **1996** 68: 3321-3329.
- [55].Dale, M., Knochenmuss, R., and Zenobi, R., *Two-phase matrix-assisted laser desorption/ionization: matrix selection and sample pretreatment for complex anionic analytes*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **1997** 11: 136-142.
- [56].Chen, Y.-C., Shiea, J., and Sunner, J., *Thin-layer chromatography-mass spectrometry using activated carbon, surface-assisted laser desorption/ionization*. J. Chromatogr. A **1998** 826: 77-86.
- [57].Chen, Y.-C., Shiea, J., and Sunner, J., *Rapid determination of trace nitrophenolic organics in water by combining solid-phase extraction with surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **2000** 14: 86-90.
- [58].Chen, Y.-C. and Tsai, M.-F., *Using surfactants to enhance the analyte signals in activated carbon, surface-assisted laser desorption/ionization (SALDI) mass spectrometry*. J. Mass Spectrom. **2000** 35: 1278-1284.
- [59].Chen, Y.-C. and Sun, M.-C., *Determination of trace quaternary ammonium surfactants in water by combining solid-phase extraction with surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **2001** 15: 2521-2525.
- [60].Chen, Y.-C. and Tsai, M.-F., *Sensitivity enhancement for nitrophenols using cationic surfactant-modified activated carbon for solid-phase extraction surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **2000** 14: 2300-2304.
- [61].Schurenberg, M., Dreisewerd, K., and Hillenkamp, F., *Laser desorption/ionization mass spectrometry of peptides and proteins with particle suspension matrixes*. Anal. Chem. **1999** 71: 221-229.
- [62].Kinumi, T., Saisu, T., Takayama, M., and Niwa, H., *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using an inorganic particle matrix for small molecule analysis*. J. Mass Spectrom. **2000** 35: 417-422.

- [63].Han, M. and Sunner, J., *An activated carbon substrate surface for laser desorption mass spectrometry*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **2000** 11: 644-649.
- [64].Chen, Y.-C. and Wu, J.-Y., *Analysis of small organics on planar silica surfaces using surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **2001** 15: 1899-1903.
- [65].Wu, J.-Y. and Chen, Y.-C., *A novel approach of combining thin-layer chromatography with surface-assisted laser desorption/ionization (SALDI) time-of-flight mass spectrometry*. J. Mass Spectrom. **2002** 37: 85-90.
- [66].Duan, J., Linman, M.J., Chen, C.-Y., and Cheng, Q.J., *CHCA-modified Au nanoparticles for laser desorption ionization mass spectrometric analysis of peptides*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **2009** 20: 1530-1539.
- [67].Hutchens, T.W. and Yip, T.-T., *New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **1993** 7: 576-580.
- [68].Merchant, M. and Weinberger, S.R., *Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry*. Electrophoresis **2000** 21: 1164-1177.
- [69].Tang, N., Tornatore, P., and Weinberger, S.R., *Current developments in SELDI affinity technology*. Mass Spectrom. Rev. **2004** 23: 34-44.
- [70].Seibert, V., Wiesner, A., Buschmann, T., and Meuer, J.J., *Surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI TOF-MS) and ProteinChip® technology in proteomics research*. Pathol. Res. Pract. **2004** 200: 83-94.
- [71].Mouradian, S., Nelson, C.M., and Smith, L.M., *A self-assembled matrix monolayer for UV-MALDI mass spectrometry*. J. Am. Chem. Soc. **1996** 118: 8639-8645.
- [72].Sanguinet, L., Alévêque, O., Blanchard, P., Dias, M., Levillain, E., and Rondeau, D., *Desorption/ionization on self-assembled monolayer surfaces (DIAMS)*. J. Mass Spectrom. **2006** 41: 830-833.
- [73].Bounichou, M., Sanguinet, L., Elouarzaki, K., Alévêque, O., Dias, M., Levillain, E., and Rondeau, D., *Evaluation of a new matrix-free laser desorption/ionization method through statistic studies: comparison of the DIAMS (desorption/ionization on self-assembled monolayer surface) method with the MALDI and TGFA-LDI techniques*. J. Mass Spectrom. **2008** 43: 1618-1626.
- [74].Zhang, Q., Zou, H., Guo, Z., Zhang, Q., Chen, X., and Ni, J., *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using porous silicon and silica gel as matrix*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **2001** 15: 217-223.
- [75].Lin, Y.-S. and Chen, Y.-C., *Laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry on sol-gel-derived 2,5-dihydroxybenzoic acid film*. Anal. Chem. **2002** 74: 5793-5798.
- [76].Ho, K.-C., Lin, Y.-S., and Chen, Y.-C., *Laser desorption/ionization mass spectrometry on sol-gel-derived dihydroxybenzoic acid isomeric films*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **2003** 17: 2683-2687.
- [77].Chen, W.-Y. and Chen, Y.-C., *Reducing the alkali cation adductions of oligonucleotides using sol-gel-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Anal. Chem. **2003** 75: 4223-4228.
- [78].Wei, J., Buriak, J.M., and Siuzdak, G., *Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon*. Nature **1999** 399: 243-246.
- [79].IUPAC. *Recommendations for the characterization of porous solids*. **1994**; Available from <http://pac.iupac.org/publications/pac/pdf/1994/pdf/6608x1739.pdf>.
- [80].Lewis, W.G., Shen, Z., Finn, M.G., and Siuzdak, G., *Desorption/ionization on silicon (DIOS) mass spectrometry: background and applications*. Int. J. Mass Spectrom. **2003** 226: 107-116.
- [81].Shen, Z., Go, E.P., Gamez, A., Apon, J.V., Fokin, V., Greig, M., Ventura, M., Crowell, J.E., Blixt, O., Paulson, J.C., Stevens, R.C., Finn, M.G., and Siuzdak, G., *A mass spectrometry plate reader: monitoring enzyme activity and inhibition with a desorption/ionization on silicon (DIOS) platform*. ChemBioChem **2004** 5: 921-927.
- [82].Shen, Z., Thomas, J.J., Averbuj, C., Broo, K.M., Engelhard, M., Crowell, J.E., Finn, M.G., and Siuzdak, G., *Porous silicon as a versatile platform for laser desorption/ionization mass spectrometry*. Anal. Chem. **2001** 73: 612-619.
- [83].Thomas, J.J., Shen, Z.X., Crowell, J.E., Finn, M.G., and Siuzdak, G., *Desorption/ionization on silicon (DIOS): A diverse mass spectrometry platform for protein characterization*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **2001** 98: 4932-4937.

- [84].Thomas, J.J., Shen, Z., Blackledge, R., and Siuzdak, G., *Desorption-ionization on silicon mass spectrometry: an application in forensics*. Anal. Chim. Acta **2001** 442: 183-190.
- [85].Go, E.P., Prenni, J.E., Wei, J., Jones, A., Hall, S.C., Witkowska, H.E., Shen, Z., and Siuzdak, G., *Desorption/ionization on silicon time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry*. Anal. Chem. **2003** 75: 2504-2506.
- [86].Waters. *MALDI DIOS-target plates. Care and use manual* **2007**; Available from <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715001597.pdf>.
- [87].Górecka-Drzazga, A., Bargiel, S., Walczak, R., Dziuban, J.A., Kraj, A., Dylag, T., and Silberring, J., *Desorption/ionization mass spectrometry on porous silicon dioxide*. Sens Act B **2004** 103: 206-212.
- [88].Kraj, A., Jarzebinska, J., Górecka-Drzazga, A., Dziuban, J., and Silberring, J., *Identification of catecholamines in the immune system by desorption/ionization on silicon*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **2006** 20: 1969-1972.
- [89].Trauger, S.A., Go, E.P., Shen, Z., Apon, J.V., Compton, B.J., Bouvier, E.S.P., Finn, M.G., and Siuzdak, G., *High sensitivity and analyte capture with desorption/ionization mass spectrometry on silylated porous silicon*. Anal. Chem. **2004** 76: 4484-4489.
- [90].Shmigol, I.V., Alekseev, S.A., Lavrynenko, O.Y., Vasylieva, N.S., Zaitsev, V.N., Barbier, D., and Pokrovsky, V.A., *Chemically modified porous silicon for laser desorption/ionization mass spectrometry of ionic dyes*. J. Mass Spectrom. **2009** 44: 1234-1240.
- [91].Gnaser, H., Savina, M.R., Calaway, W.F., Tripa, C.E., Veryovkin, I.V., and Pellin, M.J., *Photocatalytic degradation of methylene blue on nanocrystalline TiO₂: Surface mass spectrometry of reaction intermediates*. Int. J. Mass Spectrom. **2005** 245: 61-67.
- [92].Okuno, S., Nakano, M., Matsubayashi, G.-e., Arakawa, R., and Wada, Y., *Reduction of organic dyes in matrix-assisted laser desorption/ionization and desorption/ionization on porous silicon*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **2004** 18: 2811-2817.
- [93].Breux, G.A., Green-Church, K.B., France, A., and Limbach, P.A., *Surfactant-aided, matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of hydrophobic and hydrophilic peptides*. Anal. Chem. **2000** 72: 1169-1174.
- [94].Nordstrom, A., Apon, J.V., Uritboonthai, W., Go, E.P., and Siuzdak, G., *Surfactant-enhanced desorption/ionization on silicon mass spectrometry*. Anal. Chem. **2006** 78: 272-278.
- [95].Kawasaki, H., Shimomae, Y., Watanabe, T., and Arakawa, R., *Desorption/ionization on porous silicon mass spectrometry (DIOS-MS) of perfluorooctane sulfonate (PFOS)*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **2009** 347: 220-224.
- [96].Lowe, R.D., Szili, E.J., Kirkbride, P., Thissen, H., Siuzdak, G., and Voelcker, N.H., *Combined immunocapture and laser desorption/ionization mass spectrometry on porous silicon*. Anal. Chem. **2010** 82: 4201-4208.
- [97].Kraj, A., Dylag, T., Gorecka-Drzazga, A., Bargiel, S., Dziuban, J., and Silberring, J., *Desorption/ionization on silicon for small molecules: a promising alternative to MALDI TOF*. Acta Biochim. Pol. **2003** 50: 783-787.
- [98].Vaidyanathan, S., Jones, D., Broadhurst, D., Ellis, J., Jenkins, T., Dunn, W., Hayes, A., Burton, N., Oliver, S., Kell, D., and Goodacre, R., *A laser desorption ionisation mass spectrometry approach for high throughput metabolomics*. Metabolomics **2005** 1: 243-250.
- [99].Budimir, N., Blais, J.C., Fournier, F., and Tabet, J.C., *Desorption/ionization on porous silicon mass spectrometry (DIOS) of model cationized fatty acids*. J. Mass Spectrom. **2007** 42: 42-48.
- [100].Budimir, N., Blais, J.C., Fournier, F., and Tabet, J.C., *The use of desorption/ionization on porous silicon mass spectrometry for the detection of negative ions for fatty acids*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **2006** 20: 680-684.
- [101].Liu, Q., Guo, Z., and He, L., *Mass spectrometry imaging of small molecules using desorption/ionization on silicon*. Anal. Chem. **2007** 79: 3535-3541.
- [102].Luo, G., Chen, Y., Siuzdak, G., and Vertes, A., *Surface modification and laser pulse length effects on internal energy transfer in DIOS*. J. Phys. Chem. B **2005** 109: 24450-24456.
- [103].Northen, T.R., Woo, H.-K., Northen, M.T., Nordström, A., Uritboonthai, W., Turner, K.L., and Siuzdak, G., *High surface area of porous silicon drives desorption of intact molecules*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **2007** 18: 1945-1949.

- [104].Cuiffi, J.D., Hayes, D.J., Fonash, S.J., Brown, K.N., and Jones, A.D., *Desorption-ionization mass spectrometry using deposited nanostructured silicon films*. Anal. Chem. **2001** 73: 1292-1295.
- [105].Finkel, N.H., Prevo, B.G., Velev, O.D., and He, L., *Ordered silicon nanocavity arrays in surface-assisted desorption/ionization mass spectrometry*. Anal. Chem. **2005** 77: 1088-1095.
- [106].Xiao, Y., Retterer, S.T., Thomas, D.K., Tao, J.-Y., and He, L., *Impacts of surface morphology on ion desorption and ionization in desorption ionization on porous silicon (DIOS) mass spectrometry*. The Journal of Physical Chemistry C **2009** 113: 3076-3083.
- [107].Go, E.P., Apon, J.V., Luo, G., Saghatelian, A., Daniels, R.H., Sahi, V., Dubrow, R., Cravatt, B.F., Vertes, A., and Siuzdak, G., *Desorption/ionization on silicon nanowires*. Anal. Chem. **2005** 77: 1641-1646.
- [108].Daniels, R.H., Dikler, S., Li, E., and Stacey, C., *Break free of the matrix: sensitive and rapid analysis of small molecules using nanostructured surfaces and LDI-TOF mass spectrometry*. Journal of the Association for Laboratory Automation **2008** 13: 314-321.
- [109].Daniels, H. and Dikler, S. *Analyzing small molecule drug compounds by NALDI™ mass spectrometry*. Bruker Daltonics Technical Note # 22 **2008**; Available from <http://www.bruker.pl/images/stories/Daltonics/noty/tn22.pdf>.
- [110].Bruker.Daltonics. *Analyzing small molecule drug compounds by NALDI™ mass spectrometry*. Technical Note # 22 **2008**; Available from <http://www.bruker.pl/images/stories/Daltonics/noty/tn22.pdf>.
- [111].Guénin, E., Lecouvey, M., and Hardouin, J., *Could a nano-assisted laser desorption/ionization target improve the study of small organic molecules by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry?* Rapid Commun. Mass Spectrom. **2009** 23: 1395-1400.
- [112].Wyatt, M.F., Ding, S., Stein, B.K., Brenton, A.G., and Daniels, R.H., *Analysis of various organic and organometallic compounds using nanostructure-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (NALDI-TOFMS)*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **2010** 21: 1256-1259.
- [113].Vidová, V., Novák, P., Strohalm, M., Pól, J., Havlíček, V.r., and Volný, M., *Laser desorption-ionization of lipid transfers: tissue mass spectrometry imaging without MALDI matrix*. Anal. Chem. **2010** 82: 4994-4997.
- [114].Tata, A., Fernandes, A.M.A.P., Santos, V.G., Alberici, R.M., Araldi, D., Parada, C.A., Braguini, W., Veronez, L., Silva Bisson, G., Reis, F.H.Z., Alberici, L.C., and Eberlin, M.N., *Nanoassisted laser desorption-ionization-MS imaging of tumors*. Anal. Chem. **2012**.
- [115].Pavlásková, K.i., Strnadová, M., Strohalm, M., Havlíček, V.r., Šulc, M., and Volný, M., *Time-dependent oxidation during nano-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: a useful tool for structure determination or a source of possible confusion?* Anal. Chem. **2011** 83: 5661-5665.
- [116].Kang, M.-J., Pyun, J.-C., Lee, J.-C., Choi, Y.-J., Park, J.-H., Park, J.-G., Lee, J.-G., and Choi, H.-J., *Nanowire-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry for quantitative analysis of small molecules*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **2005** 19: 3166-3170.
- [117].Chen, Y. and Vertes, A., *Adjustable fragmentation in laser desorption/ionization from laser-induced silicon microcolumn arrays*. Anal. Chem. **2006** 78: 5835-5844.
- [118].Alimpiev, S., Grechnikov, A., Sunner, J., Karavanskii, V., Simanovsky, Y., Zhabin, S., and Nikiforov, S., *On the role of defects and surface chemistry for surface-assisted laser desorption ionization from silicon*. J. Chem. Phys. **2008** 128: 014711-19.
- [119].Tsao, C.-W., Kumar, P., Liu, J., and DeVoe, D.L., *Dynamic electrowetting on nanofilament silicon for matrix-free laser desorption/ionization mass spectrometry*. Anal. Chem. **2008** 80: 2973-2981.
- [120].Cheng, Y.-C., Chen, K.-H., Wang, J.-S., Hsu, W.-L., Chien, C.-C., Chen, W.-Y., and Tsao, C.-W., *Rapid analysis of abused drugs using nanostructured silicon surface assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Analyst **2012** 137: 654-661.
- [121].Tsao, C.-W., Yang, Z.-J., and Chung, C.-W., *Preparation of nanostructured silicon surface for mass spectrometry analysis by an all-wet fabrication process using electroless metal deposition and metal assisted etching*. Int. J. Mass Spectrom. **2012** 321-322: 8-13.
- [122].Chen, W.Y., Huang, J.T., Cheng, Y.C., Chien, C.C., and Tsao, C.W., *Fabrication of nanostructured silicon by metal-assisted etching and its effects on matrix-free laser desorption/ionization mass spectrometry*. Anal. Chim. Acta **2011** 687: 97-104.

- [123].Law, K.P., *Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry on nanostructured silicon substrates prepared by iodine-assisted etching*. *Int. J. Mass Spectrom.* **2010** 290: 47-59.
- [124].Tsao, C.W., Lin, C.H., Cheng, Y.C., Chien, C.C., Chang, C.C., and Chen, W.Y., *Nanostructured silicon surface modifications for as a selective matrix-free laser desorption/ionization mass spectrometry*. *Analyst* **2012** 137: 2643-2650.
- [125].Dattelbaum, A.M., Hicks, R.K., Shelley, J., Koppisch, A.T., and Iyer, S., *Surface assisted laser desorption-ionization mass spectrometry on patterned nanoporous silica thin films*. *Microporous Mesoporous Mater.* **2008** 114: 193-200.
- [126].Jokinen, V., Aura, S., Luosujärvi, L., Sainiemi, L., Kotiaho, T., Franssila, S., and Baumann, M., *Surface assisted laser desorption/ionization on two-layered amorphous silicon coated hybrid nanostructures*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009** 20: 1723-1730.
- [127].Jemere, A.B., Bezuidenhout, L.W., Brett, M.J., and Harrison, D.J., *Matrix-free laser desorption/ionization mass spectrometry using silicon glancing angle deposition (GLAD) films*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010** 24: 2305-2311.
- [128].Çelikbıçak, Ö., Demirel, G., Pişkin, E., and Salih, B., *Small molecule analysis using laser desorption/ionization mass spectrometry on nano-coated silicon with self-assembled monolayers*. *Anal. Chim. Acta* **2012** 729: 54-61.
- [129].Rowell, F., Hudson, K., and Seviour, J., *Detection of drugs and their metabolites in dusted latent fingerprints by mass spectrometry*. *Analyst* **2009** 134.
- [130].Shariatgorji, M., Spacil, Z., Maddalo, G., Cardenas, L.B., and Ilag, L.L., *Matrix-free thin-layer chromatography/laser desorption ionization mass spectrometry for facile separation and identification of medicinal alkaloids*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009** 23: 3655-3660.
- [131].Lee, C.-S., Kim, E.-M., Lee, S.-H., Kim, M.-S., Kim, Y.-K., and Kim, B.-G., *Enhancement of analyte ionization in desorption/ionization on porous silicon (DIOS)-mass spectrometry (MS)*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2005** 10: 212-217.
- [132].Lee, C.-S., Kang, K.-K., Kim, J.-H., Kim, Y.-G., Shim, H.-W., Hwang, T.-S., Rhee, H.-K., and Kim, B.-G., *Analysis of small molecules by desorption/ionization on mesoporous silicate (DIOM)-mass spectrometry (MS)*. *Microporous Mesoporous Mater.* **2007** 98: 200-207.
- [133].Lee, C.-S., Lee, J.-H., Kang, K.-K., Song, H.-M., Kim, I.-H., Rhee, H.-K., and Kim, B.-G., *Laser desorption/ionization-mass spectrometry using mesoporous silicate as matrix for the analysis of various molecules*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2007** 12: 174-179.
- [134].Li, X., Wu, X., Kim, J.M., Kim, S.S., Jin, M., and Li, D., *MALDI-TOF-MS analysis of small molecules using modified mesoporous material SBA-15 as assisted matrix*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009** 20: 2167-2173.
- [135].Wu, H.-P., Su, C.-L., Chang, H.-C., and Tseng, W.-L., *Sample-first preparation: a method for surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of cyclic oligosaccharides*. *Anal. Chem.* **2007** 79: 6215-6221.
- [136].Wen, X., Dagan, S., and Wysocki, V.H., *Small-molecule analysis with silicon-nanoparticle-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. *Anal. Chem.* **2007** 79: 434-444.
- [137].Dagan, S., Hua, Y., Boday, D.J., Somogyi, A., Wysocki, R.J., and Wysocki, V.H., *Internal energy deposition with silicon nanoparticle-assisted laser desorption/ionization (SPALDI) mass spectrometry*. *Int. J. Mass Spectrom.* **2009** 283: 200-205.
- [138].Yoon, S.H., Gamage, C.M., Gillig, K.J., and Wysocki, V.H., *Kinetics of surface-induced dissociation of N(CH₃)₄⁺ and N(CD₃)₄⁺ using silicon nanoparticle assisted laser desorption/ionization and laser desorption/ionization*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009** 20: 957-964.
- [139].Shariatgorji, M., Amini, N., and Ilag, L., *Silicon nitride nanoparticles for surface-assisted laser desorption/ionization of small molecules*. *Journal of Nanoparticle Research* **2009** 11: 1509-1512.
- [140].Najam-ul-Haq, M., Rainer, M., Szabó, Z., Vallant, R., Huck, C.W., and Bonn, G.K., *Role of carbon nano-materials in the analysis of biological materials by laser desorption/ionization-mass spectrometry*. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2007** 70: 319-328.

- [141].Hopwood, F.G., Michalak, L., Alderdice, D.S., Fisher, K.J., and Willett, G.D., *C60-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in the analysis of phosphotungstic acid*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **1994** 8: 881-885.
- [142].Michalak, L., Fisher, K.J., Alderdice, D.S., Jardine, D.R., and Willett, G.D., *C60-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry*. Org. Mass Spectrom. **1994** 29: 512-515.
- [143].Huang, J.-P., Wang, L.Y., Chiang, L.Y., and Shiea, J., *Polyfunctional fullerene derivatives as UV-MALDI matrices to detect peptides and proteins*. Fullerene Sci. Tech. **1999** 7: 541-550.
- [144].Shiea, J., Huang, J.-P., Teng, C.-F., Jeng, J., Wang, L.Y., and Chiang, L.Y., *Use of a water-soluble fullerene derivative as precipitating reagent and matrix-assisted laser desorption/ionization matrix to selectively detect charged species in aqueous solutions*. Anal. Chem. **2003** 75: 3587-3595.
- [145].Montsko, G., Vaczy, A., Maasz, G., Mernyak, E., Frank, E., Bay, C., Kadar, Z., Ohmacht, R., Wolfling, J., and Mark, L., *Analysis of nonderivatized steroids by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using C70 fullerene as matrix*. Anal. Bioanal. Chem. **2009** 395: 869-874.
- [146].Xu, S., Li, Y., Zou, H., Qiu, J., Guo, Z., and Guo, B., *Carbon nanotubes as assisted matrix for laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Anal. Chem. **2003** 75: 6191-6195.
- [147].Ugarov, M.V., Egan, T., Khabashesku, D.V., Schultz, J.A., Peng, H., Khabashesku, V.N., Furutani, H., Prather, K.S., Wang, H.W.J., Jackson, S.N., and Woods, A.S., *MALDI matrices for biomolecular analysis based on functionalized carbon nanomaterials*. Anal. Chem. **2004** 76: 6734-6742.
- [148].Pan, C., Xu, S., Zou, H., Guo, Z., Zhang, Y., and Guo, B., *Carbon nanotubes as adsorbent of solid-phase extraction and matrix for laser desorption/ionization mass spectrometry*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **2005** 16: 263-270.
- [149].Pan, C., Xu, S., Hu, L., Su, X., Ou, J., Zou, H., Guo, Z., Zhang, Y., and Guo, B., *Using oxidized carbon nanotubes as matrix for analysis of small molecules by MALDI-TOF MS*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **2005** 16: 883-892.
- [150].Ren, S.-f. and Guo, Y.-l., *Oxidized carbon nanotubes as matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of biomolecules*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **2005** 19: 255-260.
- [151].Hu, L., Xu, S., Pan, C., Yuan, C., Zou, H., and Jiang, G., *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry with a matrix of carbon nanotubes for the analysis of low-mass compounds in environmental samples*. Environ. Sci. Technol. **2005** 39: 8442-8447.
- [152].Ren, S.-f., Zhang, L., Cheng, Z.-h., and Guo, Y.-l., *Immobilized carbon nanotubes as matrix for MALDI-TOF-MS analysis: Applications to neutral small carbohydrates*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **2005** 16: 333-339.
- [153].Chen, W.-Y., Wang, L.-S., Chiu, H.-T., Chen, Y.-C., and Lee, C.-Y., *Carbon nanotubes as affinity probes for peptides and proteins in MALDI MS analysis*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **2004** 15: 1629-1635.
- [154].Gholipour, Y., Nonami, H., and Erra-Balsells, R., *In situ analysis of plant tissue underivatized carbohydrates and on-probe enzymatic degraded starch by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry by using carbon nanotubes as matrix*. Anal. Biochem. **2008** 383: 159-167.
- [155].Hsu, W.-Y., Lin, W.-D., Hwu, W.-L., Lai, C.-C., and Tsai, F.-J., *Screening assay of very long chain fatty acids in human plasma with multiwalled carbon nanotube-based surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Anal. Chem. **2010** 82: 6814-6820.
- [156].Zumbuhl, S., Knochenmuss, R., Wulfert, S., Dubois, F., Dale, M.J., and Zenobi, R., *A graphite-assisted laser desorption/ionization study of light-induced aging in triterpene dammar and mastic varnishes*. Anal. Chem. **1998** 70: 707-715.
- [157].Kim, H.-J., Lee, J.-K., Park, S.-J., Ro, H.W., Yoo, D.Y., and Yoon, D.Y., *Observation of low molecular weight poly(methylsilsesquioxane)s by graphite plate laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Anal. Chem. **2000** 72: 5673-5678.
- [158].Park, K.-H. and Kim, H.-J., *Analysis of fatty acids by graphite plate laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **2001** 15: 1494-1499.
- [159].Black, C., Poile, C., Langley, J., and Herniman, J., *The use of pencil lead as a matrix and calibrant for matrix-assisted laser desorption/ionisation*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **2006** 20: 1053-1060.

- [160].Langley, G.J., Herniman, J.M., and Townell, M.S., *2B or not 2B, that is the question: further investigations into the use of pencil as a matrix for matrix-assisted laser desorption/ionisation*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **2007** 21: 180-190.
- [161].Berger-Nicoletti, E., Wurm, F., Kilbinger, A.F.M., and Frey, H., *Pencil lead as a matrix for MALDI-ToF mass spectrometry of sensitive functional polymers*. Macromolecules **2007** 40: 746-751.
- [162].Cha, S. and Yeung, E.S., *Colloidal graphite-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and ms of small molecules. 1. Imaging of cerebroside directly from rat brain tissue*. Anal. Chem. **2007** 79: 2373-2385.
- [163].Zhang, H., Cha, S., and Yeung, E.S., *Colloidal graphite-assisted laser desorption/ionization ms and msn of small molecules. 2. direct profiling and ms imaging of small metabolites from fruits*. Anal. Chem. **2007** 79: 6575-6584.
- [164].Cha, S., Zhang, H., Ilarslan, H.I., Wurtele, E.S., Brachova, L., Nikolau, B.J., and Yeung, E.S., *Direct profiling and imaging of plant metabolites in intact tissues by using colloidal graphite-assisted laser desorption ionization mass spectrometry*. The Plant Journal **2008** 55: 348-360.
- [165].Kawasaki, H., Takahashi, N., Fujimori, H., Okumura, K., Watanabe, T., Matsumura, C., Takemine, S., Nakano, T., and Arakawa, R., *Functionalized pyrolytic highly oriented graphite polymer film for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in environmental analysis*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **2009** 23: 3323-3332.
- [166].Dong, X., Cheng, J., Li, J., and Wang, Y., *Graphene as a novel matrix for the analysis of small molecules by MALDI-TOF MS*. Anal. Chem. **2010** 82: 6208-6214.
- [167].Tang, L.A.L., Wang, J., and Loh, K.P., *Graphene-based SELDI probe with ultrahigh extraction and sensitivity for DNA oligomer*. J. Am. Chem. Soc. **2010** 132: 10976-10977.
- [168].Zhou, X., Wei, Y., He, Q., Boey, F., Zhang, Q., and Zhang, H., *Reduced graphene oxide films used as matrix of MALDI-TOF-MS for detection of octachlorodibenzo-p-dioxin*. Chem. Commun. **2010** 46: 6974-6976.
- [169].Kim, Y.-K., Na, H.-K., Kwack, S.-J., Ryoo, S.-R., Lee, Y., Hong, S., Hong, S., Jeong, Y., and Min, D.-H., *Synergistic effect of graphene oxide/MWCNT films in laser desorption/ionization mass spectrometry of small molecules and tissue imaging*. ACS Nano **2011** 5: 4550-4561.
- [170].Kim, Y.-K. and Min, D.-H., *Fabrication of alternating multilayer films of graphene oxide and carbon nanotube and its application in mechanistic study of laser desorption/ionization of small molecules*. ACS Appl. Mater. Interfaces **2012** 4: 2088-2095.
- [171].Shi, C., Meng, J., and Deng, C., *Enrichment and detection of small molecules using magnetic graphene as an adsorbent and a novel matrix of MALDI-TOF-MS*. Chem. Commun. **2012** 48: 2418-2420.
- [172].Chen, C.-T. and Chen, Y.-C., *Fe₃O₄/TiO₂ Core/shell nanoparticles as affinity probes for the analysis of phosphopeptides using TiO₂ surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Anal. Chem. **2005** 77: 5912-5919.
- [173].Najam-ul-Haq, M., Rainer, M., Huck, C.W., Hausberger, P., Kraushaar, H., and Bonn, G.n.K., *Nanostructured diamond-like carbon on digital versatile disc as a matrix-free target for laser desorption/ionization mass spectrometry*. Anal. Chem. **2008** 80: 7467-7472.
- [174].Sage, L., *Femtomolar sensitivity with matrix-free LDI MS*. Anal. Chem. **2008** 80: 7183-7183.
- [175].Winkler, W., Balika, W., Hausberger, P., Kraushaar, H., and Allmaier, G., *Diamond-like carbon coated polymer-based targets in microscope slide format for MALDI mass spectrometry*. J. Mass Spectrom. **2010** 45: 566-569.
- [176].Shariatgorji, M., Amini, N., Thorsen, G., Crescenzi, C., and Ilag, L.L., *μ -Trap for the SALDI-MS screening of organic compounds prior to lc/ms analysis*. Anal. Chem. **2008** 80: 5515-5523.
- [177].Amini, N., Shariatgorji, M., and Thorsén, G., *SALDI-MS signal enhancement using oxidized graphitized carbon black nanoparticles*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **2009** 20: 1207-1213.
- [178].Guild, G.E., Lenehan, C.E., and Walker, G.S., *Surface-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry with an activated carbon surface for the rapid detection of underivatized steroids*. Int. J. Mass Spectrom. **2010** 294: 16-22.

- [179].Coffinier, Y., Szunerits, S., Drobecq, H., Melnyk, O., and Boukherroub, R., *Diamond nanowires for highly sensitive matrix-free mass spectrometry analysis of small molecules*. *Nanoscale* **2012** 4: 231-238.
- [180].Crecelius, A., Clench, M.R., Richards, D.S., and Parr, V., *Thin-layer chromatography–matrix-assisted laser desorption ionisation–time-of-flight mass spectrometry using particle suspension matrices*. *J. Chromatogr. A* **2002** 958: 249-260.
- [181].Chen, C.-T. and Chen, Y.-C., *Molecularly imprinted tio₂-matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for selectively detecting α -cyclodextrin*. *Anal. Chem.* **2004** 76: 1453-1457.
- [182].Chen, C.-T. and Chen, Y.-C., *Desorption/ionization mass spectrometry on nanocrystalline titania sol-gel-deposited films*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004** 18: 1956-1964.
- [183].Cropek, D., Kemme, P.A., Makarova, O.V., Chen, L.X., and Rajh, T., *Selective photocatalytic decomposition of nitrobenzene using surface modified TiO₂ nanoparticles*. *J. Phys. Chem. C* **2008** 112: 8311-8318.
- [184].Watanabe, T., Okumura, K., Nozaki, K., Kawasaki, H., and Arakawa, R., *Selective photocatalytic degradation of poly(ethylene glycol) additives using TiO₂ surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009** 23: 3886-3890.
- [185].Lee, K.-H., Chiang, C.-K., Lin, Z.-H., and Chang, H.-T., *Determining enediol compounds in tea using surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with titanium dioxide nanoparticle matrices*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007** 21: 2023-2030.
- [186].Castro, A.L., Madeira, P.J.A., Nunes, M.R., Costa, F.M., and Florêncio, M.H., *Titanium dioxide anatase as matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization analysis of small molecules*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008** 22: 3761-3766.
- [187].Kawasaki, H., Okumura, K., and Arakawa, R., *Influence of crystalline forms of titania on desorption/ionization efficiency in titania-based surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan* **2010** 58: 221-228.
- [188].Chiu, T.-C., *Steroid hormones analysis with surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using catechin-modified titanium dioxide nanoparticles*. *Talanta* **2011** 86: 415-420.
- [189].Watanabe, T., Okumura, K., Kawasaki, H., and Arakawa, R., *Effect of urea surface modification and photocatalytic cleaning on surface-assisted laser desorption ionization mass spectrometry with amorphous TiO₂ nanoparticles*. *J. Mass Spectrom.* **2009** 44: 1443-1451.
- [190].Yuan, M., Shan, Z., Tian, B., Tu, B., Yang, P., and Zhao, D., *Preparation of highly ordered mesoporous WO₃-TiO₂ as matrix in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. *Microporous Mesoporous Mater.* **2005** 78: 37-41.
- [191].Shan, Z., Han, L., Yuan, M., Deng, C., Zhao, D., Tu, B., and Yang, P., *Mesoporous tungsten titanate as matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of biomolecules*. *Anal. Chim. Acta* **2007** 593: 13-19.
- [192].Bi, H., Qiao, L., Busnel, J.-M., Devaud, V., Liu, B., and Girault, H.H., *TiO₂ printed aluminum foil: single-use film for a laser desorption/ionization target plate*. *Anal. Chem.* **2009** 81: 1177-1183.
- [193].Sonderegger, H., Rameshan, C., Lorenz, H., Klauser, F., Klerks, M., Rainer, M., Bakry, R., Huck, C., and Bonn, G., *Surface-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry using TiO₂-coated steel targets for the analysis of small molecules*. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011** 401: 1963-1974.
- [194].Lo, C.-Y., Lin, J.-Y., Chen, W.-Y., Chen, C.-T., and Chen, Y.-C., *Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry on titania nanotube arrays*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008** 19: 1014-1020.
- [195].Northen, T.R., Yanes, O., Northen, M.T., Marrinucci, D., Uritboonthai, W., Apon, J., Golledge, S.L., Nordstrom, A., and Siuzdak, G., *Clathrate nanostructures for mass spectrometry*. *Nature* **2007** 449: 1033-1036.
- [196].Piret, G., Kim, D., Drobecq, H., Coffinier, Y., Melnyk, O., Schmuki, P., and Boukherroub, R., *Surface-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry on titanium dioxide (TiO₂) nanotube layers*. *Analyst* **2012** 137: 3058-3063.
- [197].Okuno, S., Arakawa, R., Okamoto, K., Matsui, Y., Seki, S., Kozawa, T., Tagawa, S., and Wada, Y., *Requirements for laser-induced desorption/ionization on submicrometer structures*. *Anal. Chem.* **2005** 77: 5364-5369.

- [198].Wada, Y., Yanagishita, T., and Masuda, H., *Ordered porous alumina geometries and surface metals for surface-assisted laser desorption/ionization of biomolecules: possible mechanistic implications of metal surface melting*. Anal. Chem. **2007** 79: 9122-9127.
- [199].Nayak, R. and Knapp, D.R., *Effects of thin-film structural parameters on laser desorption/ionization from porous alumina*. Anal. Chem. **2007** 79: 4950-4956.
- [200].Nayak, R., Liu, J., Sen, A.K., and Knapp, D.R., *Dual desorption electrospray ionization–laser desorption ionization mass spectrometry on a common nanoporous alumina platform for enhanced shotgun proteomic analysis*. Anal. Chem. **2008** 80: 8840-8844.
- [201].McLean, J.A., Stumpo, K.A., and Russell, D.H., *Size-selected (2–10 nm) Gold nanoparticles for matrix assisted laser desorption ionization of peptides*. J. Am. Chem. Soc. **2005** 127: 5304-5305.
- [202].Huang, Y.-F. and Chang, H.-T., *Nile red-adsorbed gold nanoparticle matrixes for determining aminothiols through surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Anal. Chem. **2006** 78: 1485-1493.
- [203].Chiang, N.-C., Chiang, C.-K., Lin, Z.-H., Chiu, T.-C., and Chang, H.-T., *Detection of aminothiols through surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using mixed gold nanoparticles*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **2009** 23: 3063-3068.
- [204].Huang, Y.-F. and Chang, H.-T., *Analysis of adenosine triphosphate and glutathione through gold nanoparticles assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Anal. Chem. **2007** 79: 4852-4859.
- [205].Su, C.-L. and Tseng, W.-L., *Gold nanoparticles as assisted matrix for determining neutral small carbohydrates through laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Anal. Chem. **2007** 79: 1626-1633.
- [206].Castellana, E.T., Sherrod, S.D., and Russell, D.H., *Nanoparticles for selective laser desorption/ionization in mass spectrometry*. Journal of the Association for Laboratory Automation **2008** 13: 330-334.
- [207].Stumpo, K.A. and Russell, D.H., *Anion effects on ionization efficiency using gold nanoparticles as matrices for LDI-MS*. J. Phys. Chem. C **2009** 113: 1641-1647.
- [208].Wu, H.-P., Yu, C.-J., Lin, C.-Y., Lin, Y.-H., and Tseng, W.-L., *Gold nanoparticles as assisted matrices for the detection of biomolecules in a high-salt solution through laser desorption/ionization mass spectrometry*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **2009** 20: 875-882.
- [209].Kailasa, S.K. and Wu, H.-F., *One-pot synthesis of dopamine dithiocarbamate functionalized gold nanoparticles for quantitative analysis of small molecules and phosphopeptides in SALDI- and MALDI-MS*. Analyst **2012** 137: 1629-1638.
- [210].Kawasaki, H., Sugitani, T., Watanabe, T., Yonezawa, T., Moriwaki, H., and Arakawa, R., *Layer-by-layer self-assembled multilayer films of gold nanoparticles for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Anal. Chem. **2008** 80: 7524-7533.
- [211].Duan, J., Linman, M.J., and Cheng, Q., *Ultrathin calcinated films on a gold surface for highly effective laser desorption/ionization of biomolecules*. Anal. Chem. **2010** 82: 5088-5094.
- [212].Nayak, R. and Knapp, D.R., *Matrix-free LDI mass spectrometry platform using patterned nanostructured gold thin film*. Anal. Chem. **2010** 82: 7772-7778.
- [213].Liu, R., Liu, J.-f., Zhou, X.-x., and Jiang, G.-b., *Cysteine modified small ligament au nanoporous film: an easy fabricating and highly efficient surface-assisted laser desorption/ionization substrate*. Anal. Chem. **2011** 83: 3668-3674.
- [214].Hua, L., Chen, J., Ge, L., and Tan, S., *Silver nanoparticles as matrix for laser desorption/ionization mass spectrometry of peptides*. Journal of Nanoparticle Research **2007** 9: 1133-1138.
- [215].Sherrod, S.D., Diaz, A.J., Russell, W.K., Cremer, P.S., and Russell, D.H., *Silver nanoparticles as selective ionization probes for analysis of olefins by mass spectrometry*. Anal. Chem. **2008** 80: 6796-6799.
- [216].Chiu, T.-C., Chang, L.-C., Chiang, C.-K., and Chang, H.-T., *Determining estrogens using surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with silver nanoparticles as the matrix*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **2008** 19: 1343-1346.
- [217].Shrivastava, K. and Wu, H.-F., *Applications of silver nanoparticles capped with different functional groups as the matrix and affinity probes in surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight and atmospheric*

pressure matrix-assisted laser desorption/ionization ion trap mass spectrometry for rapid analysis of sulfur drugs and biothiols in human urine. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008** 22: 2863-2872.

[218].Wang, M.-T., Liu, M.-H., Wang, C.R.C., and Chang, S.Y., *Silver-coated gold nanoparticles as concentrating probes and matrices for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of aminoglycosides.* *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009** 20: 1925-1932.

[219].Yan, H., Xu, N., Huang, W.-Y., Han, H.-M., and Xiao, S.-J., *Electroless plating of silver nanoparticles on porous silicon for laser desorption/ionization mass spectrometry.* *Int. J. Mass Spectrom.* **2009** 281: 1-7.

[220].Kawasaki, H., Yonezawa, T., Watanabe, T., and Arakawa, R., *Platinum nanoflowers for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biomolecules.* *The Journal of Physical Chemistry C* **2007** 111: 16278-16283.

[221].Kawasaki, H., Yao, T., Sugauma, T., Okumura, K., Iwaki, Y., Yonezawa, T., Kikuchi, T., and Arakawa, R., *Platinum nanoflowers on scratched silicon by galvanic displacement for an effective SALDI substrate.* *Chemistry – A European Journal* **2010** 16: 10832-10843.

[222].Taira, S., Sugiura, Y., Moritake, S., Shimma, S., Ichiyanagi, Y., and Setou, M., *Nanoparticle-assisted laser desorption/ionization based mass imaging with cellular resolution* *Anal. Chem.* **2008** 80: 4761-4766.

[223].Seino, T., Sato, H., Yamamoto, A., Nemoto, A., Torimura, M., and Tao, H., *Matrix-free laser desorption/ionization-mass spectrometry using self-assembled germanium nanodots.* *Anal. Chem.* **2007** 79: 4827-4832.

[224].Watanabe, T., Kawasaki, H., Yonezawa, T., and Arakawa, R., *Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (SALDI-MS) of low molecular weight organic compounds and synthetic polymers using zinc oxide (ZnO) nanoparticles.* *J. Mass Spectrom.* **2008** 43: 1063-1071.

[225].Yalcin, T. and Li, L., *Cobalt coated substrate for matrix-free analysis of small molecules by laser desorption/ionization mass spectrometry.* *Appl. Surf. Sci.* **2009** 256: 1309-1312.

[226].Taira, S., Kitajima, K., Katayanagi, H., Ichiishi, E., and Ichiyanagi, Y., *Manganese oxide nanoparticle-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for medical applications.* *Science and Technology of Advanced Materials* **2009** 10.

[227].NanoHorizons. *Disposable MALDI plates high-throughput small-molecule analysis of pharmaceutical compounds.* **2005**; Available from <http://www.nanohorizons.com/documents/Nano.QuickMass.pdf>.

[228].Law, K.P., *Laser desorption/ionization mass spectrometry on nanostructured semiconductor substrates: DIOS (TM) and QuickMass (TM).* *Int. J. Mass Spectrom.* **2010** 290: 72-84.

[229].Shenar, N., Martinez, J., and Enjalbal, C., *Laser desorption/ionization mass spectrometry on porous silica and alumina for peptide mass fingerprinting.* *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008** 19: 632-644.

[230].Shenar, N., Cantel, S., Martinez, J., and Enjalbal, C., *Comparison of inert supports in laser desorption/ionization mass spectrometry of peptides: pencil lead, porous silica gel, DIOS-chip and NALDI target.* *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009** 23: 2371-2379.

[231].Mouls, L., Aubagnac, J.-L., Martinez, J., and Enjalbal, C., *Low energy peptide fragmentations in an ESI-Q-ToF type mass spectrometer.* *J. Proteome Res.* **2007** 6: 1378-1391.

[232].Shenar, N., Sommerer, N., Martinez, J., and Enjalbal, C., *Comparison of LID versus CID activation modes in tandem mass spectrometry of peptides.* *J. Mass Spectrom.* **2009** 44: 621-632.

[233].Luo, G., Marginean, I., and Vertes, A., *Internal Energy of Ions Generated by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization.* *Anal. Chem.* **2002** 74: 6185-6190.

[234].SIGMA-ALDRICH. *ANALYTIX-Advances in analytical chemistry.* **2001**; Available from http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/4242/fl_analytix6_2001_new.pdf.

[235].Bruker.Daltonics. *Innovative smartbeam laser technology enhances MALDI-TOF based proteomics applications.* Technical Note # TN-12 **2008**; Available from <http://www.bdal.com/uploads/media/TN-12-smartbeam.pdf>.

[236].Cotter, R.J., Ilchenko, S., Wang, D., and Gundrya, R., *Tandem time-of-flight (TOF/TOF) mass spectrometry and proteomics.* *J. Mass Spec. Soc. Jap.* **2005** 53: 7-17.

- [237].Medzihradzsky, K.F., Campbell, J.M., Baldwin, M.A., Falick, A.M., Juhasz, P., Vestal, M.L., and Burlingame, A.L., *The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer*. Anal. Chem. **1999** 72: 552-558.
- [238].Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., and Holle, A., *A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics*. Anal. Bioanal. Chem. **2003** 376: 952-965.
- [239].Wisztorski, M., Lemaire, R., Stauber, J., Ait Menguellet, S., Jardin-Mathé, O., Day, R., Salzet, M., and Fournier, I., *Imagerie MALDI*. Med Sci (Paris) **2007** 23: 31-38.
- [240].Vinh, J., *Etude et caractérisation structurale de modifications post-traductionnelles de la tubuline par spectrométrie de masse*. **1999**, Université Pierre et Marie Curie - PARIS 6.
- [241].Stöber, W., Fink, A., and Bohn, E., *Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range*. J. Colloid Interface Sci. **1968** 26: 62-69.
- [242].Tang, W., Xu, H., Kopelman, R., and Philbert, M.A., *Photodynamic characterization and in vitro application of methylene blue-containing nanoparticle platforms*. Photochem. Photobiol. **2005** 81: 242-249.
- [243].Lapierre, F., *Electromouillage sur diélectrique (EWOD) : Conception et réalisation de dispositifs microfluidiques originaux sur surfaces superhydrophobes*, in *Ecole Doctorale Sciences pour l'Ingénieur*. **2011**, Université Lille Nord-de-France: Lille.
- [244].ExpASY. *Swiss Institute of Bioinformatics : Swiss-Prot archiv*. Available from <http://www.expasy.ch/sprot/>.
- [245].Merrifield, R.B., *Solid phase peptide synthesis.I. the synthesis of a tetrapeptide*. J. Am. Chem. Soc. **1963** 85: 2149-2154.
- [246].Stewart, J.M. and Young, J.D., *Solid phase peptide synthesis (2nd edn)*, Rockford: Pierce Chemical Company. **1984**.
- [247].Baron, A., *Synthèse et étude d'analogues peptidiques en tant qu'inhibiteurs de fusion du VIH*, in *Ecole doctorale des sciences chimiques*. **2010**, Université de Montpellier 2: Montpellier.
- [248].Roepstorff, P. and Fohlman, J., *Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides*. Biol. Mass Spectrom. **1984** 11: 601-601.
- [249].Biemann, K., *Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure*. Biomed. Environ. Mass Spectrom. **1988**: 99-111.
- [250].Papayannopoulos, I.A., *The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides*. Mass Spectrom. Rev. **1995** 14: 49-73.
- [251].Cooks, G. and Caprioli, R., *Proteomics, peptide sequencing and the fragmentation mechanisms of small organic ions*. J. Mass Spectrom. **2000** 35: 1375-1375.
- [252].Paizs, B. and Suhai, S., *Fragmentation pathways of protonated peptides*. Mass Spectrom. Rev. **2005** 24: 508-548.
- [253].Jones, J.L., Dongre, A.R., Somogyi, A., and Wysocki, V.H., *Sequencedependence of peptide fragmentation efficiency curves determined by electrospray ionization/surface-induced dissociation mass spectrometry*. J. Am. Chem. Soc. **1994** 116: 8368-8369.
- [254].Paizs, B. and Van Stipdonk, M., *Focus issue on peptide fragmentation*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **2008** 19: 1717-1718.
- [255].Brodbeck, J., *Focus in Honor of Vicki Wysocki and Simon Gaskell, Recipients of the 2009 award for a distinguished contribution in mass spectrometry*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **2010** 21: i-ii.
- [256].Bleilholder, C., Osburn, S., Williams, T.D., Suhai, S.n., Van Stipdonk, M., Harrison, A.G., and Paizs, B.I., *Sequence-scrambling fragmentation pathways of protonated peptides*. J. Am. Chem. Soc. **2008** 130: 17774-17789.
- [257].Goloborodko, A., Gorshkov, M., Good, D., and Zubarev, R., *Sequence scrambling in shotgun proteomics is negligible*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **2011** 22: 1121-1124.

Titre : Développements Méthodologiques en Spectrométrie de Masse LDI pour l'Analyse de Peptides.

Résumé : L'émergence de disciplines post-génomiques, telles que la protéomique et la métabolomique, requiert le développement d'outils analytiques toujours plus performants afin de déterminer, respectivement, l'ensemble de peptides, protéines et composés organiques de faibles masses moléculaires présents dans un milieu biologique. En raison de sa sensibilité, spécificité et rapidité d'acquisition des données, la désorption/ionisation laser assistée par une matrice (MALDI) constitue une des méthodes d'ionisation majeure en spectrométrie de masse (MS) permettant d'envisager les analyses de ces composés. Cependant, elle présente des limitations pour la détection de petites molécules (<700 Da) due à la présence des ions de matrice dans les basses masses du spectre. Dans ce contexte, le potentiel de différentes techniques LDI alternatives au MALDI a été évalué dans le cadre de la détection de peptides synthétiques de compositions et de tailles variées. Dans le cadre de cette thèse, de nouvelles stratégies analytiques LDI-MS et LDI-MS/MS basées sur l'utilisation de matrices inertes ont été développées. Pour ce faire, des substrats, à base de silice et de titane présentant différentes structurations, ont été utilisés pour assister la désorption/ionisation sans ajout de matrice organique. L'optimisation des méthodologies a été réalisée, puis l'évaluation de la sensibilité et de la reproductibilité des techniques a ensuite été appréciée. Les problématiques de discrimination spectrale dans le cas d'analyses de mélanges de peptides ont été abordées afin de valider ces méthodologies LDI pour des applications en protéomique. Les performances des méthodes ont été comparées à celles obtenues dans des stratégies LDI assistées par des matrices organiques (MALDI) pour des échantillons de peptides synthétiques seuls et en mélange ainsi que de quatre digestats tryptiques issus du Cytochrome C (12 kDa), de la β -Caséine (24 kDa), de l'albumine de sérum bovin (BSA, 66 kDa) et du fibrinogène (340 kDa). Un second aspect a consisté en l'analyse de peptide en spectrométrie de masse en tandem. Pour cela, des expériences de dissociation de peptides en fragmentation basse et haute énergie respectivement sur des appareillages de type ESI-QqTOF et MALDI-TOF/TOF ont été menées. Les résultats obtenus ont contribué à une meilleure compréhension du séquençage peptidique et ont démontré des comportements particuliers propres à certaines séquences observés, quelles que soient les méthodes d'activation vibrationnelle employées. La présence de résidus basiques, à partir du moment où ils ne se trouvent pas en position C-terminale, a été déterminante pour déclencher des voies de fragmentation en compétition avec les dissociations b_x - y_n attendues. Ces comportements doivent être impérativement pris en compte par les logiciels de séquençage.

Title : Development of LDI-MS as alternative methods for peptide analysis

Summary: The advent of proteomics and metabolomics require the development of highly efficient analytical tool in order to detect and identify peptides and proteins as well as small organic compounds present in biological media. Due to its sensitivity, specificity and speed of data acquisition, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization constitutes one of the major ionization methods in mass spectrometry suitable for the analyses of biomolecules. However the sensitive detection of low molecular weight compounds (<700 Da) is most of the time troublesome, being hampered by the production of matrix ions in the low mass range. In that case, the potency of various alternative LDI techniques based on inert ionization promoting substrates was evaluated for the detection of synthetic peptides presenting wide sequence diversity. Silicon and titanium based materials exhibiting different physico-chemical properties were probed for LDI-MS and LDI-MS/MS analyses of the designed model peptides. These methods, which were devoted of the use of any organic matrix, were optimized through a large set of experiments, taking particular attention to detection sensitivity and reproducibility. Spectral discrimination was another matter of concern, especially in the case of peptide mixture analyses which is encountered in proteomics for tryptic digest elucidation. The performances of the design LDI methods were compared with the original MALDI technique for peptide detection and sequencing from various samples *i.e.* pure and mixed synthetic peptides, and four tryptic digests issued from Cytochrome C (12 kDa), β -Casein (24 kDa), Bovin serum albumin (BSA, 66 kDa) and fibrinogen (340 kDa). A second research topic dealing with peptide sequencing by MS/MS technologies was pursued in order to contribute to the knowledge of the fragmentation rules. Vibrational activation methods through various mass analyzer configurations (MALDI-TOF/TOF, ESI-QqTOF) were investigated. Specific dissociation behaviors were extracted from the recorded MS/MS data sets. The presence of basic residues, provided that they are not located at the peptide C-terminal end, triggered specific backbone fragmentation in competition to the expected b_x - y_n pathway. This was found to be a critical issue to be considered by sequencing softwares.

DISCIPLINE : Chimie

MOTS-CLES : Spectrométrie de Masse, LDI, MALDI, ESI, MS/MS, LID, CID, Peptides.

Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR-CNRS 5247, Université Montpellier 2, Sciences et Techniques du Languedoc, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier.